



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

GENES Y PROTEÍNAS ASOCIADAS A
DISTROGLICANOPATÍAS EN LA RETINA DE
MAMÍFEROS ADULTOS: FUNCIÓN DEL GEN *POMT1*

Mary Luz Uribe Ríos



Tesis

Doctorales

www.eltallerdigital.com

UNIVERSIDAD de ALICANTE



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

Departamento de Fisiología, Genética y Microbiología

Facultad de Ciencias

**GENES Y PROTEÍNAS ASOCIADAS A
DISTROGLICANOPATÍAS EN LA RETINA DE
MAMÍFEROS ADULTOS: FUNCIÓN DEL GEN *POMT1***

Mary Luz Uribe Rios

**Tesis presentada para aspirar al grado de
DOCTORA POR LA UNIVERSIDAD DE ALICANTE**

**MENCIÓN DE DOCTORA INTERNACIONAL
Doctorado Biología Experimental y Aplicada**

Dirigida por:

Dr. JOSÉ MARTÍN NIETO



Universitat d'Alacant Universidad de Alicante

Departament de Fisiologia, Genètica i Microbiologia
Departamento de Fisiología, Genética y Microbiología

El Dr. **José Martín Nieto**, Profesor Titular de Genética del Departamento de Fisiología, Genética y Microbiología de la Universidad de Alicante,

CERTIFICA:

Que Dña. Mary Luz Uribe Rios ha realizado bajo su dirección la presente memoria titulada “Genes y Proteínas Asociadas a Distroglucanopatías en la Retina de Mamíferos Adultos: Función del Gen *POMT1*” por la cual opta al título de **Doctora por la Universidad de Alicante**, con mención de **Doctora Internacional**.

Conforme

Firmado: José Martín Nieto

Alicante, Septiembre de 2016

AGRADECIMIENTOS

Seré breve, porque cada una de las personas que me ha acompañado de una u otra forma en este camino hacia la consecución de mi doctorado, sabe en el fondo lo agradecida que me encuentro con cada uno de ellos.

En primer lugar, agradecimientos infinitos a mi Director de tesis, el Dr. José Martín Nieto, por creer en mí y darme la oportunidad de aprender de su mano la grandeza de la ciencia y el conocimiento. Sé que en él siempre tendré un mentor y un amigo.

A mi compañera Carmen, por estar ahí siempre, por enseñarme a enseñar y aprender, por ser compi, vecina, amiga y mano derecha. A los “ángeles de Pepe”, todas las estudiantes que se han formado en nuestro grupo de investigación, ya que me han permitido desarrollar mi faceta docente y porque su contribución ha sido muy importante en el desarrollo de esta tesis.


En la Universidad de Alicante, al personal de apoyo de microscopía y el animalario en los Servicios Técnicos de Investigación, al grupo del Dr. Roque Bru Martínez, y al grupo Neurovis. Sois los mejores maestros. A nuestros colaboradores en la Universidad de Alcalá y la Universidad Autónoma de Madrid. Al Dr. Jesús Cruces por permitirme participar de su grupo de investigación y transmitirme sus conocimientos sobre bioinformática.

A mí familia por hacerme quien soy por ser mi esperanza y rayito de luz cada día, a ellos porque en la distancia han sabido estar siempre ahí para celebrar mis triunfos y para consolar mis penas. A la meua segona família, els Sabater Piqueres, per la seua paciència i comprensió. A tots ells ¡Gràcies!

*Finalmente, pero no menos importante, a tí que has estado siempre dispuesto a ayudarme en todo, porque me has dado la mano en cada subida y bajada de esta escalada. Esta bandera la colgaremos juntos. **¡¡Gracias Carlos!!***

*“Nunca por hacer las cosas bien,
se ha perdido el tiempo.”
(Charles James Fox)*

*“El camino del progreso no es ni rápido ni fácil.”
(Marie Curie)*



*“A los que buscan aunque no encuentren.
A los que avanzan aunque se pierdan.
A los que viven aunque se mueran.”*

Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante
(Mario Benedetti)

***A mis padres,
A mi bastón***

ABREVIATURAS

λ	Longitud de onda	<i>FKTN</i>	Fukutina (gen)
aa(s)	Aminoácido(s)	Gal	Galactosa
ADN	Ácido desoxirribonucleico	GalNAc	N-acetilgalactosamina
ADNasa	Desoxirribonucleasa	GalT	Proteína galactosiltransferasa
ADNc	ADN complementario	GlcA	Ácido glucurónico
ARN	Ácido ribonucleico	GlcNAc	N-acetilglucosamina
ARNm	ARN mensajero	GTP	Guanosina trifosfato
ATP	Adenosina trifosfato	Hepes	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico
BCA	Acido bicinconínico	HRPO	Peroxidasa de rábano
BSA	Seroalbúmina bovina	IgG	Inmunoglobulina G
CB	Calbindina	kb	Kilobases
CCG	Capa de células ganglionares	kDa	Kilodalton
CDP-ribitol	Ribitol citidín-difosfato	KO	'Knock-out'
CFN	Capa de fibras del nervio óptico	LARGE	Proteína similar a acetilglucosaminiltransferasa
Cit c	Citocromo c	LGMD	Distrofia muscular de cinturas
CNE	Capa nuclear externa	mA	miliamperio
CNI	Capa nuclear interna	Man	Manosa
CPE	Capa plexiforme externa	MDDG	Distrofia muscular de tipo distroglicanopatía
CPI	Capa plexiforme interna	MEB	Enfermedad de músculo-ojo-cerebro
DG	Distroglicano	MEC	Matriz extracelular
DGC(s)	Complejo distrofina-glicoproteína	Mr	Masa molecular aparente
DGP	Distroglicanopatía(s)	NDK	Nucleósido difosfato quinasa
DMEM	Medio de Eagle modificado por Dulbecco	NIH	National Institutes of Health
dNTP(s)	Desoxinucleósido(s) trifosfato	OCT	Solución de inclusión para criostato
Dol-P-Man	Dolicol-fosfato-manosa	pb	Par(es) de bases
DTT	Ditiotreitol	PB	Tampón fosfato
EDTA	Ácido etilén-diamino-tetraacético	PBS	Tampón fosfato salino
EPR	Epitelio pigmentario de la retina	PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
ERG(s)	Electrorretinograma(s)	PFA	Paraformaldehído
FCMD	Distrofia muscular congénita de Fukuyama	PKC	Proteína quinasa C
FKRP	Proteína relacionada con la fukutina		

PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
POMGnT1	Proteína O-manosa β 1,2-N-acetilglucosaminil-transferasa 1
POMGnT1	Proteína O-manosa β 1,4-N-acetilglucosaminil-transferasa 1
POMT1/2	Proteína O-manosiltransferasa 1/2
PVDF	Difluoruro de polivinilideno
Rbo5P	Ribitol 5-fosfato
RE	Retículo endoplásmico
rpm	Revoluciones por minuto
RT	Retrotranscripción
RT-PCR	Retrotranscripción-reacción en cadena de la polimerasa
SDS	Duodecilsulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS
SE	Segmento(s) externo(s)
SEM	Error estándar de la media
Ser	Serina
SI	Segmento(s) interno(s)
SiaT	Proteína sialiltransferasa
SNC	Sistema nervioso central
TBS	Tampon Tris salino
Thr	Treonina
Tm	Temperatura de fusión
Tris	Tris(hidroximetil)-aminometano
UV	Ultravioleta
WWS	Síndrome de Walker-Warburg
Xyl	Xilosa

ÍNDICE

Resumen	I
Summary	III
1 Introducción	1
1.1 Glicosilación de proteínas	2
1.2 α -Distroglicano y su glicosilación	8
1.3 Defectos en la O-glicosilación del α -DG: MDDGs	13
1.4 Efectos de las MDDGs (DGPs) en la retina	18
1.5 Objetivos	23
2 Expresión de genes y proteínas asociados a distroglicanopatías en la retina de mamíferos	25
2.1 Introducción	26
2.2 Materiales y métodos	28
2.3 Resultados	39
2.4 Discusión	50
3 POMGnT1 y POMGnT2: Dos <i>N</i>-acetilglucosaminiltransferasas de proteínas que actúan sobre un mismo sustrato, el α distroglicano	57
3.1 Introducción	58
3.2 Proteína O-manosa β 1,2- <i>N</i> -acetilglucosaminiltransferasa 1	60
3.3 Proteína O-manosa β 1,4- <i>N</i> -acetilglucosaminiltransferasa 2	64
3.4 Análisis bioinformático de POMGnT1 y POMGnT2	66
3.5 Discusión	81
4 Alteraciones estructurales en la retina de un ratón KO condicional en el gen <i>Pomt1</i>, modelo de distroglicanopatías	85
4.1 Introducción	86
4.2 Materiales y métodos	90
4.3 Resultados	94
4.4 Discusión	105
5 Conclusiones	111
Conclusions	112
Bibliografía	113
Anexo	135

RESUMEN

La *O*-manosilación de proteínas es una modificación postraducciona de gran relevancia en eucariotas. El α -dístroglicano (α -DG), componente principal del complejo dístrofina-glicoproteína en el músculo y células nerviosas, se encuentra altamente *O*-manosilado. Existe un grupo de dístrofias neuromusculares hereditarias cuya base molecular subyacente es un déficit en la glicosilación del α -DG. Son las llamadas dístrofglicanopatías (DGPs), las cuales ofrecen a los pacientes una corta esperanza de vida y cuyos síntomas se extienden al cerebro, al músculo y a la retina. Estas enfermedades engloban, de mayor a menor gravedad, el síndrome de Walker-Warburg (WWS), la enfermedad de músculo-ojo-cerebro (MEB) y la dístrofia muscular congénita de Fukuyama (FCMD), además de las dístrofias musculares congénitas moderadas (MDC) y las dístrofias musculares de cinturas (LGMD). Se conocen actualmente 18 genes asociados a DGPs, la mayoría de los cuales codifican el DG y enzimas implicadas directa o indirectamente en su *O*-glicosilación.

En esta tesis doctoral se ha tratado de mejorar nuestra comprensión acerca de los genes y proteínas asociados a las DGPs mediante el abordaje de su expresión y función en un tejido frecuentemente afectado en estas enfermedades: la retina. En el capítulo 1 se resumen el estado actual del conocimiento acerca de estas enfermedades, la glicosilación del α -DG, y su papel en la estructura de la retina.

Los capítulos siguientes comienzan cada uno con un breve resumen, y se desglosan individualmente en Introducción, Materiales y Métodos, Resultados y Discusión. El capítulo 2, titulado “Expresión de genes y proteínas asociados a dístrofglicanopatías en la retina de mamíferos” se centra en la detección de la expresión de los genes *POMT1*, *POMT2*, *POMGNT1*, *FKTN*, *FKRP* y *LARGE*, tanto a nivel de ARNm como de proteína en la retina neural de distintas especies de mamíferos utilizando

técnicas de RT-PCR y Western blotting, y su perfil de distribución mediante técnicas de inmunohistoquímica.

En el capítulo 3, titulado “POMGnT1 y POMGnT2: Dos *N*-acetilglucosaminil-transferasas de proteínas que actúan sobre un mismo sustrato, el α -dístroglicano”, se presenta una revisión de la información obtenida a partir de la literatura y bases de datos públicas, así como de análisis bioinformáticos realizados en este trabajo, sobre las proteínas POMGnT1 y POMGnT2. El conjunto de datos obtenido revela la existencia de una elevada homología entre las secuencias de aminoácidos de las proteínas humanas y sus ortólogos en las distintas especies del filo Cordados. Los integrantes de este taxón constituyen, así, un grupo monofilético para ambas proteínas, cada una de las cuales presumiblemente posee un ancestro común separado.

En el capítulo 4, titulado “Alteraciones estructurales en la retina de un ratón KO condicional en el gen *Pomt1*, modelo de distroglicanopatías”, se exponen los resultados de un trabajo multidisciplinar realizado en estrecha colaboración con grupos de la Universidad Autónoma de Madrid y la Universidad de Alcalá. En nuestro grupo se han estudiado los cambios morfológicos y estructurales que tienen lugar en la retina de un ratón modelo de DGPs en el que el gen *Pomt1* ha sido “noqueado” de forma condicional en este tejido. Los análisis llevados a cabo revelaron importantes alteraciones en la organización de la retina externa, incluidas las sinapsis establecidas entre los fotorreceptores y sus células postsinápticas, así como una reactividad aumentada de las células gliales en la retina interna.

Finalmente, en el último capítulo se presentan a modo de sumario las conclusiones obtenidas del trabajo desarrollado en esta tesis doctoral.

ABSTRACT

The *O*-mannosylation of proteins is a post-translational modification of great relevance in eukaryotes. α -Dystroglycan (α -DG), the main component of the dystrophin-glycoprotein complex in muscle and nerve cells, is highly *O*-mannosylated. A group of inherited neuromuscular dystrophies exist whose underlying molecular basis is a deficiency in α -DG glycosylation. These are the so-called dystroglycanopathies (DGPs), which offer a short life expectancy to patients and whose symptoms extend to the brain, muscle and retina. These diseases include, from higher to lower severity, the Walker-Warburg syndrome (WWS), muscle-eye-brain disease (MEB) and Fukuyama congenital muscular dystrophy (FCMD), in addition to moderate congenital muscular dystrophies (CMD) and limb-girdle muscular dystrophies (LGMD). A total of 18 genes associated with DGPs are currently known, most of which encode DG and enzymes directly or indirectly involved in its *O*-mannosylation.

In this Ph.D. Thesis we have aimed at improving our understanding of the genes and proteins associated with DGPs by assessing their expression and function in a tissue frequently affected in these diseases: the retina. Chapter 1 summarizes the state-of-the-art of these genetic disorders, α -DG glycosylation, and its role in retinal structure.

Subsequent chapters begin with a brief abstract, and are individually organized into Introduction, Materials and Methods, Results and Discussion. Chapter 2, entitled “Expression of genes and proteins associated with dystroglycanopathies in the

mammalian retina”, is focused on the detection of the expression of *POMT1*, *POMT2*, *POMGNT1*, *FKTN*, *FKRP* y *LARGE* genes, both at the mRNA and protein levels, in the neural retina of different species of mammals through RT-PCR and Western blotting analyses, and its distribution pattern by means of immunohistochemistry techniques.

In chapter 3, entitled “POMGnT1 and POMGnT2: Two protein N-acetylglucosaminyltransferases acting on the same substrate, α -dystroglycan”, a review is presented on information available in the literature and public databases, as well as obtained from bioinformatic analyses of POMGnT1 y POMGnT2 proteins. This set of data provides evidence of a high homology between amino acid sequences of the two human proteins and their orthologues in many different species of the phylum Chordata. Members of this taxon are concluded to constitute a monophyletic group for both proteins, each of which presumably exhibits a separate, common ancestor to all species.

In chapter 4, entitled “Structural alterations in the retina of a *Pomt1* conditional KO model of dystroglycanopathy” the results of a multidisciplinary research work done in close collaboration with groups of the Universidad Autónoma de Madrid and the Universidad de Alcalá are described. On our side we have addressed the morphological and structural changes taking place in the retina of a mouse model of DGPs in which the *Pomt1* gene has been conditionally knocked out in this tissue. The analyses carried out revealed major alterations in the organization of the outer retina, including synapses established between photoreceptors and their postsynaptic cells, and an increased reactivity of the glial cells in the inner retina.

Finally, in the last chapter major conclusions obtained from the research undertaken in this Ph.D. thesis are summarized.

Introducción

La mayoría de las proteínas son modificadas mediante la adición covalente de glicanos, los cuales pueden modular sus propiedades biológicas y sus funciones. Los glicanos se pueden clasificar en *N*-glicanos y *O*-glicanos según su tipo de unión a las glicoproteínas. Aquí se proporciona una visión general de los *O*-manosilglicanos, un subtipo de *O*-glicanos presente en un número limitado de glicoproteínas, como es el caso del α -dístroglicano (α -DG).

La *O*-glicosilación anormal de la subunidad α del DG, y la subsecuente pérdida de la capacidad para unirse a sus ligandos de la matriz extracelular (MEC), origina una variedad de distrofias neuromusculares congénitas llamadas distroglicanopatías (DGPs). Hasta ahora, se han identificado en pacientes con distroglicanopatías (DGPs) mutaciones en 18 genes, parte de los cuales codifican glicosiltransferasas, y otras enzimas que contribuyen indirectamente al proceso de glicosilación.

Las manifestaciones clínicas de las DGPs son muy variables, e incluyen un amplio espectro fenotípico. Algunas mutaciones se asocian con distrofias musculares de cinturas, y otras con la aparición de distrofias musculares congénitas más graves y que incluyen anomalías estructurales del cerebro y el ojo, como son la enfermedad de músculo-ojo-cerebro (MEB), el síndrome de Walker-Warburg (WWS), y la distrofia muscular congénita de Fukuyama (FCMD). Diversas anomalías oculares, incluyendo la displasia y el desprendimiento de retina, y las alteraciones del ERG, aparecen en los cuadros clínicos de pacientes con DGPs. Aquí se introducirán los conceptos más importantes acerca de la *O*-manosilación del DG y las proteínas implicadas en las DGPs, con énfasis en su sintomatología en la retina.

1.1. Glicosilación de proteínas

Cuando se estudia el sistema nervioso central o periférico, ya sea su arquitectura general o a nivel molecular en detalle, a nivel clínico o en sistemas modelo, tarde o temprano se llega al estudio de la glicosilación. La adición de carbohidratos es una importante modificación postraduccional responsable en gran medida de la estabilidad, el control de calidad y la conformación estructural de proteínas extracelulares y de membrana. Dicha modificación juega un papel importante en el desarrollo y diferenciación celular, al igual que en procesos de reconocimiento que ocurren durante la infección viral, la inflamación y la metástasis, y eventos de comunicación intercelular, como son la interacción con ligandos y la adhesión celular (Peter-Katalinić, 2006).

La glicosilación es la más común, y al mismo tiempo una de las más complejas modificaciones postraduccionales. Es un proceso enzimático independiente de molde, en el que se añaden covalentemente una o más unidades de azúcares a las proteínas y lípidos. En los mamíferos se distribuyen 12 monosacáridos distintos de forma desigual entre las principales vías de glicosilación (Figura 1.1), cada una de las cuales se define por el enlace entre el primer monosacárido y la proteína o lípido al que se une (Freeze *et al.*, 2015, 2012). Se sabe que más del 50 % de todas las proteínas humanas están glicosiladas (Wong, 2005), y esta condición varía en gran medida dependiendo del tejido, el estadio de desarrollo y la condición fisiológica. La importancia de la glicosilación se hace evidente por el hecho de que un 1-2 % de todos los genes humanos (aproximadamente 250-500) codifican enzimas implicadas en procesos de glicosilación de proteínas (Campbell & Yarema, 2005).

Las cadenas glicosídicas asociadas con la superficie celular, con las proteínas intracelulares y con los lípidos, contribuyen a numerosas funciones biológicas en los sistemas animales. Entre ellas cabe destacar la interacción con el ambiente extracelular y con macromoléculas, la adhesión celular y la invasión de patógenos, además de modular directamente la función de proteínas y vías de señalización, la dinámica de endocitosis de glicoproteínas y la vida media de la superficie celular a través de la unión multivalente a lectinas (Moremen *et al.*, 2012). Las proteínas en la vía secretora pueden ser glicosiladas en el retículo endoplásmico (RE) y en el aparato de Golgi. En el RE los

carbohidratos son añadidos principalmente a las proteínas recién sintetizadas y aún no plegadas. Como resultado, las células pueden utilizar la glicosilación para promover y regular el plegamiento de proteínas y el control de calidad de estas (Xu & Ng, 2015).

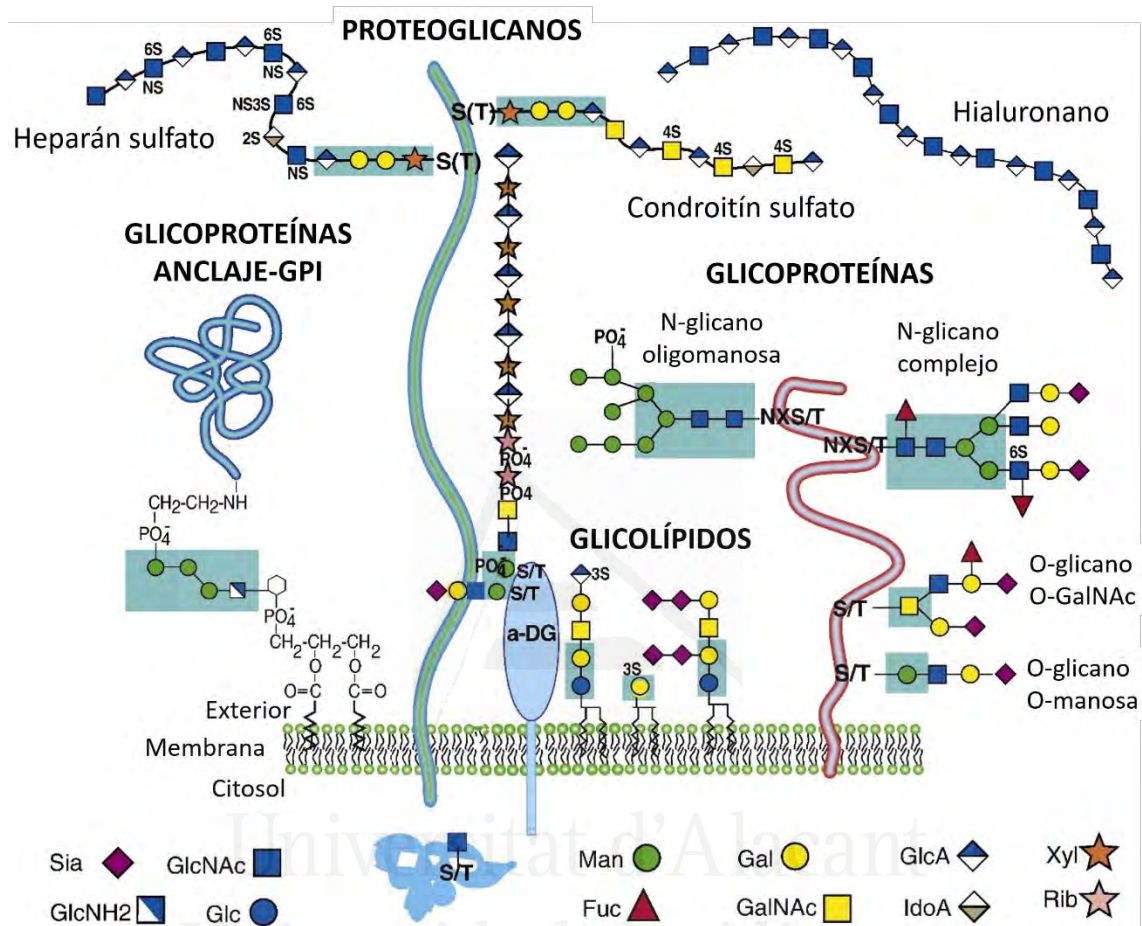


Figura 1.1. Principales glicanos en células de mamíferos. Diagrama de los diferentes tipos de glicanos en células de mamíferos. Las principales estructuras formadas por estos glicanos son: glicoproteínas ancladas a glicosilfosfatidilinositol (GPI), que contienen azúcares en su extremo C-terminal; proteoglicanos, como el heparán sulfato y el condroitín sulfato; glicolípidos; O-glicoproteínas; y N-glicoproteínas. La proteína con el dominio extracelular ovalado en azul es el α -DG, asociado no covalentemente a la subunidad transmembrana β -DG. Abreviaturas: Sia = ácido siálico, GlcNH₂ = glucosamina, GlcNAc = N-acetilglucosamina, Glc = glucosa, Man = manosa, Fuc = fucosa, Gal = galactosa, GalNAc = N-acetilgalactosamina, GlcA = ácido glucurónico, IdoA = ácido idurónico, Xyl = xilosa, Rib = ribitol, S/T = serina/treonina. Figura modificada de Stanley, 2016.

Hasta la fecha se conocen más de 100 trastornos congénitos de glicosilación, más del 80% de los cuales originan anomalías neurológicas. Estas se producen en pacientes portadores de mutaciones en las enzimas involucradas en las rutas de glicosilación (Freeze *et al.*, 2015). Las glicoproteínas sintetizadas en estas rutas se pueden clasificar en cuatro grandes grupos: con cadenas N-unidas, con cadenas O-unidas,

glicosaminoglicanos y proteínas con anclaje glicosilfosfatidilinositol (GPI) (Figura 1.1). Aquí nos centraremos en la síntesis de los oligosacáridos pertenecientes a los dos primeros grupos: *N*-glicosilación y *O*-glicosilación.

1.1.1. *N*-Glicosilación

En la *N*-glicosilación los monosacáridos se unen a los grupos amida de los residuos de Asn. Este tipo de glicosilación es la observada más frecuentemente en las proteínas (Spiro, 2002). Los organismos eucariotas cuentan con un complejo oligosacaril-transferasa (OST), que se encuentra en la cara luminal de la membrana del RE y se encarga de catalizar la transferencia de glicanos a una secuencia consenso constituida por el tripéptido Asn-X-Ser/Thr (y con menor frecuencia Asn-X-Cys y otras secuencias no estándar), donde X puede ser cualquier aminoácido, excepto Pro (Moremen *et al.*, 2012). Dado que sólo alrededor de un 66% de todas las secuencias consenso son glicosiladas (Apweiler *et al.*, 1999), existen otros requisitos que actualmente no se conocen por completo.

La biosíntesis de todos los *N*-glicanos en eucariotas comienza en la cara citoplásmica de la membrana del RE mediante la transferencia de GlcNAc-P a partir de UDP-GlcNAc al lípido precursor dolicol-fosfato (Dol-P) para generar dolicol-pirofosfato-*N*-acetilglucosamina (Dol-P-P-GlcNAc) (Stanley *et al.*, 2009). La *N*-acetilglucosamina se une a las proteínas nacientes en el lumen del RE, pero no como un solo azúcar, sino como un precursor universal previamente ensamblado en el precursor lipídico Dol-P. El precursor universal se compone de 14 unidades de azúcares: 2 de *N*-acetilglucosamina, 9 de manosa y 3 de glucosa. La cadena final de glicanos es transferida a la Asn por el complejo OST. Los *N*-glicanos unidos a las proteínas se remodelan posteriormente en el RE y en el aparato de Golgi por una serie compleja de reacciones catalizadas por glicosidasas y glicosiltransferasas que añaden nuevas unidades de *N*-acetilglucosamina, galactosa, ácido siálico y fucosa en múltiples ramas (Freeze *et al.*, 2012).

Todos los *N*-glicanos comparten un núcleo común de azúcares, Man α 1-6(Man α 1-3)Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc β 1-Asn-X-Ser/Thr, y se clasifican de forma general en tres

grupos: 1) *N*-glicanos con un alto contenido de manosa, 2) *N*-glicanos complejos, en los cuales se unen “antenas” iniciadas por *N*-acetilglucosaminiltransferasas, y 3) *N*-glicanos híbridos, que muestran características de los otros dos tipos (Stanley *et al.*, 2009). La ovoalbúmina fue la primera proteína *N*-glicosilada descrita (Johansen *et al.*, 1961), pero se conocen hoy en día una gran cantidad *N*-glicoproteínas, incluidas proteínas plasmáticas, hormonas, enzimas, receptores de superficie celular e inmunoglobulinas.

1.1.2. O-Glicosilación

La *O*-glicosilación de proteínas implica la unión inicial entre residuos de Ser o Thr de las glicoproteínas y los azúcares Man, Xyl, GalNAc, Fuc, GlcNAc o Glc. Este proceso es también se inicia en el RE, donde tiene lugar la adición del primer azúcar a la cadena proteica por medio de una unión α -glicosídica. Más tarde, numerosas glicosiltransferasas y otras enzimas alargan en el aparato de Golgi la estructura y la modifican mediante sialilación, fucosilación, sulfatación, metilación o acetilación (Stanley, 2011; Zhong & Somers, 2012). Existen diferentes tipos de azúcares *O*-unidos, entre ellos *O*-glicanos de tipo mucina, comúnmente encontrados en la mayoría de glicoproteínas secretadas y unidas a membrana; la *O*-fucosa y la *O*-glucosa, encontradas en el dominio EGF de diferentes proteínas; y la *O*-GlcNAc, en proteínas citosólicas y nucleares (Zhong & Somers, 2012). Los *O*-glicanos se diferencian de los *N*-glicanos en que carecen de un núcleo estructural común. En la generación de las estructuras finales de *O*-glicano están implicadas numerosas enzimas diferentes, siendo aquellas muy variables en su tamaño y composición.

Los *O*-glicanos de tipo mucina son los más ubicuos, y exhiben un amplio grado de variación, tanto en los tipos de núcleo estructural que presentan, como en las extensiones de las cadenas de azúcares. En este tipo de glicanos, el primer residuo de la cadena de carbohidratos es GalNAc, que se une covalentemente mediante un enlace α al grupo hidroxilo de Ser o Thr. El residuo GalNAc se puede extender con Gal, GlcNAc, Fuc o Sia, pero nunca con Man. Este segundo azúcar, y su tipo de unión al primer monosacárido, permiten la clasificación de los *O*-glicanos en 8 diferentes núcleos

estructurales. Las glicoproteínas con este tipo de *O*-glicanos poseen un dominio rico en repeticiones de Ser-Thr-Pro (Corfield & Berry, 2015; Peter-Katalinić, 2006).

La *O*-GlcNAcilación, otra forma especializada de *O*-glicosilación, posee una única molécula de GlcNAc unida a la serina o treonina, y se da en proteínas citoplásmicas y nucleares. Este tipo de *O*-glicoproteínas es importante en la transducción de señales, y frecuentemente compite con la fosforilación de proteínas en el mismo sitio o sitios cercanos, y de este modo interactúa en la señalización celular (Schedin-Weiss *et al.*, 2014). Existen otros tipos de *O*-glicanos, y aunque estos pueden no ser tan abundantes ni tan ampliamente distribuidos como las mucinas, todos ellos tienen relevancia biológica significativa.

1.1.2.1. *O*-Manosilación

La *O*-manosilación fue descubierta en levaduras y otros hongos, en los cuales la mayoría de las proteínas secretadas y de la pared celular se encuentran modificadas por *O*-manosa (Lommel & Strahl, 2009). La síntesis de los *O*-manosilglicanos comienza en el RE, donde ocurre el primer paso catalizado por las enzimas llamadas proteína *O*-manosiltransferasas (PMTs), las cuales transfieren manosa desde el sustrato donador dolicol-fosfato-D-manosa (Dol-P-Man) a los residuos de Ser/Thr de las proteínas aceptoras (Figura 1.2). En las levaduras existen al menos 6 PMTs agrupadas en tres subfamilias, PMT1, PMT2 y PMT4 (Nakamura *et al.*, 2010), mientras que en los mamíferos este proceso es llevado a cabo por el heterodímero formado por las proteína *O*-manosiltransferasas 1 (POMT1) y 2 (POMT2) (Akasaka-Manyá *et al.*, 2006; Jurado *et al.*, 1999; Willer *et al.*, 2002).

La extensión de la *O*-manosa continúa en el aparato de Golgi, donde diferentes enzimas se encargan de completar las cadenas de carbohidratos. En *S. cerevisiae* tres manosiltransferasas de la familia KTR catalizan la adición paso a paso de la primera y segunda manosa, y los siguientes residuos de manosa son añadidos por miembros de la familia MNN1, que residen en la región medial- y trans-Golgi (Lommel & Strahl, 2009).

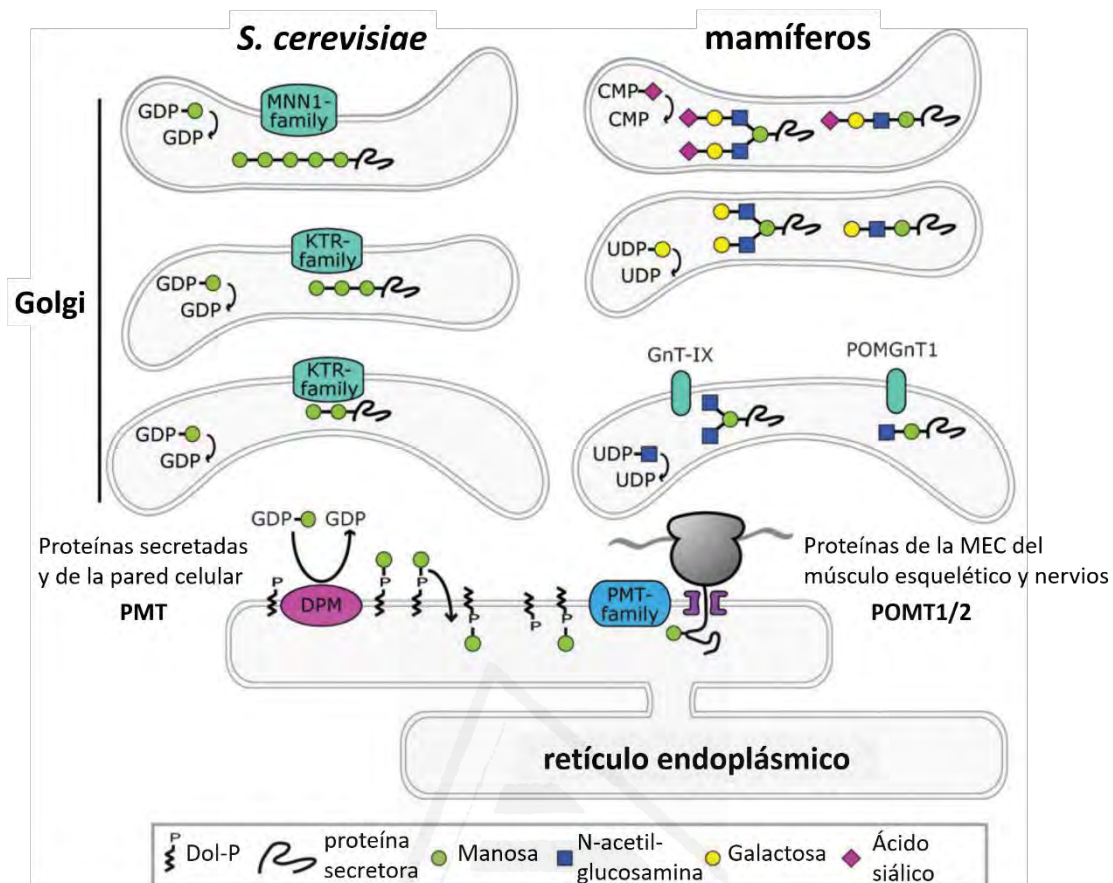


Figura 1.2. Esquema de la vía de O-manosilación en levaduras y mamíferos. La Dol-P-Man es sintetizada en la cara citosólica de la membrana del RE y se transloca al lumen. La manosa es transferida a las proteínas que entran en la vía secretora por miembros de la familia de proteína manosiltransferasas (PMTs). La diversificación ocurre en el aparato de Golgi, donde se produce el alargamiento de las cadenas de azúcares. Figura modificada de [Lommel & Strahl, 2009](#).

En mamíferos, las estructuras de O-manosilglicanos se clasifican naturalmente en tres categorías basadas en el tipo de unión del residuo de N-acetilglucosamina (GlcNAc) que se añade a la manosa inicial. Estas estructuras (M1-M3) se ven extendidas en el Golgi mediante la adición de Gal, GalNAc, Sia, Fuc, Xyl o GlcA ([Praisman & Wells, 2014](#)). Hasta la fecha, se han identificado y caracterizado al menos 23 estructuras distintas de O-manosilglicanos, que muestran una amplia variabilidad en los tejidos y células en que se encuentran, reflejando la importancia de sus diferencias en la función que desempeñan ([Praisman & Wells, 2014](#)).

Los O-manosilglicanos representan aproximadamente un 30% de todos los O-glicanos presentes en el tejido cerebral de mamíferos ([Chai et al., 1999](#); [Stalner et](#)

al., 2011a). Por tanto, es comprensible que dichas estructuras sean esenciales para el desarrollo normal del tejido nervioso, el cual depende de la migración neuronal (Beltrán-Valero de Bernabé *et al.*, 2002; Yoshida *et al.*, 2001), la correcta guía axonal (Wright *et al.*, 2012) y la remielinización de las neuronas (Kanekiyo *et al.*, 2013).

La O-manosilación en mamíferos fue descubierta en los años 1970's en el condroitín sulfato del cerebro de rata (Finne *et al.*, 1979). Muchos años después se describieron nuevos O-manosilglicanos en diferentes proteínas, como las pronasas estables (Chai *et al.*, 1999) y el α -DG aislado de nervio periférico bovino (Chiba *et al.*, 1997), del cerebro de oveja (Smalheiser *et al.*, 1998) y del músculo esquelético de conejo (Sasaki *et al.*, 1998), así como la IgG2 expresada en células CHO (Martínez *et al.*, 2007), el receptor neuronal específico RPTP β (Abbott *et al.*, 2008), la proteína CD24 en cerebro de ratón (Bleckmann *et al.*, 2009), el fosfacán (RPTP ζ) (Dwyer *et al.*, 2012), la neurofascina 186 (Pacharra *et al.*, 2012), y más recientemente en 4 lecticanos (agregacán, brevicán, neurocán y versicán) (Pacharra *et al.*, 2013), 37 cadherinas y 6 plexinas (Vester-Christensen *et al.*, 2013).

Aunque la exploración mediante nuevas técnicas de espectrometría de masas ha permitido la identificación de proteínas O-manosiladas principalmente en el cerebro de mamíferos, la única proteína bien caracterizada identificada como O-manosilada es el α -DG. El análisis glicómico del cerebro de un ratón "knockout" condicional para el distroglicano demostró que la prevalencia de las estructuras de O-manosilglicanos era indistinguible de la observada en las proteínas del cerebro del ratón silvestre (Stalnaker *et al.*, 2011a). Por lo tanto, la identificación y caracterización del proteoma O-manosilado es actualmente un reto importante en este campo de investigación.

1.2. α -Distroglicano y su glicosilación

Como se ha descrito anteriormente, el distroglicano (DG) es una de las escasas proteínas O-manosiladas que ha sido estudiada con detalle. Esta glicoproteína fue aislada por primera vez del músculo esquelético de conejo, como componente del llamado complejo distrofina-glicoproteína (DGC) (Ervasti & Campbell, 1991). El DG está compuesto por dos subunidades: alfa (α -DG) y beta (β -DG), ambas codificadas por un

solo gen, *DAG1* (OMIM 128239), que tras ser traducido en un único polipéptido es escindido postraduccionalmente (Ibraghimov-Beskrovnaya *et al.*, 1992). El β -DG atraviesa la membrana celular, se asocia intracelularmente con la proteína distrofina y extracelularmente se une de forma no covalente a la subunidad α (Barresi & Campbell, 2006) (Figura 2.3). El α -DG a su vez se une a proteínas de la matriz extracelular (MEC), como son la laminina (Ervasti & Campbell, 1993), la agrina (Sugiyama *et al.*, 1994), el perlecán (Talts *et al.*, 1999), la neurexina (Sugita *et al.*, 2001) Slit (Wright *et al.*, 2012) y la pikachurina (Sato *et al.*, 2008), esta última exclusiva de la retina.

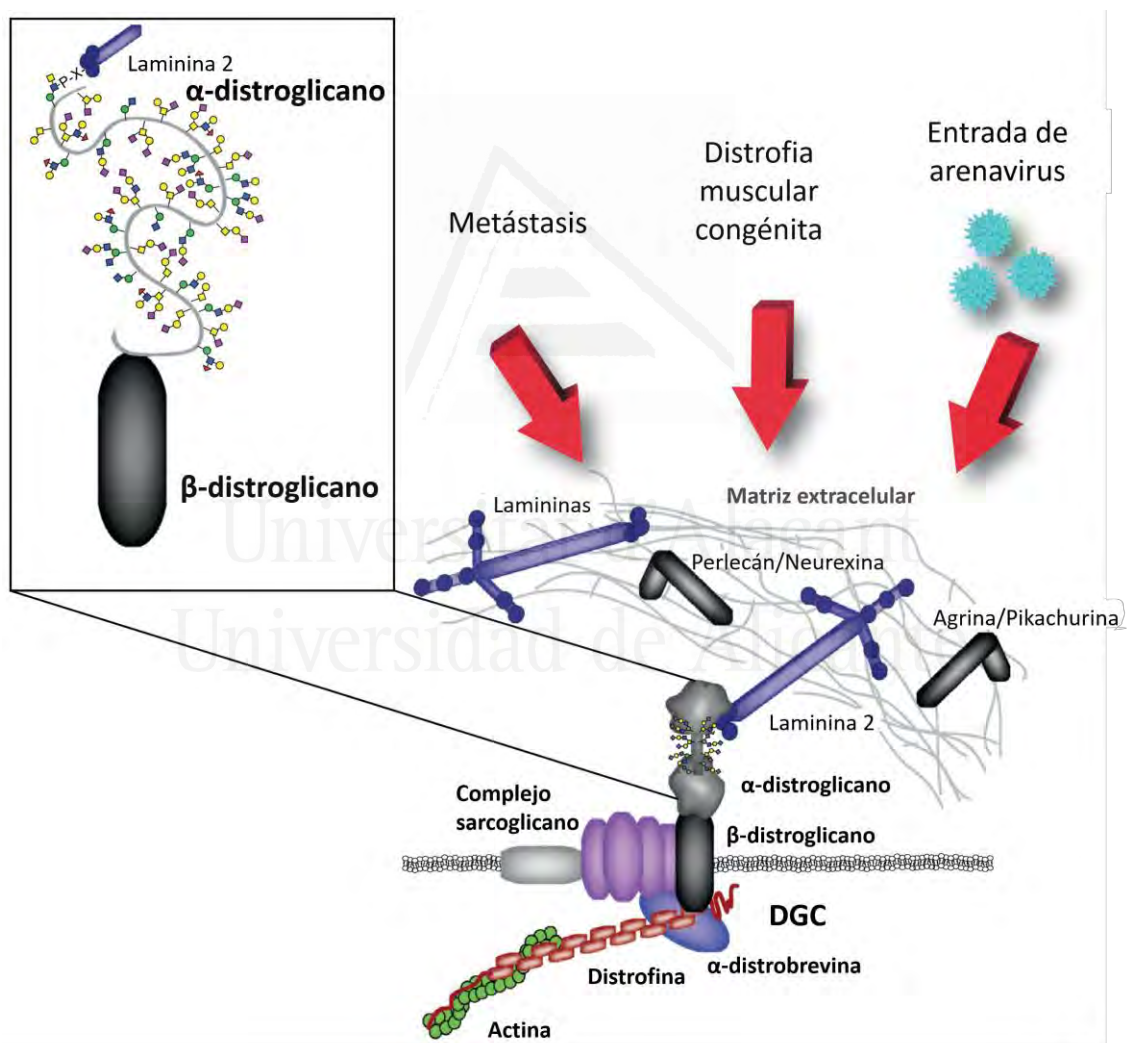


Figura 1.3. Complejo distrofina-glicoproteína (DGC). Se representan de forma esquemática los componentes del DGC, así como los ligandos del α -distroglicano en la MEC, y los del β -distroglicano en el citoplasma. Defectos en la O-manosilación del α -DG están asociados con la metástasis del cáncer, distrofias musculares congénitas y la entrada del arenavirus a las células. Figura modificado de Stalnakier *et al.*, 2011b.

El α -dístroglicano es una proteína cuyos dominios N- y C-terminal están separados por una región de tipo mucina rica en residuos de Pro, Ser y Thr altamente O-glicosilada (Sgambato & Brancaccio, 2005). Sus primeros 29 aminoácidos presentan un carácter hidrofóbico y constituyen un péptido señal, el cual determina el destino y la eficiencia de secreción de la proteína (Barresi & Campbell, 2006). Aunque el tamaño molecular aproximado del α -DG a partir de su secuencia de aas es de 72 kDa, la masa molecular detectada mediante Western blotting es de 120 kDa en el cerebro, músculo liso y nervio periférico, y de 156 kDa en el músculo esquelético (Durbeej *et al.*, 1998; Ibraghimov-Beskrovnaya *et al.*, 1993, 1992). Estas variaciones de tamaño se deben a diferencias en el grado de O-glicosilación de su dominio central de tipo mucina.

El α -DG debe estar fuertemente glicosilado para su correcto funcionamiento (Martin, 2003) como receptor en la superficie de las células del sistema nervioso y las fibras musculares (Barresi & Campbell, 2006), en la adhesión celular (Bello *et al.*, 2015; Matsumura *et al.*, 1997), en la estructura y función del sistema nervioso central (Moore *et al.*, 2002), y en la mielinización y en la arquitectura nodal de los nervios periféricos (Cohn *et al.*, 2002; Saito *et al.*, 2007). Además de sus funciones en el músculo esquelético y en el sistema nervioso, el α -DG también actúa como receptor para algunos agentes infecciosos, como es el caso del virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV), el virus de la fiebre de Lassa (LFV) o la bacteria *Mycobacterium leprae* en las células de Schwann (Winder, 2001).

El análisis mediante espectrometría de masas del α -DG, ha demostrado que los dominios N- y C-terminal de esta proteína contienen abundantes sitios de N-glicosilación, y que su dominio de mucina cuenta con al menos 21 sitios de O-glicosilación (Nilsson *et al.*, 2010; Stalnaker *et al.*, 2010). La eliminación de las cadenas de N-glicanos del α -DG no suprime la capacidad de unión de este a sus ligandos en la MEC, a diferencia de lo que ocurre con la pérdida de los O-manosilglicanos unidos a esta proteína. La estructura básica de los O-glicanos del α -DG es una mezcla de polisacáridos que comienzan por cadenas de O-manosa del tipo Sia α 2-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-2Man-O-Ser/Thr, o bien que comienzan por O-GalNAc, del tipo Gal β 1-3GalNAc-O-Ser/Thr (Martin, 2003). Además, se ha documentado una nueva estructura repetitiva de un disacárido similar a los glicosaminoglucuronanos, del tipo [Xyl α 1-3GlcA β 1-3] $_n$, que se

encuentra unida al α -DG y a la que se le ha asignado el nombre de “matriglicano” (Yoshida-Moriguchi & Campbell, 2015). Dada la heterogeneidad existente en la serie de O-manosilglicanos unidos al α -DG, éstos se han clasificado en tres grupos según el tipo de unión de la N-acetilglucosamina (GlcNAc) a la O-manosa y se denominan núcleos estructurales (“cores”) M1, M2 y M3 (Figura 1.4) (Yoshida-Moriguchi *et al.*, 2013).

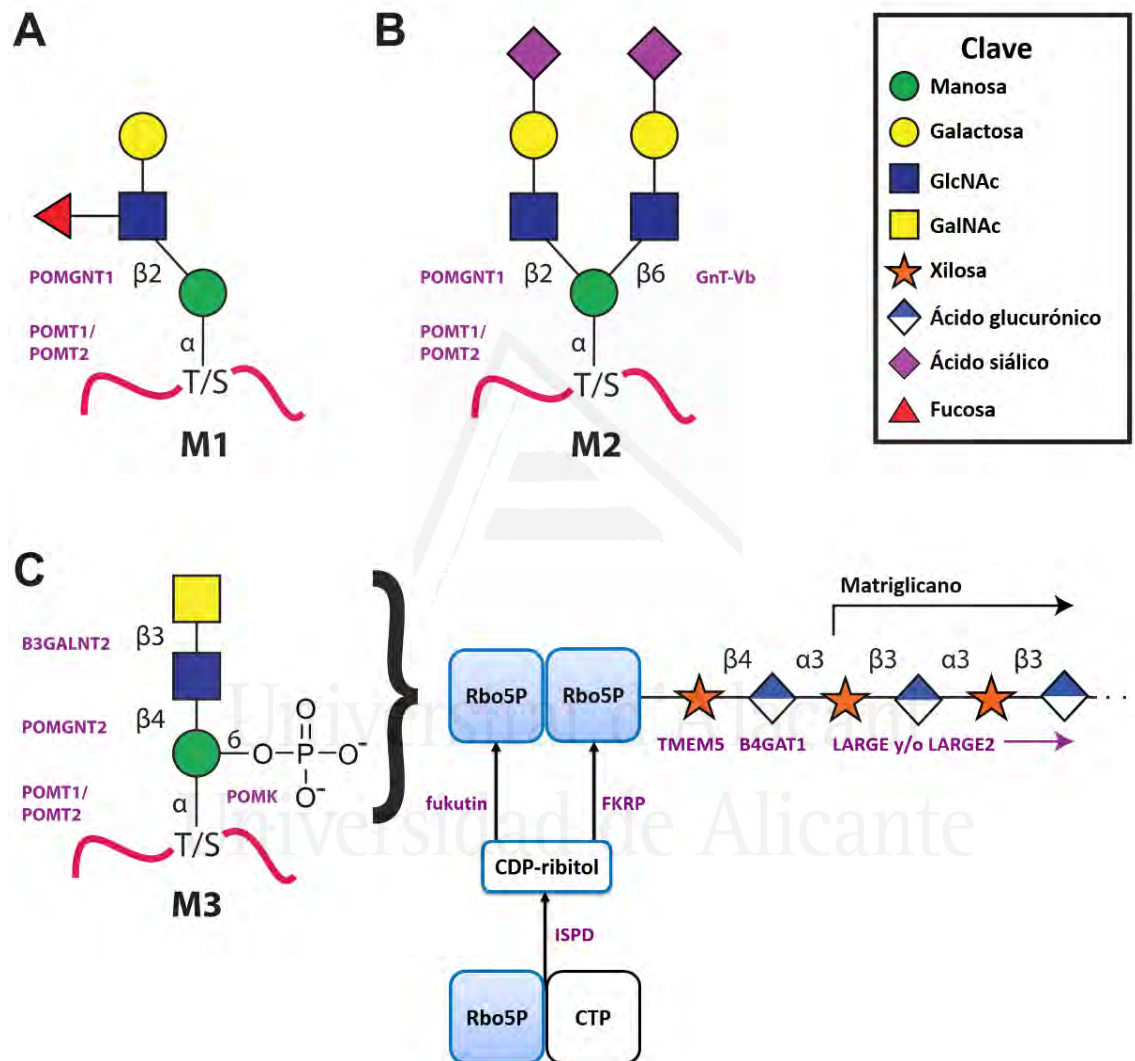


Figura 1.4. O-manosilación del α -DG y enzimas involucradas en el proceso. Tras la adición por POMT1/POMT2 de Man a la Ser/Thr del α -DG, se diferencian las tres estructuras M1-M3. En púrpura aparecen todas las enzimas ya conocidas que participan en la elaboración de cada uno de los núcleos estructurales. Estructura de los O-manosilglicanos de tipo M1. (A), de tipo M2. (B) y de tipo M3. (C) En la síntesis de este último participa la proteína ISPD sintetizando el CDP-ribitol necesario para que las enzimas fukutina y FKRP añadan el ribitol-5-fosfato (Rbo5P). Figura modificada de Praissman *et al.*, 2016.

1.2.1. Núcleos estructurales de *O*-manosilglicano M1 y M2

Los núcleos estructurales M1 y M2 comienzan su síntesis en el RE mediante la acción del heterodímero constituido por las dos *O*-manosiltransferasas de proteínas POMT1 y POMT2, las cuales catalizan la transferencia de una unidad de manosa a residuos de serina o treonina en el dominio de mucina del α -DG (Manya *et al.*, 2004). A continuación, la enzima POMGnT1 actúa en el aparato de Golgi transfiriendo una molécula de *N*-acetilglucosamina (GlcNAc) mediante un enlace β 1-2 a la molécula de manosa previamente unida al α -DG (Yoshida *et al.*, 2001) (Figura 1.4A). El núcleo M2 continúa su extensión en una segunda rama, gracias a la glicosiltransferasa GnT-Vb que adiciona otra molécula de GlcNAc a la manosa mediante un enlace β 1-6 (Figura 1.4B) (Inamori *et al.*, 2004). Estas dos estructuras continúan siendo extendidas en el aparato de Golgi por diferentes galactosaminiltransferasas (GalTs), sialiltransferasas (SiaTs), glucuroniltransferasas (GlcATs), sulfotransferasas (STs) y fucosiltransferasas (FUTs), aunque los detalles de cómo realizan la síntesis de los glicanos no han sido completamente elucidados (Endo, 2015).

1.2.2. Núcleo estructural de *O*-manosilglicano M3

La síntesis del núcleo M3, que se une al dominio de mucina del α -DG al igual que las otras dos estructuras antes descritas, se inicia mediante la adición de manosa por la actividad de las proteínas POMT1 y POMT2 en el RE (Yoshida-Moriguchi & Campbell, 2015). A continuación y en el mismo retículo endoplásmico actúan: 1) la enzima β 1,4-*N*-acetilglucosaminiltransferasa 2 (POMGnT2), añadiendo una molécula de GlcNAc mediante un enlace β 1-4 (Manzini *et al.*, 2012); 2) la enzima B3GALnT2 (β 1,3-*N*-acetilgalactosaminiltransferasa 2), extendiendo la cadena glicosídica con una unidad de GalNAc (*N*-acetilgalactosamina); y 3) la proteína *O*-manosa quinasa (POMK) fosforilando la posición 6 de la manosa (Yoshida-Moriguchi *et al.*, 2013). A partir de este punto el α -DG es transferido al aparato de Golgi (Figura 1.4C), donde las enzimas ISPD, fukutina, FKR, B4GAT1 y LARGE extienden el núcleo M3 mediante la transferencia de diferentes azúcares. Tras la fosforilación de la posición 6 de la manosa, la proteína ISPD, que es una CDP-Ribitol-sintetasa, utiliza ribitol-5-fosfato (Rbo5P) y citidina trifosfato

(CTP) para generar citidina-difosfato-ribitol (CDP-Rbo), que constituye el sustrato de las siguientes enzimas en la ruta de elaboración de la estructura glicosídica M3: fukutina y FKR (Kanagawa *et al.*, 2016). Estas utilizan CDP-Rbo como donador, transfiriendo Rbo5P de forma secuencial al núcleo M3 fosforilado en Man (Kanagawa *et al.*, 2016). Finalmente, la enzima LARGE y/o LARGE2 extiende el disacárido Xyl β GlcA β 1-4 iniciado por las proteínas TMEM5 (UDP-xilosiltransferasa) (Praisman *et al.*, 2016) y B4GAT1 (glucuroniltransferasa) (Willer *et al.*, 2014), transfiriendo unidades repetidas de xilosa y ácido glucurónico que producen un heteropolisacárido llamado “matriglicano” (Figura 1.4C) (Inamori *et al.*, 2012; Willer *et al.*, 2014). La presencia, y más aún el número de repeticiones de este disacárido, son esenciales para la unión del α -DG a sus ligandos (Goddeeris *et al.*, 2013).

1.3. Defectos en la O-glicosilación del α -DG: MDDGs

Los defectos en las proteínas involucradas en la síntesis de los O-manosilglicanos que se unen al α -DG conllevan la aparición de las llamadas “distrofias musculares-distroglicanopatías” (MDDGs), hasta hace poco conocidas como distroglicanopatías (DGPs). Estas distrofias son un grupo de enfermedades genéticamente heterogéneo que se heredan generalmente de forma autosómica recesiva y cuyos síntomas conllevan un amplio espectro de manifestaciones clínicas que afectan principalmente el músculo esquelético y el sistema nervioso central, incluidos el cerebro y la retina (Endo, 2015; Muntoni *et al.*, 2007). Se ha sugerido que estas patologías forman parte del espectro fenotípico de una única enfermedad, con diferente grado de severidad en función del gen afectado y de la mutación concreta (Muntoni *et al.*, 2011).

Hasta la fecha se conocen 18 genes cuyas mutaciones provocan, directa o indirectamente, hipoglicosilación del α -DG y por ello afectan a la función de este como receptor de los ligandos de la matriz extracelular (Martin, 2007) (Tabla 1.1). Las DGPs más relevantes, en orden decreciente de severidad son: el síndrome de Walker-Warburg (WWS; OMIM 236670), la enfermedad de músculo-ojo cerebro (MEB; OMIM 253280), la distrofia muscular congénita de Fukuyama (FCMD; OMIM 253800), las distrofias

musculares congénitas moderadas (CMDs) y las distrofias musculares de cinturas (LGMDs).

Gen	Abreviatura	Proteína	Nombre completo	OMIM	Función	Variantes de MDDG	Referencia (función)
POMT1	POMT1	Proteína O-manosiltransferasa 1		607423	Glicosiltransferasa	MDDGA1, B1, C1	Manya et al., 2004
POMT2	POMT2	Proteína O-manosiltransferasa 2		607439	Glicosiltransferasa	MDDGA2, B2, C2	Manya et al., 2004
POMGN1	POMGN1	Proteína O-manosa β 1,2-N-acetilglucosaminiltransferasa 1		606822	Glicosiltransferasa	MDDGA3, B3, C3	Takahashi et al., 2001
FKTN	FKTN	Fukutina		607440	Ribitol 5-fosfato sintetasa	MDDGA4, B4, C4	Kanagawa et al., 2016
FKRP	FKRP	Proteína relacionada con fukutina		606596	Ribitol 5-fosfato sintetasa	MDDGA5, B5, C5	Kanagawa et al., 2016
POMGN2	POMGN2	Proteína O-manosa β 1,4-N-acetilglucosaminiltransferasa 2		614828	Glicosiltransferasa	MDDGA8	Yoshida-Moriguchi et al., 2013
LARGE	LARGE	Proteína similar a glicosiltransferasa		603590	Glicosiltransferasa	MDDGA6, B6	Inamori et al., 2012
ISPD	ISPD	Proteína con dominio isoprenoide sintasa		614631	CDP-ribitol sintetasa	MDDGA7, C7	Kanagawa et al., 2016
TMEM5	TMEM5	Proteína transmembrana 5		605862	UDP-xilosiltransferasa	MDDGA10	Praissman et al., 2016
B3GALNT2	β 3GalNT2	β -1,3-N-acetilgalactosaminiltransferasa 2		610194	Glicosiltransferasa	MDDGA11	Hiruma et al., 2004
POMK	POMK	Proteína O-manosa quinasa		615247	Glicosiltransferasa	MDDGA12	Yoshida-Moriguchi et al., 2013
B4GAT1	β 4GAT1	β -1,4-N-glucuroniltransferasa 1		605517	Glicosiltransferasa	MDDGA13	Praissman et al., 2014
GMPPB	GMPPB	GDP-manosa pirofosforilasa B		615320	Transferasa	MDDGA14, B14, C14	Ning and Elbein, 2000
DPM1	DPM1	Dolicol-fosfato manosiltransferasa subunidad 1		603503	Transferasa	CDG1E	Maeda et al., 2000
DPM2	DPM2	Dolicol-fosfato manosiltransferasa subunidad 2		603564	Transferasa	CDG1U	Maeda et al., 2000
DPM3	DPM3	Dolicol-fosfato manosiltransferasa subunidad 3		605951	Transferasa	CDG1O	Maeda et al., 2000
DOLK	DOLK	Dolicol quinasa		610746	Quinasa	CDG1M	Fernandez et al., 2002
DAG1*	DG	Distroglicano		128239		MDDGA9	Yamada et al., 1994

Tabla 1.1. Genes y proteínas asociadas a distroglicanopatías. Información sobre las proteínas codificadas por los genes (nomenclatura HGNC) asociados a DGPs, así como el número de registro de la base de datos OMIM, y la variedad genética de distrofia muscular-distroglicanopatía asociada. Esta se denota como MDDG, seguida de una letra (A, B o C, de mayor a menor gravedad) y un número (que hace referencia al gen responsable de esa variedad). Se indican asimismo la función de cada una de las proteínas producto de estos genes (nomenclatura UniProtKB) y la referencia más adecuada en relación al descubrimiento de dicha función. *Mutaciones en todos los genes causan distroglicanopatías secundarias, excepto las mutaciones en el gen *DAG1*, que se conocen como distroglicanopatías primarias.

Numerosos estudios genéticos de estos trastornos han puesto de manifiesto que la gravedad clínica no se relaciona necesariamente con el genotipo. Por ejemplo, los defectos en el gen *FKTN*, que fue descubierto originalmente en pacientes con FCMD, también pueden causar WWS o un fenotipo de LGMD leve (LGMD2M) (Yoshida-Moriguchi & Campbell, 2015). También se ha sugerido que la gravedad del fenotipo en determinadas MDDGs se correlaciona inversamente con el grado de glicosilación funcional del α -DG (Kanagawa *et al.*, 2009; Lommel *et al.*, 2010; Stevens *et al.*, 2013), aunque no es necesariamente el caso en pacientes con mutaciones en los genes *FKTN* o *FKRP* (Jimenez-Mallebrera *et al.*, 2009).

1.3.1. Síndrome de Walker-Warburg (WWS)

El WWS se conoce como la MDDG más grave. Se caracteriza por desarrollarse en edades muy tempranas, en el estado prenatal o justo después del nacimiento. Los pacientes suelen tener graves anomalías estructurales del cerebro como agiria (ausencia de circunvoluciones cerebrales), lissencefalia severa (cerebro liso), hidrocefalia (acumulación de líquido cefalorraquídeo en el cerebro) y ausencia total o parcial del cuerpo calloso (Beltrán-Valero de Bernabé *et al.*, 2002). También conlleva anomalías oculares y de la retina, como son cataratas congénitas, microftalmia, displasia, atrofia y desprendimiento de la retina. Los pacientes con WWS presentan una esperanza de vida muy corta (Godfrey *et al.*, 2011). Las mutaciones asociadas al WWS se presentan principalmente en los genes *POMT1* (Beltrán-Valero de Bernabé *et al.*, 2002; Bouchet *et al.*, 2007; Currier *et al.*, 2005; Godfrey *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2004; Mercuri *et al.*, 2009; van Reeuwijk *et al.*, 2006), *POMT2* (Lommel *et al.*, 2008; van Reeuwijk, 2005), *POMGNT1* (Godfrey *et al.*, 2011), *POMGNT2* (Manzini *et al.*, 2012), *FKTN* (Beltrán-Valero de Bernabé, 2003; Cotarelo *et al.*, 2008; Godfrey *et al.*, 2007; Silan *et al.*, 2003), *FKRP* (Beltrán-Valero de Bernabé, 2004) y *LARGE* (van Reeuwijk *et al.*, 2007). Sin embargo, existe un porcentaje elevado de casos de WWS, aproximadamente el 60%, en los que se desconoce el gen causante.

1.3.2. Enfermedad de músculo-ojo-cerebro (MEB)

La MEB fue descrita por primera vez en Finlandia ([Raitta et al., 1978](#); [Santavuori et al., 1989](#)), donde presenta una incidencia de 1/35.000 nacidos. Esta enfermedad muestra unos síntomas clínicos muy parecidos al WWS, pero con menos severidad. Se caracteriza así, por presentar distrofia muscular congénita, anomalías estructurales del ojo y lisencefalia, pero los pacientes que la padecen poseen una esperanza de vida de 6 a 16 años ([Dobson et al., 2013](#)). El primer gen que se relacionó con MEB fue *POMGNT1*, cuyas mutaciones causan la mayoría de los casos de esta enfermedad ([Yoshida et al., 2001](#)). No obstante, se han descubierto casos de pacientes con MEB que presentaban mutaciones en los genes *POMT1*, *POMT2*, *FKRP* o *LARGE* ([Bouchet-Séraphin et al., 2015](#); [Mercuri et al., 2009](#)).

1.3.3. Distrofia muscular congénita de Fukuyama (FCMD)

La FCMD puede mostrar un rango de síntomas muy variados, presentando características clásicas de WWS, MEB e incluso LGMD. Sin embargo, en la FCMD la característica más importante es que se suele encontrar mutado el gen *FKTN*, el cual codifica la proteína fukutina. Este trastorno es muy frecuente, aunque no exclusivo, en la población japonesa ([Dobson et al., 2013](#)) y está causado por una mutación ancestral fundadora derivada de la inserción de un retrotransposón de 3 kb en la región 3' no traducida del gen *FKTN* ([Bouchet-Séraphin et al., 2015](#)).

1.3.4. Distrofias musculares congénitas moderadas (MDDGB)

Las distrofias musculares congénitas moderadas (tipo B; MDDGB), representan el rango intermedio del espectro de las DGPs. Estos trastornos son menos severos que las MDDG con anomalías cerebrales y oculares (tipo A; MDDGA), previamente designadas como WWS, MEB y FCMD, y más graves que las distrofias musculares de cinturas (LGMD; MDDGC) ([Godfrey et al., 2007](#)). Son enfermedades musculares de herencia autosómica recesiva en las que se puede presentar, o no retraso mental ([Bertini et al., 2011](#)). Las anomalías musculares en estos pacientes varían desde miopatía hasta distrofia,

dependiendo de la edad a la cual es realizada la biopsia muscular (Sparks *et al.*, 1993). Hasta la fecha se han identificado 7 subtipos de MDDGB, que han sido numeradas según el gen asociado: MDDGB1 (Omim 613155), causada por la mutación en el gen *POMT1*; MDDGB2 (Omim 613156), causada por la mutación en el gen *POMT2*; MDDGB3 (Omim 613151), causada por la mutación en el gen *POMGNT1*; MDDGB4 (Omim 613152), causada por la mutación en el gen *FKTN*; MDDGB5 (Omim 616612), causada por la mutación en el gen *FKRP*; MDDGB6 (Omim 608840), causada por la mutación en el gen *LARGE*; y MDDGB14 (Omim 615351), causada por la mutación en el gen *GMPPB*.

1.3.5. Distrofias musculares de cinturas (LGMD)

Las LGMDs son un grupo muy heterogéneo de distrofias musculares leves de manifestación tardía, que afectan principalmente a la cintura pélvica y escapular. Las LGMDs asociadas a defectos en la glicosilación del DG se clasifican según el gen responsable en: LGMD de tipo 2I (MDDGC5; Omim 607155), caracterizadas molecularmente en el año 2001, y causadas por mutaciones en el gen *FKRP* (Brockington *et al.*, 2001); LGMD de tipo 2K (MDDGC1; Omim 609308) causadas por mutaciones en el gen *POMT1* (Bello *et al.*, 2012; Lommel *et al.*, 2010) y cursan con una leve afectación muscular y ausencia de alteraciones estructurales cerebrales y oculares (Godfrey *et al.*, 2007); LGMD de tipo 2M (MDDGC4; Omim 611588) causadas por mutaciones en el gen *FKTN* y cursan sin afectaciones estructurales ni funcionales del cerebro (Godfrey *et al.*, 2007); LGMD de tipo 2N (MDDGC2; Omim 613158) con mutaciones en el gen *POMT2*; LGMD de tipo 2O (MDDGC3; Omim 613157) causadas por mutaciones en el gen *POMGNT1*; LGMD de tipo 2P (MDDGC9 Omim 613818) con mutaciones en el gen *DAG1*; LGMD de tipo 2T (MDDGC14 Omim 615352) causadas por mutaciones en el gen *GMPPB* (Mitsuhashi & Kang, 2012), y la más recientemente clasificada, LGMD de tipo 2U (MDDGC7; Omim 616052) en las que se encuentra mutado el gen *ISPD* (Tasca *et al.*, 2013).

1.4. Efectos de las DGPs en la retina

1.4.1. Estructura de la retina

El ojo es un órgano muy sofisticado y altamente especializado en el desarrollo de sus funciones. Constituye un “instrumento óptico” que capta, transmite y enfoca los estímulos luminosos hacia la retina neural. Esta última es una fina estructura de aprox. 0.2 mm de espesor, que deriva del neuroectodermo y en el adulto forma parte del sistema nervioso central (SNC), constituyendo el primer tejido nervioso que procesa la información visual. Básicamente, se trata de una capa de tejido neuronal receptora localizada en el interior del globo ocular y en la cual se realiza la fototransducción, es decir, la transformación de las señales luminosas en impulsos eléctricos, constituyendo así el lugar donde se inicia la elaboración de la información visual (Kolb *et al.*, 2016).

La retina humana se divide en retina periférica y central. En la periférica predominan los fotorreceptores llamados bastones, encargados de la visión escotópica, mientras que en la retina central son mayoritarios los fotorreceptores llamados conos, encargados de proporcionar la información del color. En esta región de la retina se encuentra la mácula, donde el eje visual cruza la retina. A su vez, en el centro de este se forma una depresión que constituye la fovea, compuesta únicamente por conos (Figura 1.5A), a una densidad promedio de aproximadamente 147.000 conos/mm² en la fovea humana, y en la retina periférica de 4.000-6.000 conos/mm² (Shroff, 2011). En consecuencia, la fovea es la región de la retina que proporciona una mayor agudeza visual.

La retina está constituida por una porción neurosensorial (retina neural) y por el epitelio pigmentario de la retina (EPR). El epitelio pigmentario es crucial para la captura, el almacenamiento y la movilización de la vitamina A, la cual participa en el ciclo visual, llevando a cabo la fagocitosis de los segmentos externos (SE) de los fotorreceptores. En mamíferos la retina se divide en 8 capas que contienen una red especializada de aprox. 55 subtipos celulares, pertenecientes a 6 tipos neuronales principales: fotorreceptores (conos y bastones), células horizontales, bipolares, amacrinas y ganglionares (Figura 1.5B). Existen además 3 tipos de células gliales: astrocitos, microglía y células de Müller,

siendo estas últimas exclusivas de la retina (Figura 1.5B) (Athanasίου *et al.*, 2013; Kolb *et al.*, 2016).

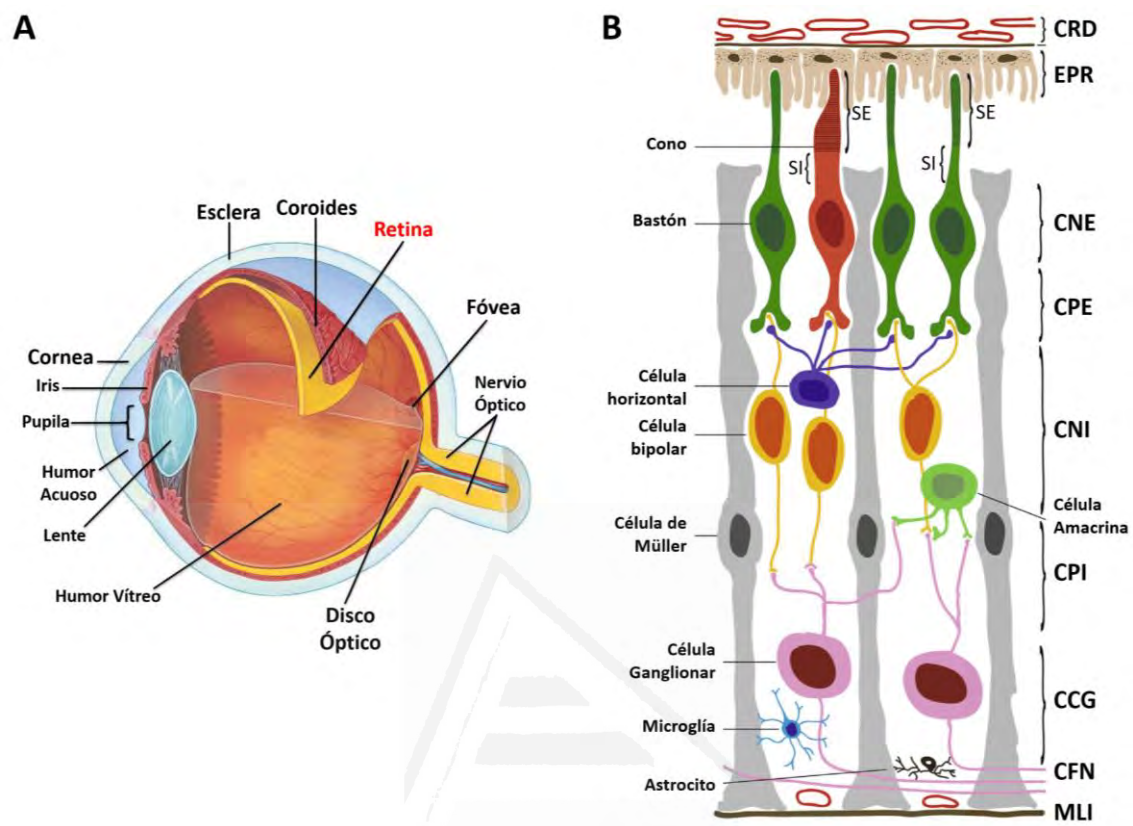


Figura 1.5. Estructura del globo ocular y de la retina humana. (A) Principales estructuras que constituyen el ojo humano. **(B)** Distribución de las capas de la retina. Abreviaturas: CRD, coroides; EPR, epitelio pigmentario de la retina; SE, segmentos externos; SI, segmentos internos; CNE, capa nuclear externa; CPE, capa plexiforme externa; CNI, capa nuclear interna; CPI, capa plexiforme interna; CCG, capa de células ganglionares; CFN, capa de fibras nerviosas; MLI, membrana limitante interna. Figura modificada de Athanasίου *et al.*, 2013 y Chader & Taylor, 2013.

La retina neural está constituida principalmente por 3 capas que contienen los cuerpos neuronales y 2 de interacciones sinápticas, denominadas capas plexiformes. La capa nuclear externa (CNE) contiene los cuerpos celulares de los conos y bastones. La capa nuclear interna (CNI) está constituida por los núcleos de las células horizontales, bipolares y amacrinas, además de los núcleos de las células de Müller, y finalmente la capa de células ganglionares (CCG) que contiene los núcleos de este tipo celular. Entre estas 3 capas se localizan las 2 capas plexiformes, donde se realizan la mayor parte de los contactos sinápticos de la retina (Dowling, 1987; Kolb *et al.*, 2016; Ramón y Cajal, 1892). También se han detallado unas estructuras de la retina denominadas membranas limitantes externa e interna. La membrana limitante externa (MLE), no es una

membrana en sí misma, sino una serie de uniones intercelulares tipo zónula adherente formadas entre las células de Müller y los fotorreceptores. La membrana limitante interna (MLI) define el límite entre la retina y el humor vítreo, está formada por las terminaciones (pies) de las células de Müller y se encuentra cubierta en su cara al vítreo, por un material de mucopolisacáridos que forman una verdadera membrana basal (Kolb *et al.*, 2016).

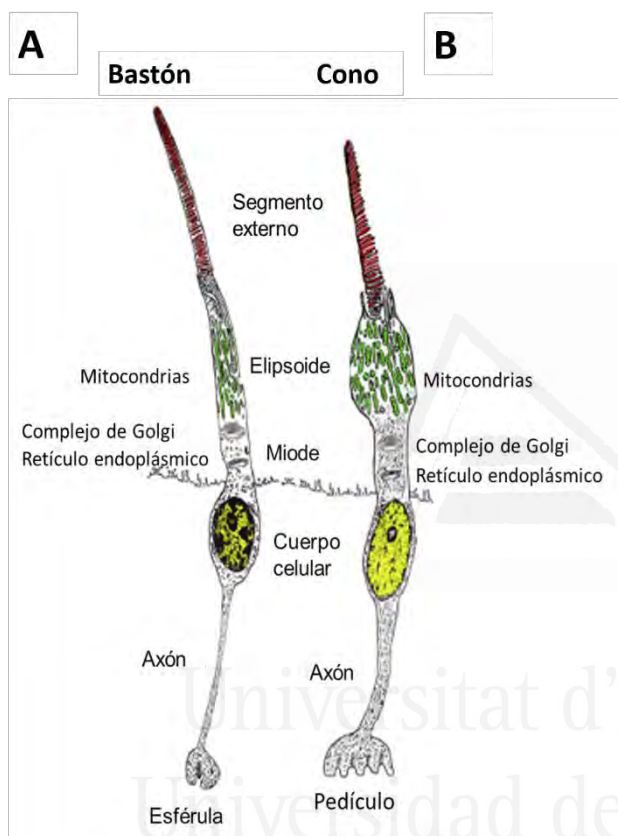


Figura 1.6. Diagrama ilustrativo de la organización básica de un cono y un bastón humanos. Se distinguen el segmento externo, el segmento interno (dividido en elipsoide y mioide), el cuerpo celular, el axón y el terminal sináptico: esférula en el caso de los bastones (A), y pedículo en el caso de los conos (B). Figura modificada de Cuenca *et al.*, 2014.

Las células fotorreceptoras contienen los pigmentos visuales, localizados en discos membranosos aplanados que forman los SE. La maquinaria biosintética de estas células se encuentra en los segmentos internos (SI), en los cuales se pueden diferenciar dos zonas: el elipsoide, con abundantes mitocondrias, y el mioide, que contiene el aparato de Golgi y el retículo endoplásmico (Young, 1976) (Figura 1.6). Cuando un estímulo visual, en forma de luz, llega a los pigmentos fotosensibles de los fotorreceptores, estas células se excitan y transmiten la señal recibida, a través de las células bipolares, hasta las células ganglionares. La transmisión de la señal se realiza mediante las conexiones sinápticas que se establecen en la capa plexiforme externa (CPE), en la cual contactan los terminales axónicos de los fotorreceptores con las

dendritas de las células bipolares y horizontales, así como en la capa plexiforme interna (CPI), donde las células bipolares y amacrinas realizan sinapsis con las células ganglionares, que a su vez transmiten las señales visuales al cerebro (Kolb *et al.*, 2016).

La retina recibe los estímulos luminosos, los integra y los convierte en impulsos eléctricos que envía a través del nervio óptico hasta el mesencéfalo. Allí, parte de la información recibida es utilizada para controlar el movimiento ocular, el tamaño de la pupila y el ritmo circadiano, y otra parte continúa hacia el núcleo geniculado lateral, en el tálamo, desde donde se transmite hasta la corteza visual (Sung & Chuang, 2010).

1.4.2. El DG en la retina

El DG, diferentes formas de distrofina y otros componentes del DGC del músculo esquelético, se expresan ampliamente en el SNC, incluyendo la retina. En este tejido el DG se concentra en la CPE, donde se establecen la sinapsis entre los fotorreceptores y sus células postsinápticas: las células bipolares y las células horizontales; en los pies terminales de las células de Müller, donde se forma la membrana limitante interna (MLI); y alrededor de los vasos sanguíneos (Figura 1.7A) (Daloz *et al.*, 2001; Montanaro *et al.*, 1995). La correcta glicosilación del DG en la CPE es esencial para la formación y función de las llamadas sinapsis en cinta, en las cuales el DG establece contacto con uno de sus principales ligandos en la retina, la pikachurina (Kanagawa *et al.*, 2010; Sato *et al.*, 2008). Por otra parte, el DG presente en las células de Müller contribuye al anclaje de la retina al vítreo, gracias a su interacción con la laminina y otros ligandos presentes en la MLI (Schmitz & Drenckhahn, 1997a).

En mamíferos, la cintilla sináptica constituye una estructura similar a una placa que se extiende desde el sitio de liberación de neurotransmisores en el citoplasma de las células presinápticas. Las esférulas de los bastones contienen una sola cintilla, la cual se dobla alrededor de 4 invaginaciones profundas donde se insertan los elementos postsinápticos (dendritas de células bipolares y horizontales). El terminal de los conos (pedículo) contiene varias cintillas sinápticas con zonas activas más cortas que contactan con los elementos postsinápticos (Mercer & Thoreson, 2011; Tom Dieck & Brandstätter,

2006). El DG juega un papel esencial en el establecimiento estructural y fisiológico de las conexiones entre los terminales de los fotorreceptores y sus células postsinápticas. En la cintilla sináptica el DG se encuentra localizado en la membrana presináptica de los fotorreceptores, que rodea las prolongaciones dendríticas de las células postsinápticas (Figura 1.7B) (Montanaro *et al.*, 1995; Schmitz & Drenckhahn, 1997b; Ueda *et al.*, 1998).

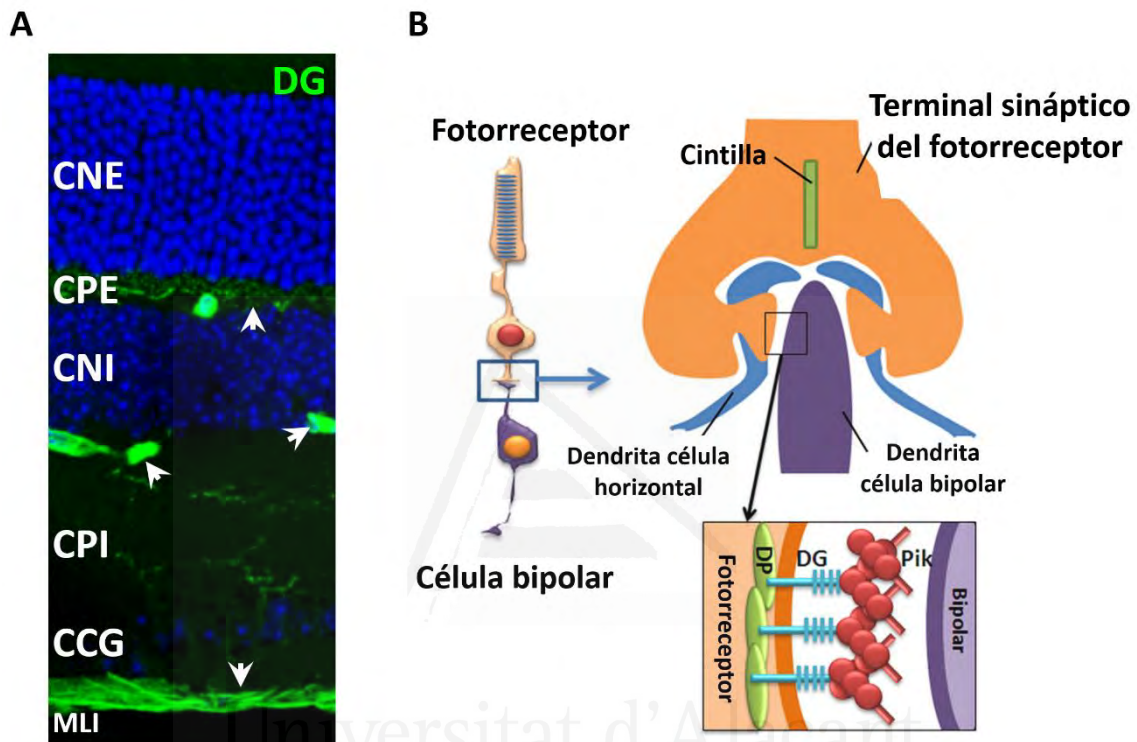


Figura 1.7. Localización del DG y diagrama de las estructuras sinápticas en la retina. (A) Imagen obtenida en esta tesis de una sección transversal de la retina de ratón, donde se muestra la distribución del β -DG en la CPE, la MLI y alrededor de los vasos sanguíneos (cabezas de flecha). **(B)** Diagrama de las estructuras de la sinapsis en la CPE (arriba) y las moléculas que interactúan en su formación (abajo). Abreviaturas: CNE, capa nuclear externa; CPE, capa plexiforme externa; CNI, capa nuclear interna; CPI, capa plexiforme interna; CCG, capa de células ganglionares; MLI, membrana limitante interna; DP, distrofina; DG, distroglicano; Pik, pikachurina. Figura modificada de Omori *et al.*, 2012.

La inactivación génica del β -DG causa cambios en los canales de potasio de las células de Müller, pero no altera la localización de la distrofina en la retina externa ni provoca cambios en los patrones de laminación de la retina (Satz *et al.*, 2009). Por el contrario, el deterioro en la interacción entre el α -DG y la pikachurina, produce alteraciones significativas en la cintilla sináptica y en la retina externa (Omori *et al.*, 2012).

1.4.3. Defectos oculares en las DGPs

Como ya se ha descrito antes, las DGPs en sus formas más severas WWS, MEB y FCMD conllevan el desarrollo de anomalías oculares. Estas causan, en la mayoría de los casos, una pérdida parcial o total de la visión. Entre ellas se pueden citar malformaciones y displasias retinianas, así como patologías oculares, entre las cuales se encuentra: cataratas, miopía severa y/o glaucoma (Hino *et al.*, 2001). Estos defectos son particularmente destacables en el WWS, y algo más leves y de aparición más tardía en MEB y FCMD (Muntoni *et al.*, 2011). En la retina adulta la expresión de los genes asociados a DGPs está escasamente estudiada. La función de las proteínas que codifican estos genes en la retina de mamíferos es poco conocida, aunque existen evidencias de que la pérdida de su actividad causa defectos en la glicosilación del DG (Bouchet-Séraphin *et al.*, 2015; Godfrey *et al.*, 2011). Por lo tanto, es importante adquirir un mayor conocimiento sobre la expresión y distribución de estas proteínas en la retina normal de mamíferos, lo que permitirá comprender su implicación en el desarrollo de los síntomas oculares asociados a las DGPs.

1.5. Objetivos

Los objetivos de esta tesis doctoral se definen a continuación:

- Analizar en la retina de mamíferos normales, desde roedores hasta la retina humana, la expresión de genes asociados a distroglicanopatías, tanto a nivel de ARNm como de proteína, y caracterizar su patrón de expresión en las diferentes capas y tipos neuronales de la retina neural de ratón.
- Realizar un estudio bioinformático y filogenético de las proteínas POMGnT1 y POMGnT2 para analizar su estructura y evolución molecular dentro del filo Cordados: dominios conservados y posibles cambios evolutivos.
- Caracterizar las alteraciones estructurales y morfológicas en la retina de ratones *Pomt1* KO condicionales, un modelo animal de distroglicanopatías.
- Inferir conclusiones sobre la posible función e importancia de la proteína POMT1 en las células retinianas.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

Expresión de genes y proteínas asociados a distroglicanopatías en la retina de mamíferos

Las distroglicanopatías (DGPs) son enfermedades genéticas raras que cursan con distrofia neuromuscular y que ofrecen una corta esperanza de vida. Los genes asociados a la aparición de estas distrofias codifican proteínas involucradas de forma directa o indirecta en la vía de *O*-glicosilación del α -distroglicano (α -DG), una glicoproteína crucial para la plasticidad y el establecimiento de las sinapsis en el sistema nervioso central (SNC). Si bien el papel de la mayoría de estas proteínas se encuentra definido en el músculo esquelético, en el SNC adulto aún no se encuentra claramente establecido, y su expresión en la retina de mamíferos prácticamente no ha sido investigada.

El estudio de la expresión y distribución intracelular de las proteínas involucradas en las vías de *O*-glicosilación del α -DG en la retina neural de diferentes especies de mamíferos, podría ayudar a esclarecer el papel que juegan estas proteínas en la patogénesis ocular asociada a las DGPs.

En este contexto, en este trabajo hemos demostrado mediante RT-PCR y Western blotting, que los genes *POMT1*, *POMT2*, *POMGNT1*, *FKTN*, *FKRP* y *LARGE* se expresan a nivel de ARNm y proteína, en la retina neural de primates (mono y humano), bovina y de roedores (rata y ratón). Los estudios inmunohistoquímicos realizados en la retina neural de ratón, han permitido establecer la localización celular en este tejido de las proteínas POMGnT1, fukutina y FKRP.

2.1 Introducción

En la ruta de glicosilación del distroglicano (DG) se encuentran involucradas numerosas proteínas en su mayoría (aunque no todas) glicosiltransferasas. Esta glicoproteína es el componente central del complejo distrofina-glicoproteína (DGC), responsable del anclaje del citoesqueleto de células musculares y nerviosas a la matriz extracelular (MEC) (Barresi & Campbell, 2006; Dobson *et al.*, 2013; Endo, 2015). El DG está codificado por el gen *DAG1* (OMIM 128239), el cual se transcribe y traduce en un precursor polipeptídico que se escinde postraduccionalmente en dos subunidades: α -DG y β -DG. El α -DG se localiza extracelularmente y está extensivamente glicosilado, mientras que el β -DG es transmembranal y se une a la subunidad α de forma no covalente. La glicosilación del α -DG es esencial para su correcto funcionamiento (Barresi & Campbell, 2006; Endo, 2015; Martin *et al.*, 2007), ya que los *O*-manosilglicanos que se le añaden enzimáticamente le confieren la capacidad de unirse a sus ligandos proteicos en la MEC, como son la laminina, el perlecán, la agrina, la neurexina, la pikachurina y Slit (Endo, 2015; Samwald & Samwald, 2007; Yoshida-Moriguchi & Campbell, 2015).

Mutaciones en los genes que codifican enzimas participantes en la *O*-manosilación del α -DG se relacionan con la aparición de un grupo de distrofias neuromusculares hereditarias recesivas, conocidas como distroglicanopatías (DGPs). Hasta la fecha se conocen 18 genes cuyas mutaciones originan, directa o indirectamente, una hipoglicosilación del α -DG, y por ello afectan a su función como receptor de los ligandos de la MEC (Martin *et al.*, 2007). Las DGPs más relevantes son, en orden decreciente de severidad, el síndrome de Walker-Warburg (WWS), la enfermedad de músculo-ojo cerebro (MEB), la distrofia muscular congénita de Fukuyama (FCMD) y las distrofias musculares de cinturas (LGMDs).

Las síntomas cerebrales más graves asociados a estos trastornos incluyen hidrocefalia, liscencefalia en adoquinado, ausencia total o parcial del cuerpo caloso, hipoplasia cerebelar, quistes cerebelosos y/o anomalías en la sustancia blanca (Clement *et al.*, 2008; Godfrey *et al.*, 2007). Las deficiencias en el sistema visual pueden incluir glaucoma congénito, microftalmia, buftalmos, cataratas congénitas, malformaciones

retinianas (que incluyen atrofia, displasia y desprendimiento), miopía y defectos de la cámara anterior. Estas anomalías demuestran la importancia de la función del distroglicano y de su unión a ligandos, durante el desarrollo del cerebro y del ojo, además del desarrollo y mantenimiento muscular (Godfrey *et al.*, 2011).

La síntesis de los O-manosilglicanos del α -DG se inicia en el retículo endoplásmico (RE), donde diferentes enzimas participan en la adición covalente de estructuras glicosídicas. En la construcción de los tres núcleos glicosídicos conocidos hasta el momento en el α -DG, denominados M1, M2 y M3 (Yoshida-Moriguchi *et al.*, 2013), participa inicialmente el heterodímero constituido por POMT1 y POMT2, dos proteínas encargadas de catalizar la transferencia de la primera unidad de manosa a los residuos de serina o treonina en el dominio de tipo mucina del α -DG (Manya *et al.*, 2004). En la biosíntesis de los núcleos M1 y M2 participan a continuación otras enzimas en el aparato de Golgi, como son la proteína POMGnT1 (Yoshida *et al.*, 2001) y la glicosiltransferasa GNT-IX (Inamori *et al.*, 2004). Finalmente estos dos núcleos son extendidos por diferentes galactosiltransferasas (GalTs), sialiltransferasas (SiATs), glucuroniltransferasas (GlcATs), una sulfotransferasa (HNK-1ST) y la α 1,3-fucosiltransferasa-9 (FUT9), aunque los detalles de cómo participan estas enzimas en la síntesis de O-manosilglicanos no han sido completamente elucidados (Endo, 2015). La construcción del núcleo M3 se continúa en el mismo RE donde se inicia, actuando allí secuencialmente las enzimas POMGnT2 (Manzini *et al.*, 2012); B3GALnT2 y proteína O-manosa quinasa (POMK) (Yoshida-Moriguchi *et al.*, 2013). A partir de este punto el α -DG es transferido al Golgi, donde las proteínas ISPD, fukutina, FKR, B4GAT1 y LARGE extienden el núcleo mediante la transferencia de diferentes residuos. La presencia del núcleo M3 y más aún el número de repeticiones del disacárido extendido por LARGE, es esencial para la unión del α -DG a las proteínas de la MEC (Goddeeris *et al.*, 2013).

El patrón de expresión de estas proteínas, incluida su distribución y localización intracelular, no se ha abordado aún en la retina de mamíferos. En este trabajo se ha analizado la expresión a nivel de ARNm y proteína de los principales genes implicados en las DGPs, en diferentes especies de mamíferos. Así mismo, se ha caracterizado el patrón de distribución de tres de sus proteínas producto: POMGnT1, fukutina y FKR, en la retina de ratón adulto.

2.2 Materiales y métodos

2.2.1 Material biológico

El manejo y sacrificio de los animales utilizados se llevaron a cabo de acuerdo con las normas del National Institutes of Health (NIH, EEUU), la Directiva Europea 2010/63/UE y la Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO, Estados Unidos).

2.2.1.1 Primates.

Humano: El ARN de retina humana (*Homo sapiens*) fue obtenido comercialmente de Clontech BD (Mountain View, CA, EEUU), y pertenecía a 29 donantes sanos de ambos sexos con edades entre 20 y 60 años.

Mono: Ojos de macacos cangrejeros (*Macaca fascicularis*) de ambos sexos, de 5-6 años y con 4-6 kg de peso, fueron obtenidos del animalario de la Universidad de Murcia a cargo de la Dra. M^a Trinidad Herrero. El tratamiento y manipulación de los monos se llevó a cabo de acuerdo con la normativa establecida por la International Primate Society, como se describe en [Campello et al. \(2013\)](#). No se sacrificó ningún mono con el único propósito de esta investigación, sino que otros órganos de su cuerpo fueron utilizados por otros investigadores para estudios adicionales. Los monos fueron anestesiados con ketamina (10 mg/kg) por vía intramuscular, y sacrificados mediante la administración intraperitoneal de una inyección letal de pentobarbital (50 mg/kg). Los ojos fueron inmediatamente enucleados y diseccionados para extraer la retina neural. Estas fracciones fueron congeladas en N₂ líquido para su transporte, y posteriormente almacenadas a -80°C hasta su utilización.

2.2.1.2 Vaca.

Los ojos bovinos (*Bos taurus*) se obtuvieron a partir de terneras adultas, de 8-9 meses de edad, recién sacrificadas en el matadero municipal de Alicante. Se conservaron en N₂ durante su transporte y se almacenaron a -80°C. Tras esta última, se obtuvo muestras de retina neural destinadas a la extracción de ARN o de proteínas, y se almacenaron a -80°C.

2.2.1.3 Roedores.

Los ojos de ratas (*Rattus norvegicus*) adultas albinas (3-4 meses) de la línea Sprague-Dawley y de ratones (*Mus musculus*) adultos pigmentados (2-3 meses) de la línea C57BL/6J, mantenidos en el animalario de la Universidad de Alicante, fueron sacrificados mediante el método de inhalación de CO₂ en una cámara estanca, seguido de dislocación cervical. A continuación se enuclearon los ojos y se almacenaron en solución RNAlater (Ambion; Austin, TX, EEUU) a -80°C hasta la extracción de ARN o proteínas.

Los ojos de ratón a ser analizados mediante microscopía se fijaron en paraformaldehído al 4% en tampón fosfato sódico 0,1 M pH 7,4 (PB) durante 1 h, y posteriormente se sometieron a crioprotección en PB suplementado con concentraciones crecientes de sacarosa (15% 1 h, 20% 1 h y 30% 16 h), como se describe en [Esteve-Rudd et al. \(2011\)](#). Finalmente, se almacenaron a -80°C.

2.2.2 Aislamiento y análisis de ARN

2.2.2.1 Obtención y purificación de ARN

Tras descongelar los ojos, se eliminó la córnea rodeando con tijeras de disección el limbo esclero-corneal y se retiró el cristalino. A continuación, se diseccionó la retina neural descartando el epitelio pigmentario de la retina (EPR). El ARN de la retina se aisló utilizando el reactivo TRIzol® (Invitrogen; Carlsbad, CA, EEUU), siguiendo las instrucciones del fabricante, en un ambiente y con materiales libres de ARNasas. A las muestras congeladas de retina de mono, vaca, rata y ratón se les añadió 10 µl de TRIzol por cada mg de tejido. Las retinas se homogeneizaron e incubaron durante 5 min a temperatura ambiente, y se les añadió 0,2 volúmenes de cloroformo, agitándose durante 15 s. Posteriormente, las muestras se incubaron durante 3 min a temperatura ambiente y se centrifugaron a 10.000 rpm durante 15 min a 4°C. A continuación, la fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo, se precipitó el ARN añadiendo un volumen de isopropanol igual al de TRIzol usado inicialmente y se incubaron las muestras durante 10 min a temperatura ambiente. Tras centrifugación a 10.000 rpm durante 15 min a 4°C, se desechó el sobrenadante y se lavó el precipitado obtenido con etanol al 75%.

Finalmente, se dejaron secar las muestras durante 5 min a temperatura ambiente y se disolvieron en H₂O libre de ARNasas mediante incubación a 55°C durante 10 min. Por último, se realizó un tratamiento con ADNasa utilizando el kit TURBO DNA-free (Ambion) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Con el fin de eliminar posibles restos de fenol y/o cloroformo resultantes de la extracción, el ARN se purificó utilizando el kit NucleoSpin RNA Clean-up (Macherey-Nagel; Düren, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. Este kit se basa en la unión selectiva del ARN a un filtro de sílice acoplado a una columna de centrifugación. Las muestras de ARN se llevaron a un volumen final de 100 µl con H₂O libre de ARNasas, y posteriormente se añadieron 600 µl de tampón de lisis y unión (mezcla del reactivo RA1 y etanol absoluto en proporción 1:1). A continuación, la mezcla se transfirió a una columna de unión del kit y se centrifugó a 10.000 rpm durante 30 s. Se realizaron dos lavados con la solución RA3 del kit, centrifugándose a 10.000 rpm durante 30 s en el primero y 2 min en el segundo. La columna se transfirió a un nuevo microtubo y se dejó secar durante 3 min a temperatura ambiente. Finalmente, el ARN se eluyó con H₂O libre de ARNasas mediante centrifugación a 13.000 rpm durante 1 min. La concentración de ARN se determinó midiendo la absorbancia de 1 – 1,5 µl de la solución final a 260 y 280 nm en un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies; Waltham, MA, EEUU), utilizando H₂O como blanco de la medida. Las muestras de ARN se almacenaron a –80 °C hasta su utilización.

2.2.2.2 Retrotranscripción - reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)

La retrotranscripción (RT) de ARN a ADN complementario (ADNc) se llevó a cabo mediante el kit RETROscript® (Ambion), siguiendo las instrucciones del fabricante. Previamente a la RT, el ARN (1 µg) se incubó a 75°C durante 3 min con el cebador (oligo (dT) o decámeros aleatorios) a una concentración 5 µM en un volumen final de 11 µl, y luego se conservó en hielo durante 15-20 min. Las reacciones de RT se llevaron a cabo en un volumen de 20 µl, conteniendo tampón de RT 10× (Tris-HCl 50 mM pH 8,3, KCl 75 mM, MgCl₂ 3 mM y ditiotretitol (DTT) 5 mM), los 4 dNTPs a una concentración de 0,5 mM cada uno, 10 U de inhibidor de ARNasa y 100 U de retrotranscriptasa del virus MMLV. Como controles negativos, se llevaron a cabo reacciones en paralelo en las que se omitió

la retrotranscriptasa y se añadió un volumen equivalente de H₂O (1 µl). Las reacciones se incubaron a 44°C durante 1 h, y a 92°C durante 10 min en un termociclador Techne TC-512 (Staffordshire, Reino Unido).

Las amplificaciones mediante PCR de segmentos de los transcritos de los genes *POMT1*, *POMT2*, *POMGNT1*, *FKTN*, *FKRP* y *LARGE* se llevaron a cabo en un volumen de 40 µl conteniendo ambos cebadores (directo e inverso) a una concentración de 0,4 µM cada uno, los 4 dNTPs a una concentración 0,2 mM, 1 U de ADN polimerasa GoTaq (Promega), tampón de PCR 1× (Tris-HCl 20 mM pH 8,0, MgCl₂ 1,5 mM, KCl 50 mM) y el ADNc molde (20 ng). Los cebadores (Tabla 2.1) se diseñaron con el software Primer3 (Untergasser *et al.*, 2012) llevando una temperatura de fusión (T_m) de 60°C, flanqueando al menos un intrón en cada gen y perteneciendo a exones presentes en todas las variantes de ARNm conocidas. Todos los cebadores fueron sintetizados por la casa comercial Invitrogen. Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo utilizando un termociclador Techne TC-512, con un paso inicial de desnaturalización inicial a 94°C durante 2 min, seguido de 35 ciclos cada uno de 94°C durante 30 s, 60°C durante 20 s y 72°C durante 30 s, y una extensión final a 72°C durante 5 min.

Los productos de la amplificación por PCR se sometieron a electroforesis horizontal en gel de agarosa al 2% en tampón TBE 1× (Trizma base 10 mM, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 0,2 mM y BO₃H₃ 9 mM; pH 8,3) suplementado con SYBR Green I (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, EEUU) a una dilución 1/20.000. A 5 µl de cada reacción de PCR se le añadió 2 µl de tampón de carga (glicerol al 50%, EDTA 30 mM, azul de bromofenol al 0,1%, xilén-cianol al 0,1%). Se utilizaron los marcadores de peso molecular comerciales 100 pb DNA ladder (Invitrogen), y 50 base-pair ladder (Fermentas; St. Leon-Rot, Alemania). La electroforesis se llevó a cabo en un sistema Varigel VG-20 (Fisher Scientific Bioblock; Madrid) a un voltaje constante de 100 V durante 3 h en TBE 1×. Finalmente, los geles se visualizaron en un sistema de fotodocumentación UVIdoc GAS9500 (UVitec; Cambridge, Reino Unido) equipado con un transiluminador de luz ultravioleta (UV) de 312 nm.

Tabla 2.1. Cebadores utilizados para las reacciones de RT-PCR.

Gen	Especie	Secuencia	Exón	Tamaño (bp)
<i>POMT1</i>	Humano, Mono	D: 5'-AATCATGTCCAGTGCCTTCC-3'	9	165
		R: 5'-ATCATGGGGTAGGTGTCCTG-3'	10	
	Bovino	D: 5'-AATCATGTCCAGTGCCTTCC-3'	9	165
		R: 5'-ATCATAGGGTAGGTGCTCTGGT-3'	10	
	Rata, Ratón	D: 5'-AATCATGTCCAGTGCCTTCC-3'	9	165
		R: 5'-ATCATGGGATAGGTGTTCTTGT-3'	10	
<i>POMT2</i>	Humano, Mono	D: 5'-GGTTTGGTGGCTGAATCTGT-3'	18	222
		R: 5'-ATGGCTGGGAAGTAGTGGTG-3'	19	
	Bovino	D: 5'-TCCTGTGCCTCATAGTGCTG-3'	7	238
		R: 5'-TAGAAGTGCCTGTGCGAGTG-3'	9	
	Rata	D: 5'-TCCTGTGCCTCATAGTGCTG-3'	7	176
		R: 5'-AGAGCCATACGCCAAGTGT-3'	8-9	
	Ratón	D: 5'-GTCTGGTGGCTGAATCTGGT-3'	18	221
		R: 5'-ATGGCTGGGAAGTAGTGGTG-3'	19	
<i>POMGNT1</i>	Humano, Mono, Rata, Ratón	D: 5'-ATCCTACCACTTTGGCATCG-3'	17	108
		R: 5'-ACATTCTGAGCTGGACACC-3'	18	
	Bovino	D: 5'-ATCCTACCACTTCGGCATCG-3'	17	108
		R: 5'-ACATTCTGAGCTGGACACC-3'	18	
<i>FKTN</i>	Humano, Mono	D: 5'- GGGAGTACCATTCTGGCTGA -3'	8	150
		R: 5'- GGAAGTCTGCATCCTGAAA -3'	9	
	Bovino	D: 5'- GGGAGTGCGGTTCTGGCT -3'	8	150
		R: 5'- GGGAGTCTGCATCTTGAAA -3'	9	
	Rata, Ratón	D: 5'- GGGAGTGCCCTTCTGGCT -3'	8	150
		R: 5'- GGAAGTCTGCATCCTGAAA -3'	9	
<i>FKRP</i>	Humano	D: 5'- GACCTGGGCATCTACTTGGA -3'	4	150
		R: 5'- CAAGTGGTTGCTTTCGCTGT -3'	4	
	Mono	D: 5'- GACCTGGGCATCTACTTGGA-3'	4	150
		R: 5'- GAGGTGGTTGCTTTCGCTAT-3'	4	
	Bovino	D: 5'-TGGGACTACGATGTGGACCT -3'	4	163
		R: 5'-GGTGGTTGCTCTCGCTGTA-3'	4	
	Rata, Ratón	D: 5'- GATCTGGGCATCTACCTGGA-3'	4	245
		R: 5'-AAGTGCTCTGGAACTCAACA -3'	4	
<i>LARGE</i>	Humano, Mono	D: 5'- TCTTCCAGACCTGGATGGTG -3'	6	372
		R: 5'- TCCGCAGCTTATCCAGAAGT -3'	8-9	
	Bovino	D: 5'- CCTTGAAACCTGTGGAAAA -3'	8	184
		R: 5'- CCTTGAAACCTGTGGAAAA -3'	9-10	
	Rata	D: 5'- GGAACAGGGGACAGTGAGAA -3'	4	206
		R: 5'- TCAGCAATGAGGTGGAAGTG -3'	6	
Ratón	D: 5'- TTTCCCAAGTCAAAAGCAG-3'	14	188	
	R: 5'- GGCAGTCTCGTCTCACAACA -3'	15		

En la 1ª columna se indica el gen, en la 2ª la(s) especie(s) correspondiente(s) a cada pareja de cebadores, en la 3ª las secuencias de los cebadores directo (D) e inverso (R), en la 4ª los exones con los que hibridan, y en la 5ª el tamaño en pares de bases (pb) del producto de PCR esperado.

2.2.2.3 Secuenciación de productos de PCR

Con el fin de confirmar la especificidad de los amplicones obtenidos, los productos de PCR purificados fueron secuenciados mediante el método de Sanger en un sistema automatizado Applied Biosystems ABI 3730XL por la empresa STABvida (Caparica, Portugal). Se secuenciaron en todos los casos ambas cadenas de ADN del producto de PCR, utilizando los mismos cebadores empleados para su amplificación (ver [Tabla 2.1](#)). Las secuencias obtenidas se visualizaron y editaron mediante el software bioinformático FinchTV V1.4 (Geospiza; <http://www.geospiza.com>). A continuación, se utilizó la herramienta bioinformática BLASTn (Altschul *et al.*, 1990; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) con el fin de comparar las secuencias obtenidas con las disponibles en la base de datos GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank>).

2.2.3 Extracción y análisis de proteínas

Los métodos utilizados han sido puestos a punto en nuestro grupo de investigación y descritos en diferentes publicaciones científicas (Esteve-Rudd *et al.*, 2010; Martínez-Navarrete *et al.*, 2007).

2.2.3.1 Extracción y cuantificación de proteínas totales

Los tejidos se descongelaron en hielo y se homogeneizaron en tampón de lisis (Hepes 20 mM pH 7,9, glicerol al 10%, KCl 10 mM, NaCl 0,4 M, Nonidet P-40 al 0,1% y ditiotreitolo 2 mM), suplementado con los inhibidores de proteasas fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 1 mM, leupeptina 10 μ M, aprotinina 0,3 μ M y benzamidina 100 μ M. Tras incubación en hielo durante 15-20 min con agitación suave ocasional, las muestras se centrifugaron a 13.000 rpm durante 10 min a 4°C. El sobrenadante, conteniendo las proteínas solubilizadas, se dividió en alícuotas y se almacenó a -80°C.

La concentración de proteínas se cuantificó en una solución de la muestra original diluida 10 veces en H₂O. Para ello, se utilizaron placas de microtitulación de 96 pocillos y el método del ácido bicinconínico (BCA; Pierce, Rockford, IL), según las indicaciones del fabricante. Como proteína patrón para obtener la curva de calibrado (0-12 μ g) se utilizó seroalbúmina bovina (BSA) diluida en el mismo tampón de lisis. A

cada pocillo con muestra o proteína patrón se le añadieron 200 µl de reactivo BCA, y se midió la absorbancia a una λ de 595 nm en el espectrofotómetro-fluorímetro GENios Microplate Reader (TECAN).

2.2.3.2 Western blotting.

SDS-PAGE: La electroforesis se llevó a cabo en geles con un gradiente de poliacrilamida al 5-20% (Tris-HCl 0,25 M pH 8,8, acrilamida al 5-20%, glicerol al 1,5-6,7%, SDS al 0,1%) de 1,5 mm de espesor, preparados utilizando un formador de gradientes Hoefer SG50 (Amersham Biosciences), y con un gel de apilamiento de poliacrilamida al 4% (Tris-HCl 0,4 M pH 6,8, acrilamida al 4%, SDS al 0,1%). A un volumen de muestra conteniendo 100 µg de proteína se le añadió un volumen igual de tampón de carga 2× (Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8, glicerol al 20%, β -mercaptoetanol al 5%, SDS al 10%, azul de bromofenol al 0,02%) y, tras hervir a 100°C durante 10 min, se cargaron las proteínas en el gel. La separación se llevó a cabo en un sistema de electroforesis vertical Sigma-Aldrich Z33,985-7, utilizando como tampón electrodo Tris-HCl 25 mM pH 8,3, glicina 192 mM, SDS al 0,1%. Se utilizaron los marcadores de peso molecular PageRuler (Fermentas) y SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Broad Range (Bio-Rad; Hercules, CA, EEUU). Se aplicó inicialmente al gel una corriente constante de 40 mA durante 30 min, y luego de 10 mA durante 14-16 h.

Electrotransferencia: Finalizada la electroforesis, los geles se equilibraron en tampón TGSM 1× (Trizma base 48 mM, glicina 39 mM, SDS 1,3 mM, metanol 20%) durante 30 min con agitación suave. Las membranas de difluoruro de polivinilideno (PVDF) Hybond-P (GE Healthcare; Buckinghamshire, Reino Unido) se hidrataron en metanol durante 5-10 s y, tras lavar dos veces con H₂O durante 5 min, se equilibraron en TGSM 1× durante 30 min con agitación suave. Se llevó a cabo entonces electrotransferencia semi-seca utilizando un sistema SemiPhor Transfer TE77 (Amersham Biosciences). Para ello se dispusieron secuencialmente sobre el electrodo inferior (ánodo) tres trozos de papel 3MM (Macherey-Nagel) impregnados en tampón TGSM 1×, la membrana de PVDF, el gel y otros tres trozos de papel 3MM. Se aplicó entonces una corriente de 0,8 mA por cm² de membrana durante 1 h. Tras lavar la membrana con tampón TBS 1× (Tris-

HCl 25 mM pH 8,0, NaCl 150 mM, KCl 2,7 mM), se dejó secar a temperatura ambiente durante más de 2 h.

Tinción: Las membranas se tiñeron para verificar que se habían cargado cantidades comparables de proteína en cada calle del gel, y que la electrotransferencia había tenido lugar correctamente. La membrana de PVDF se rehidrató en una solución con metanol al 10%, ácido acético al 7% durante 15 min con agitación suave y, tras múltiples lavados con H₂O durante 15 min, se tiñó utilizando el colorante fluorescente SYPRO Ruby Protein Blot Stain (Molecular Probes; Eugene, OR, EEUU), durante 15-30 min con agitación suave. A continuación, se lavó de nuevo en H₂O durante 5 min y se dejó secar finalmente a temperatura ambiente en oscuridad durante aproximadamente 2 h. La membrana teñida se visualizó y fotografió con luz UV en un transiluminador UVIDoc (UVItec).

Inmunodetección: Las membranas se hidrataron secuencialmente en metanol durante 5-10 s, seguido de H₂O, tampón TBS 1× y tampón TTBS 1× (Tween 20 al 0,1% en TBS 1×) con agitación vigorosa durante 15 min cada vez. A continuación se bloquearon las áreas de la membrana sin proteína unida mediante incubación durante 2 h a temperatura ambiente en solución de bloqueo (leche desnatada en polvo al 5% en TTBS 1×). Se lavó repetidas veces con TTBS 1× con agitación vigorosa durante 15-20 min y se incubó durante 14-16 h a 4°C con el correspondiente anticuerpo primario (Tabla 2) diluido en solución de incubación (leche desnatada en polvo al 5% en TBS 1×). A continuación, la membrana se lavó repetidas veces en TTBS 1× durante 15-20 min y se incubó durante 1 h con el anticuerpo secundario correspondiente (Tabla 2.2) conjugado a la enzima peroxidasa de rábano y diluido en solución de incubación. Finalmente, la membrana se lavó secuencialmente con TTBS 1×, TBS 1× y H₂O, durante 10-15 min cada vez.

Las membranas se dispusieron sobre una lámina de acetato transparente con la cara proteica hacia arriba. Se añadió entonces la solución de revelado SuperSignal West Dura (Pierce) según las indicaciones del fabricante. Las películas de autorradiografía (Hyperfilm ECL; Amersham Biosciences) se expusieron a las membranas durante 10 s - 1 h, según la intensidad de la señal. Tras su revelado y fijación, las películas fueron escaneadas y procesadas utilizando el software NIH ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>).

Tabla 2.2. Anticuerpos utilizados para Western blotting.

Anticuerpos	Antígeno	Origen	Casa comercial, nº de catálogo	Dilución
Primarios	POMT1	policlonal de conejo	Sigma, SAB2101845	1:1000
	POMT2	policlonal de conejo	Sigma, HPA003663	1:250
	POMGnT1	monoclonal de ratón	Sigma, clon 6C12, WH0055624M7	1:250
	Fukutina	policlonal de conejo	Proteintech (Manchester, Reino Unido), 18276-1-AP	1:1000
	FKRP	policlonal de conejo	Origene (Rockville, MD, EEUU), TA347645	1:1000
	LARGE	policlonal de conejo	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, EEUU), sc-99164	1:1000
Secundarios	IgG de conejo	policlonal de cabra	Pierce, 32460	1:10000
	IgG de ratón	policlonal de cabra	Pierce, 32430	1:10000

En la 1ª columna se indica el tipo de anticuerpo, en la 2ª su proteína antigénica, en la 3ª la especie en que fue desarrollado, en la 4ª la casa comercial de la que se obtuvo y su número de catálogo (y también el nº del clon correspondiente para los anticuerpos monoclonales), y en la 5ª la dilución a la que se empleó.

2.2.4 Microscopía confocal de inmunofluorescencia

Las técnicas de microscopía confocal se llevaron a cabo esencialmente como se describe en diferentes publicaciones científicas de nuestro grupo ([Esteve-Rudd *et al.*, 2011, 2010](#); [Martínez-Navarrete *et al.*, 2007](#))

2.2.4.1 Secciones verticales de retina.

Los ojos, fijados en paraformaldehído al 4% como se describe en el apartado 2.2.1.3, se descongelaron a temperatura ambiente y se diseccionaron. Se recortó la córnea con unas tijeras de disección a lo largo del limbo esclero-corneal y se eliminó junto con el cristalino. Se retiró el humor vítreo y se recubrió el ojo con solución de inclusión para criostato Tissue-Tek® OCT (Sakura Finetek Europe; Zoeterwoude, Holanda). El tejido se congeló en N₂ líquido, se recubrió con OCT y se atemperó a -25°C en el interior de un criostato Leica CM 1900 (Wetzlar, Alemania). Se obtuvieron entonces secciones de 14-16 µm que se depositaron sobre portaobjetos Superfrost® Plus (Thermo Scientific) y se almacenaron a -20°C.

2.2.4.2 Incubación con anticuerpos.

Las secciones de retina se lavaron repetidas veces con tampón PB y se incubaron durante 1 h en una cámara húmeda a temperatura ambiente con una solución de BSA al 5% en PB, con el fin de evitar la unión inespecífica de anticuerpos a epítomos del tejido. Se lavaron de nuevo las secciones en PB 3 veces, durante 5 min cada vez, y se incubaron con el/los anticuerpos monoclonales o policlonales primarios correspondientes (Tabla 2.3), diluidos en PB suplementado con Triton X-100 al 1% (PBX), durante 16 h en una cámara húmeda a temperatura ambiente y con agitación suave. Como controles negativos, se incubaron en paralelo secciones en PBX en las que se omitieron los anticuerpos primarios, con el fin de comprobar que la inmunorreactividad observada era específica del anticuerpo primario. Las secciones se lavaron nuevamente con PB y se incubaron en oscuridad con los anticuerpos secundarios correspondientes (Tabla 3), diluidos en PBX, durante 1 h en las mismas condiciones anteriores. Finalmente, las secciones se lavaron con PB, se montaron en medio con glicerina Citifluor (Citifluor Ltd; Londres, Reino Unido), se sellaron con laca de uñas y se guardaron a 4°C en oscuridad hasta su visualización mediante microscopía confocal.

Con el fin de visualizar los núcleos de las células al microscopio, se añadió 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI) a una concentración de 10 µg/ml a la mezcla de anticuerpos secundarios, y se incubó durante 1 h en una cámara húmeda a temperatura ambiente y en oscuridad.

2.2.4.3 Observación de muestras mediante microscopía confocal.

La fluorescencia de las muestras se detectó mediante un microscopio confocal espectral invertido Leica TCS SP2 (Wetzlar, Alemania), utilizando dos fuentes de láser: a) azul, de Ar, con una λ de excitación de 450-490 nm, para anticuerpos secundarios marcados con el fluoróforo Alexa Fluor (AF) 488, con una λ de emisión de 515 nm (verde); y b) verde, de He-Ne, con una λ de excitación de 515-560 nm, para anticuerpos secundarios marcados con AF 546 o AF 555, con una λ de emisión de 590 nm (rojo). Para la visualización del colorante DAPI se utilizó un diodo UV con una λ de emisión de 405 nm (azul). En los casos en que se visualizaron dos o más fluoróforos sobre la misma muestra, estos fueron excitados secuencialmente, y no simultáneamente, para evitar

interferencias entre los canales de emisión. Los objetivos utilizados fueron Leitz Plan-apocromáticos de inmersión en aceite mineral, de 40x, 63x y 100x. La platina del microscopio era galvanométrica de alta precisión y alta velocidad para controlar el eje Z. Las fotografías, obtenidas a una resolución de 300 dpi, se almacenaron en formato TIFF y se procesaron mediante el programa Adobe Photoshop CS5 v.12.0 (Adobe Systems; San José, CA, EEUU) para su posterior análisis.

Tabla 2.3. Anticuerpos utilizados para microscopía de inmunofluorescencia.

Anticuerpos	Antígeno	Origen	Casa comercial, nº de catálogo	Dilución
Primarios	POMGnT1	monoclonal de ratón	Sigma, clon 6C12, WH0055624M7	1:50
	Fukutina	policlonal de conejo	Proteintech, 18276-1-AP	1:50
	FKRP	policlonal de conejo	AbboMax (San José, CA, EEUU), 620-830	1:50
	c-Arrestina	policlonal de conejo	Millipore (Darmstad, Alemania), AB5282	1:500
	GM130	policlonal de cabra	Santa Cruz Biotechnology, sc-16271	1:250
	GM130	monoclonal de ratón	BD Transduction Labs. (Franklin Lakes, NJ, EEUU), clon 35, 610822	1:250
	S-Arrestina	monoclonal de ratón	Dr. Clay Smith (University of Florida, FL, EEUU), clon SCT-128	1:100
	Citocromo C	monoclonal de ratón	Zymed (San Francisco, CA, EEUU), clon 6H2B4, 33-8200	1:1000
	CtBP2	monoclonal de ratón	BD Transduction Labs, clon 16, 612044	1:1000
	β -Distroglicano	monoclonal de ratón	Abcam, (Cambridge, Reino Unido), clon 43DAG1/8D5, ab49515	1:50
	Calbindina	monoclonal de ratón	Sigma, clon CB-955, C9848	1:500
	Secundarios	IgG de cabra	policlonal asno	Molecular Probes, A-11055 (AF 488) y A-11056 (AF 546)
IgG de conejo		policlonal asno	Molecular Probes, A-21206 (AF 488) y A-10040 (AF 546)	1:100
IgG de ratón		policlonal asno	Molecular Probes, A-21202 (AF 488) y A-31570 (AF 555)	1:100

En la 1ª columna se indica el tipo de anticuerpo, en la 2ª la proteína antigénica, en la 3ª la especie en que fue desarrollado, en la 4ª la casa comercial de la que se obtuvo y su número de catálogo (y también el nº del clon para los anticuerpos monoclonales), y en la 5ª la dilución a la que se empleó para microscopía de fluorescencia de secciones verticales de retina. AF: Alexa Fluor.

2.3 Resultados

Las distroglicanopatías constituyen un grupo de distrofias musculares genéticas asociadas a la glicosilación anormal del DG. Las diferentes formas de DGPs, como son el WWS, la MEB o la FCMD, conllevan trastornos que afectan el cerebro, músculo y ojos (Bozzi *et al.*, 2009; Hewitt, 2009; Hino *et al.*, 2001). La retina es uno de los tejidos afectados en las DGPs más severas, presentando desde desprendimiento en MEB y FCMD (Godfrey *et al.*, 2007; Muntoni & Voit, 2004) hasta displasia en los casos más graves de WWS (Cormand *et al.*, 2001).

La expresión de los genes implicados en las DGPs en la retina de mamíferos adultos se ha explorado poco. Con el objeto de investigar la posible relación entre sus productos proteicos y los mecanismos moleculares subyacentes a los trastornos oculares asociados a DGPs, se analizó en este trabajo la expresión de los genes *POMT1*, *POMT2*, *POMGNT1*, *FKTN*, *FKPR* y *LARGE*, a nivel de ARNm mediante RT-PCR y a nivel de proteína mediante Western blotting, en la retina normal de diferentes especies de mamíferos. Además, se estudió la localización celular de las proteínas POMGnT1, fukutina y FKRP en la retina neural de ratones adultos mediante microscopia de inmunofluorescencia.

2.3.1 Expresión de genes asociados a distroglicanopatías en la retina de mamíferos.

Se estudió la expresión de los 6 genes asociados a DGPs más conocidos y primeros en su identificación: *POMT1*, *POMT2*, *POMGNT1*, *FKTN*, *FKPR* y *LARGE*, en la retina neural de distintas especies de mamíferos (humano, mono, vaca, rata y ratón). Tras la extracción del ARN total de la retina neural de estos animales y su posterior retrotranscripción a ADNc, se amplificaron las secuencias de dichos genes, utilizando cebadores específicos para cada uno de ellos (Tabla 2.1).

Los resultados de la amplificación mediante PCR de los segmentos de ARNm de cada uno de los 6 genes estudiados en las diferentes especies se muestran en la Figura

2.1. Todos los productos de PCR obtenidos presentaban el tamaño esperado a partir de su diseño, y su secuenciación confirmó que se correspondían con cada uno de los fragmentos predichos de ADNc para cada uno de los genes estudiados, indicados a la derecha de cada panel en la [Figura 2.1](#).

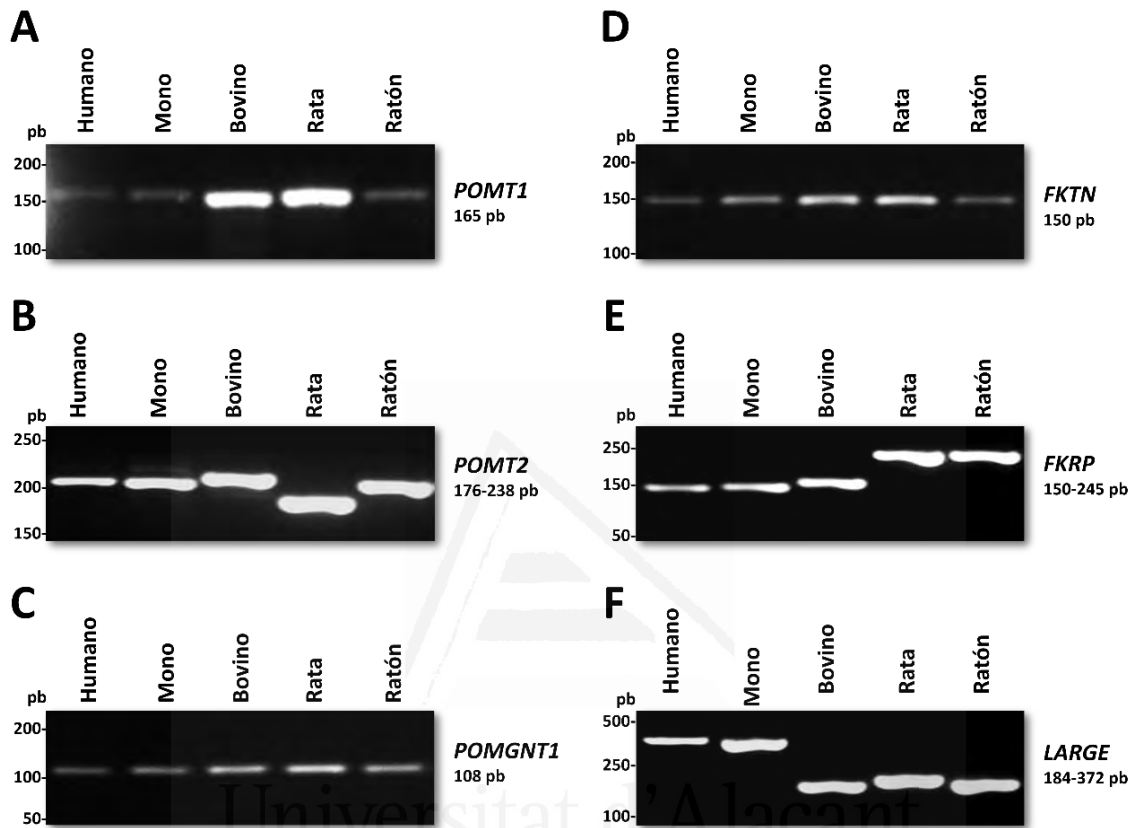


Figura 2.1. Expresión de genes asociados a distroglicanopatías en la retina de mamíferos. Análisis mediante RT-PCR de la expresión de los genes *POMT1* (A), *POMT2* (B), *POMGnT1* (C), *FKTN* (D), *FKRP* (E) y *LARGE* (D) en la retina neural de las especies indicadas. El tamaño de los fragmentos obtenidos se correspondía con el esperado en todos los casos, y se verificaron mediante secuenciación de ADN.

Los controles negativos de RT-PCR, que consistían en reacciones de PCR en las que el molde de ADNc se sustituyó por: a) reacciones de síntesis de ADNc llevadas a cabo en ausencia de la enzima retrotranscriptasa, o b) H₂O, no mostraron amplificación en ningún caso (datos no mostrados).

Dado que los 6 genes antes mencionados se expresaban a nivel de ARNm en la retina de las todas las especies de mamíferos estudiadas, se analizó mediante Western blotting la presencia en la retina de sus productos proteicos. Para ello, se realizó una extracción de proteínas totales de la retina neural de mono, bovino, rata y ratón, y se sometieron a cabo electroforesis en condiciones desnaturizantes. A continuación se

realizó una electrotransferencia de las proteínas separadas a una membrana de PVDF, y se llevó a cabo inmunodetección con los diferentes anticuerpos específicos para cada una de las 6 proteínas (Tabla 2.2). En la Figura 2.2 se indican a la derecha de cada imagen, los pesos moleculares de las bandas obtenidas para cada una de las proteínas analizadas.

La proteína POMT1 migró con una masa molecular aparente (M_r) de 82 kDa (Figura 2.2A), compatible con la calculada a partir de las correspondientes secuencias de todas las especies depositadas en GenBank (*Macaca fascicularis*, XP_015291799; *Bos taurus*, AAI42283; *Rattus norvegicus*, NP_445858 y *Mus musculus*, NP_660127). POMT2 (Figura 2.2B) se detectó con una M_r de 84 kDa en la retina de mono (XP_005561946) y de 85 kDa en la retina bovina (NP_001179825), de rata (NP_001040579) y de ratón (AAM12048). POMGnT1 (Figura 2.2C) mostró una M_r de 75 kDa, compatible también con la masa molecular calculada para las distintas especies estudiadas (mono, XP_015292022; bovina, NP_001019656; rata, NP_001007748; y ratón, NP_080927).

La fukutina, producto del gen *FKTN*, migró con una M_r de 60 kDa (Figura 2.2D), consistente con el tamaño descrito por otros autores (Matsumoto *et al.*, 2004; Yamamoto *et al.*, 2002), pero superior a su masa molecular teórica (aprox. 54 kDa, según la especie) predicha a partir de las secuencias de aminoácidos depositadas en GenBank (mono, EHH57182; bovina, XP_015320141; rata, NP_001102137; y ratón, NP_647470). También se identificó una banda adicional con una M_r de 56 kDa, atribuible a una posible isoforma proteica de la fukutina presente en la retina neural de vaca (Figura 2.2D), y correspondiente aprox. al peso molecular teórico de la proteína en dicha especie (54 kDa). La presencia de esta banda podría atribuirse a la existencia de procesamiento alternativo del ARNm del gen *FKTN*, ya descrito por otros autores (Kobayashi *et al.*, 2001).

En el análisis mediante Western blotting de FKRP (Figura 2.2E) se detectó una banda de aprox. 55 kDa correspondiente a la forma canónica de la proteína en las diferentes especies (mono, XP_015296752; bovino, NP_001093184; rata, NP_001020849 y ratón, NP_775606). Finalmente, el producto proteico del gen *LARGE* se detectó como una banda de 88 kDa (Figura 2.2F), aunque solo observable en la retina de ratón, compatible con el peso molecular calculado a partir de su secuencia de aas. en

esta especie (NP_001304320). Se realizaron diversos experimentos para intentar identificar la proteína LARGE en la retina de las otras especies, utilizando mayores concentraciones del anticuerpo primario y mayores tiempos de exposición, pero no fue posible identificar bandas que indicaran la presencia de esta proteína en la retina de mono, bovina y de rata (datos no mostrados).

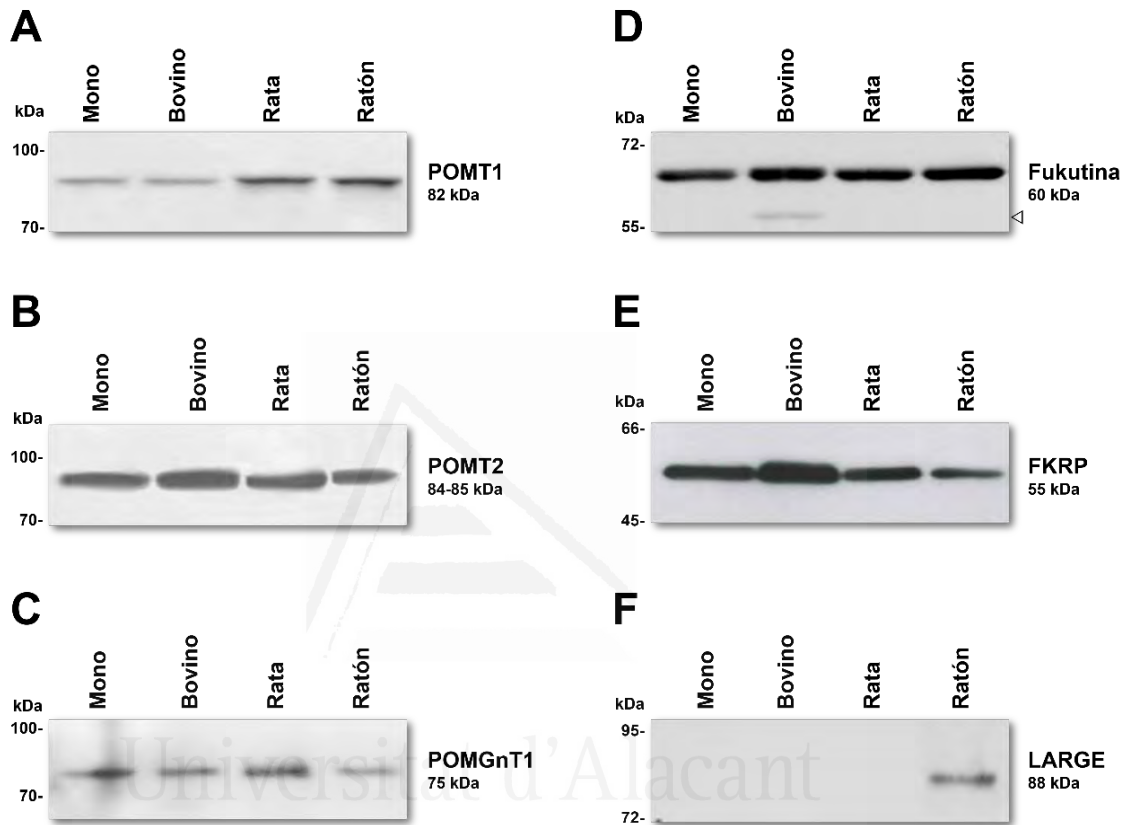


Figura 2.2. Expresión de proteínas asociadas a distroglicanopatías en la retina de mamíferos. Análisis mediante Western blotting de la expresión en la retina neural de las especies indicadas, de las proteínas POMT1 (A), POMT2 (B), POMGnT1 (C), fukutina (D), FKRP (E) y LARGE (F). La masa molecular aparente de las bandas obtenidas se indica a la derecha de cada figura.

2.3.2 Distribución celular de proteínas asociadas a distroglicanopatías en la retina de ratón adulto.

Tras determinar que los genes asociados a DGPs aquí investigados se expresaban en la retina de todas las especies estudiadas, tanto a nivel de ARNm como de proteína, con la única excepción de la proteína LARGE cuya expresión se detectó solo en ratón, se decidió abordar su localización celular en la retina de ratón adulto. Mediante microscopía

confocal de inmunofluorescencia se analizaron diferentes cortes transversales de retina previamente fijadas con paraformaldehído e inmunomarcados con diferentes anticuerpos. Para POMT1, POMT2 y LARGE no se encontraron anticuerpos adecuados para la detección de estas proteínas en tejido. Se utilizaron anticuerpos desarrollados contra múltiples epítomos, adquiridos a partir de diferentes casas comerciales (ver [Anexo, Tabla S2.1](#)), pero no se obtuvieron patrones reproducibles mediante microscopía de inmunofluorescencia.

2.3.2.1 Inmunolocalización de la proteína POMGnT1 en la retina neural de ratón.

Con el objeto de investigar el perfil de distribución de esta proteína en la retina neural de ratón, se realizó en primer lugar un inmunomarcaje utilizando un anticuerpo específico contra la proteína POMGnT1 ([Tabla 2.3](#)), con el fin de identificar los distintos tipos celulares y capas de la retina en los que se expresaba. Dicho análisis permitió localizar a POMGnT1 únicamente en los segmentos internos (SI) de los fotorreceptores ([Figura 2.3A, D](#); asterisco), concentrada en una banda inmunorreactiva visible inmediatamente por encima de los núcleos de los fotorreceptores teñidos con DAPI ([Figura 2.3B](#)). La señal observada en los vasos sanguíneos resultó ser no específica ([Figura 2.3A, D](#)), ya que también se obtenía en ausencia del anticuerpo primario (datos no mostrados). Para localizar con más precisión la región subcelular de los fotorreceptores en la que se expresaba la proteína, se realizó un doble inmunomarcaje incluyendo el anticuerpo contra la arrestina de conos (cArr), un marcador específico de este tipo de células. Ello permitió localizar a POMGnT1 en la región mioide de los conos, porción que contiene el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi ([Figura 2.3C](#)). Para precisar su localización entre estos dos orgánulos, se realizaron dobles inmunotinciones usando los anticuerpos contra POMGnT1 y GM130 ([Figura 2.3E](#)), esta última una proteína de la región *cis*-Golgi usada como marcador de este orgánulo. Se encontró una significativa colocalización del inmunomarcaje de estas dos proteínas ([Figura 2.3E,E'](#)) en la capa de los SI de los fotorreceptores. La localización del aparato de Golgi en la porción mioide de los conos, doblemente inmunomarcado con el anticuerpo contra cArr se observa en la [Figura 2.3F](#).

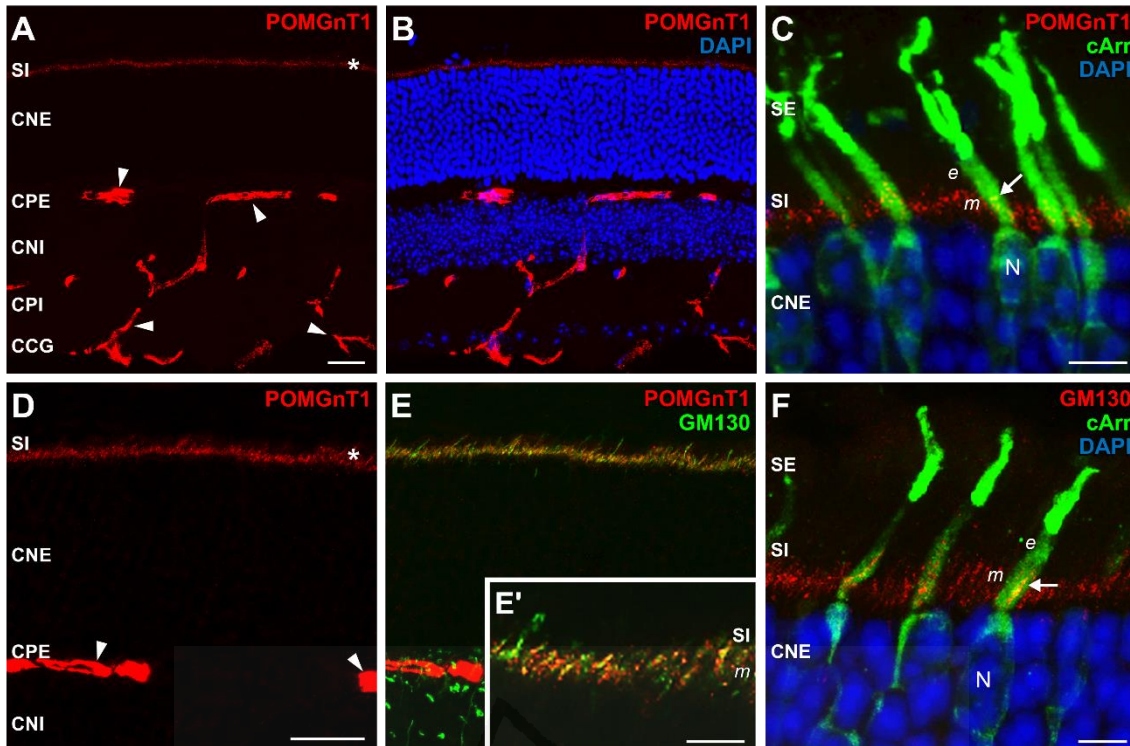


Figura 2.3. Inmunolocalización de POMGnT1 en la retina de ratón. Se muestran secciones de retina de ratón doblemente inmunomarcadas para POMGnT1 (A-E; rojo) y arrestina de conos (cArr; C, F; verde) o GM130 (E, verde; F, rojo). POMGnT1 aparece inmunorreactiva en la capa del SI de los fotorreceptores (A, D; asterisco). Los núcleos teñidos con DAPI aparecen en azul (B, C, F). Las cabezas de flecha (A, D) apuntan a la inmunotinción no específica de los vasos por el anticuerpo secundario contra IgG de ratón. POMGnT1 se localiza en la porción mioide de los conos, donde su inmunotinción se superpone a la del marcaje de cArr (C; flecha) y se observa colocalizándose con GM130 (E, E', amarillo). En F se observa la superposición de GM130 con cArr en el mioide de los conos (flecha). Los puntos rojos de POMGnT1 que no se superponen a la cArr en los SI (C) se atribuyen a los fotorreceptores de tipo bastón. Abreviaturas: SI, segmentos internos; CNE, capa nuclear externa; CPE, capa plexiforme externa; CNI, capa nuclear interna; CPI, capa plexiforme interna; CCG, capa de células ganglionares; SE: segmentos externos; e, elipsoide; m, mioide; N, núcleo. Barras de escala: 20 μ m, excepto en C, E' y F: 5 μ m.

2.3.2.2 Patrón de expresión de la proteína fukutina en la retina neural de ratón.

La localización de la proteína fukutina en células retinianas es desconocida. En este trabajo se emplearon técnicas de microscopía de inmunofluorescencia con el fin de caracterizar el patrón de distribución de esta proteína en la retina de ratón. La fukutina se concentraba en diferentes capas de la retina (Figura 2.4A,B), aunque principalmente en los segmentos externos (SE) de los fotorreceptores y en las capas plexiforme externa (CPE) e interna (CPI). También se observó una inmunorreactividad más débil en las capas nuclear externa (CNE), nuclear interna (CNI) y de células ganglionares (CCG). Con el

objeto de identificar los subtipos y/o los compartimentos celulares donde se expresaba la proteína, se realizó un doble inmunomarcaje para la fukutina en combinación con un anticuerpo contra la S-arrestina (S-Arr; [Figura 2.4C](#)), una proteína que se expresa predominantemente en los segmentos internos y externos de los fotorreceptores además de en la región perinuclear de estas células ([Mendez et al., 2003](#)). Esta doble inmunotinción no detectó colocalización de la fukutina con la S-Arr, pero sí permitió localizar esta proteína en los segmentos internos de los fotorreceptores, en concreto entre la porción mioide y elipsoide ([Figura 2.4C'](#); flechas), así como en los pedículos de los conos en la CPE ([Figura 2.4C''](#); asteriscos).

Dada la similitud del patrón de inmunofluorescencia ya descrito para la fukutina con el que presentan las mitocondrias en la retina de mamíferos ([Stone et al., 2008](#)), se realizó un doble inmunomarcaje para la fukutina con un anticuerpo contra el citocromo c ([Figura 2.4D](#)), una proteína abundante en la membrana mitocondrial interna. La fukutina y el citocromo se colocalizaban parcialmente en múltiples áreas de la retina ([Figura 2.4D](#); pixeles naranja-amarillentos), indicando que estas dos proteínas se encontraban en estrecha aposición. Esta interrelación fue predominante en los SI de los fotorreceptores ([Figura 2.4D'](#)). Además, la fukutina también se encontraba en estrecha aposición a las mitocondrias presentes en la CNE y la CPE ([Figura 2.4D',D''](#); cabezas de flecha). Se realizaron dobles inmunomarcajes adicionales para la fukutina y anticuerpos contra los marcadores de retículo endoplásmico (KDEL) y aparato de Golgi (GM130), pero en estas inmunotinciones no se observó localización entre las proteínas (datos no mostrados).

2.3.2.3 Inmunolocalización de la proteína FKRП en la retina neural de ratón.

Al igual que para la fukutina, el patrón de expresión de FKRП no ha sido analizado en la retina de mamíferos. Para estudiar su localización en este tejido, se realizó un análisis de microscopía de fluorescencia confocal en secciones verticales de retina de ratón. Como se muestra en la [Figura 2.5A](#), la proteína FKRП se distribuía en diferentes capas de la retina: en los SI de los fotorreceptores, en la CPE, en la CNI y en la CCG. Dado que FKRП actúa junto a con la fukutina en la adición de un tándem de moléculas de ribitol 5-fosfato

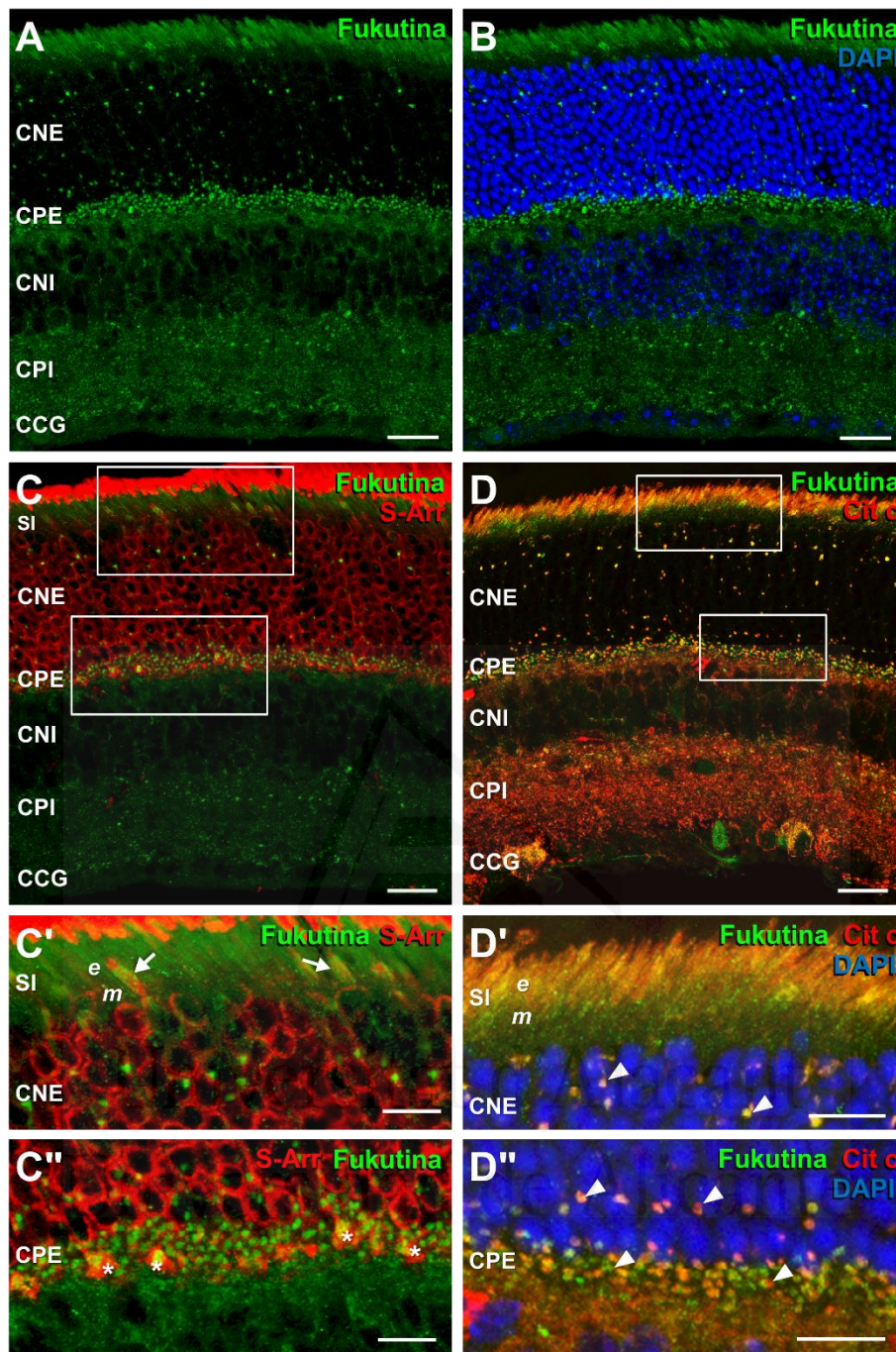


Figura 2.4. Inmunolocalización de la fukutina en la retina de ratón. Se muestran secciones de retina de ratón doblemente inmunomarcadas para la fukutina (A-D, verde) y S-arrestina (S-Arr, C; rojo) o el citocromo c (Cit c, D; rojo). La fukutina se encuentra concentrada en los SI de los fotorreceptores, la CPE y la CPI (y con menor intensidad en la CNE, CNI y CCG). Los núcleos teñidos con DAPI aparecen en azul (B). El doble inmunomarcaje para la fukutina y S-Arr indica la localización de aquella entre las regiones mioide y elipsoide del SI (C'; flechas) y en los pedículos de los conos (C''; asteriscos). En D se observa la colocalización parcial de la fukutina con el Cit c en los SI de los fotorreceptores (píxeles amarillos y naranjas; cabezas de flecha), en las mitocondrias adyacentes a los núcleos de conos y bastones en la CNE y en las mitocondrias de esférulas y pedículos en la CPE (píxeles naranjas; cabezas de flecha). Abreviaturas: CNE, capa nuclear externa; CPE, capa plexiforme externa; CNI, capa nuclear interna; CPI, capa plexiforme interna; CCG, capa de células ganglionares; SI, segmentos internos; e, elipsoide; m, mioide. Barras de escala: 20 μm , excepto en C', C'', D' y D'': 10 μm

al núcleo estructural M3, en de la vía de *O*-manosilación del α -DG (Kanagawa *et al.*, 2016), y teniendo en cuenta la localización de la proteína fukutina en estrecha aposición con las mitocondrias, se llevó a cabo un doble inmunomarcaje con anticuerpos contra FKRP y la citocromo c (Figura 2.5C). Como resultado se observó proximidad entre ambas proteínas en la CPE, pero con ausencia de colocalización (Figura 2.5C'). Con el objeto de esclarecer la distribución subcelular de FKRP, se realizó una doble inmunotinción frente a esta proteína y el marcador del Golgi, GM130 (Figura 2.5D). Estos experimentos revelaron la existencia de colocalización entre ambas proteínas en los SI de los fotorreceptores (Figura 2.5C', cabezas de flecha), así como en la CNI y en la CCG (Figura 2.5C, cabezas de flecha), poniendo de manifiesto la localización de FKRP en el aparato de Golgi en todas las células de la retina de ratón.

Una vez establecida la localización de la proteína FKRP en la CPE, se investigó su distribución subcelular en esta capa de la retina, donde los fotorreceptores, las células bipolares y las células horizontales establecen sinapsis (Tom Dieck & Brandstätter, 2006). Para esto se realizaron dobles inmunomarcajes con anticuerpos contra FKRP, CtBP2 (proteína estructural de la cintilla sináptica), β -DG y calbindina (un marcador de células horizontales). La proteína FKRP se observó localizada en proximidad a la cintilla sináptica, bajo la estructura en forma de herradura que forma la proteína CtBP2 (Figura 2.6A-C). También se encontró colocalizando con la subunidad β del DG en la membrana presináptica de los fotorreceptores (Figura 2.6D-F), y adyacente a las prolongaciones dendríticas de las células horizontales marcadas con el anticuerpo contra la calbindina (Figura 2.6G-I). Todos estos resultados son indicativos de que FKRP se encuentra en estrecha aposición con el DG, posiblemente en la misma membrana plasmática del terminal axónico de los fotorreceptores.

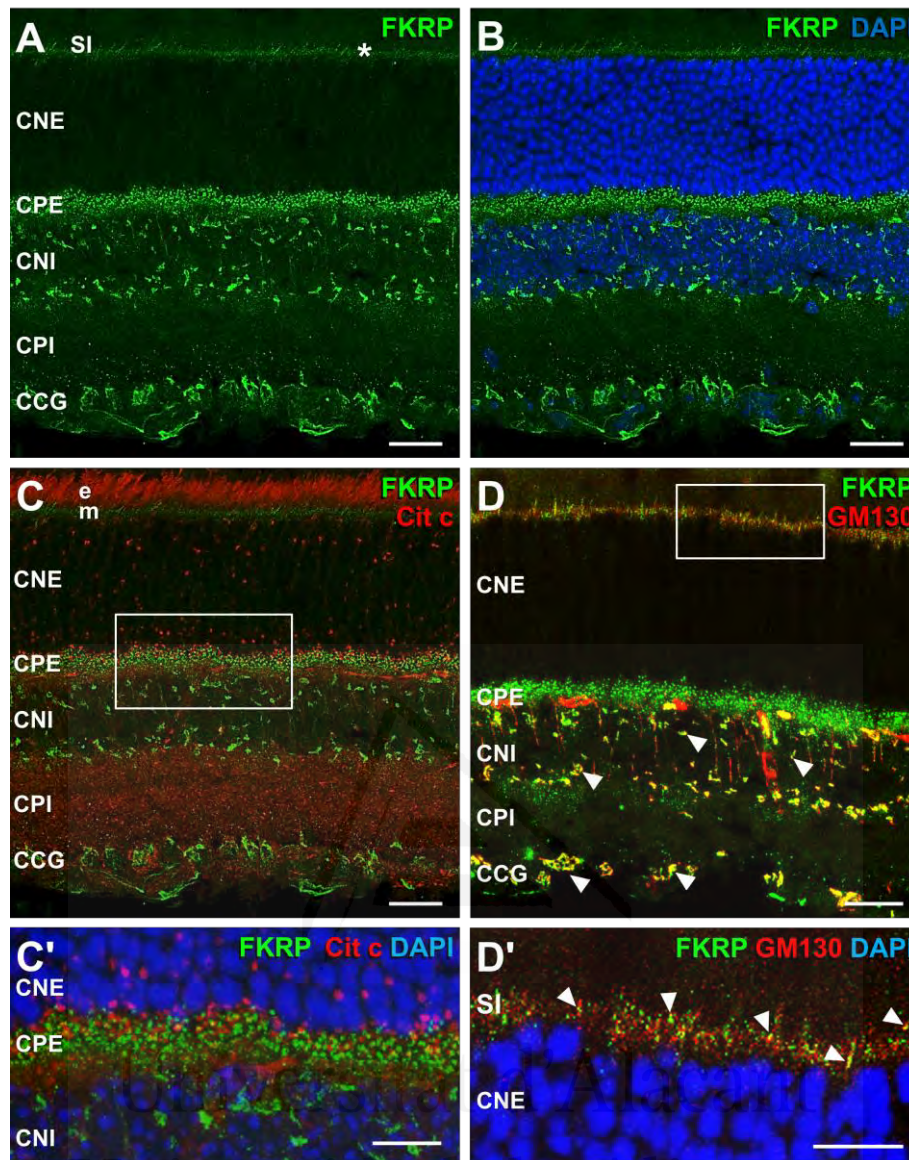


Figura 2.5. Inmunolocalización de FKRP en la retina de ratón. Se muestran secciones de retina de ratón doblemente inmunoteñidas para FKRP (A-D, F; verde) y el marcador específico de mitocondrias, citocromo c (Cit c, C; rojo) o el marcador específico del aparato de Golgi, GM130 (D, rojo). FKRP mostró inmunorreactividad en los SI de los fotorreceptores (A, asterisco), en la CPE, en la CNI y en la CCG (A,D). Los núcleos teñidos con DAPI aparecen en azul (B). El doble inmunomarcaje para FKRP y el Cit c no mostró colocalización de estas proteínas en ninguna capa de la retina (C,). En la doble inmunotinción de FKRP con GM130 se aprecia colocalización en los SI de fotorreceptores, en la CNI y en la CCG (D; cabezas de flecha). Los recuadros blancos en C y D se muestran ampliados en C' y D', respectivamente. Abreviaturas: CNE, capa nuclear externa; CPE, capa plexiforme externa; CNI, capa nuclear interna; CPI, capa plexiforme interna; CCG, capa de células ganglionares; SI, segmentos internos; e, elipsoide; m, mioide. Barras de escala: 20 μ m, excepto en C' y D': 10 μ m.

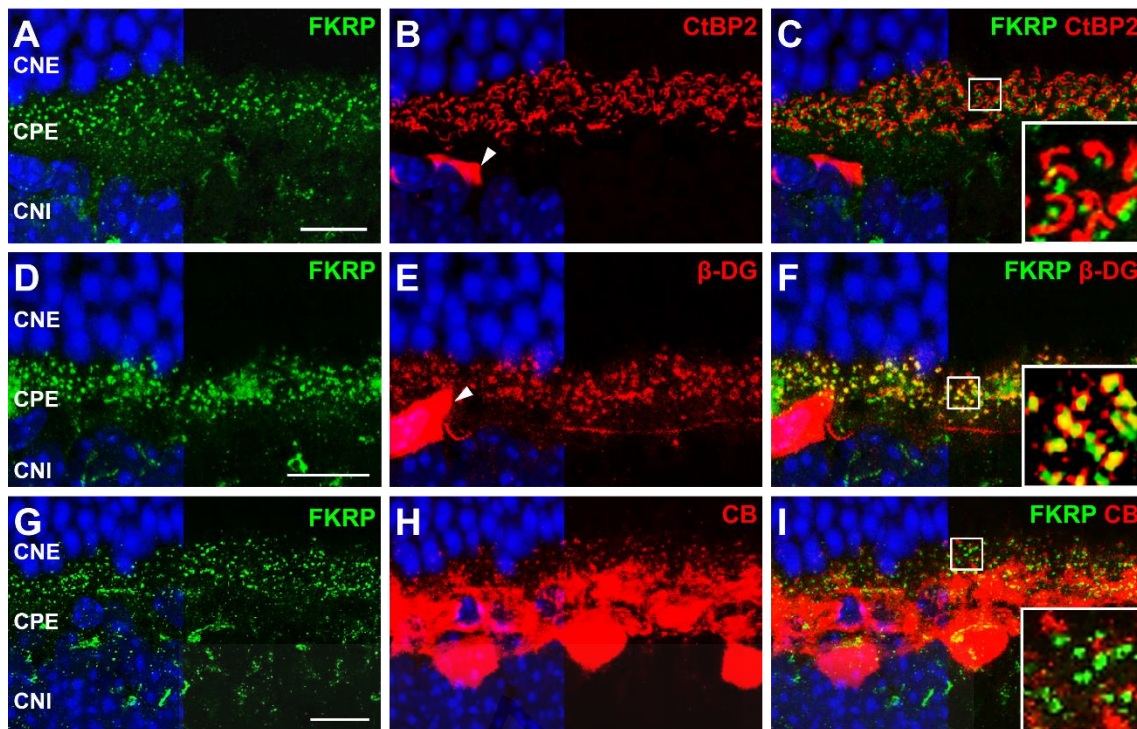


Figura 2.6. Distribución de FKRP en la capa plexiforme externa de la retina de ratón. Se muestran secciones de la CPE de la retina de ratón doblemente inmunomarcadas para FKRP (**A,D,G**; verde) y las proteínas CtBP2 (**B**; rojo), β -DG (**E**; rojo) y calbindina (CB) (**H**; rojo). Los núcleos teñidos con DAPI aparecen en azul en la mitad izquierda de cada micrografía. FKRP no mostró colocalización con las proteínas CtBP2 (**C**) ni calbindina (**I**). Por el contrario, con el β -DG se encontró colocalizando en la CPE (**F**; píxeles amarillos). Las ampliaciones en la parte inferior derecha de **C**, **F** e **I** corresponden a los recuadros blancos en cada micrografía. Las cabezas de flecha (**B,E**) indican inmunotinción no específica de los vasos de la retina con el anticuerpo secundario contra IgG de ratón. Abreviaturas: CNE, capa nuclear externa; CPE, capa plexiforme externa; CNI, capa nuclear interna. Barras de escala: 10 μ m.

2.4 Discusión

Las distroglicanopatías constituyen un grupo de distrofias neuromusculares hereditarias que afectan al músculo, SNC y ojo, y cuya base patológica es una deficiencia en la glicosilación del α -DG (Bouchet-Séraphin *et al.*, 2015; Dobson *et al.*, 2013; Endo, 2015; Godfrey *et al.*, 2011; Hewitt, 2009; Wells, 2013). La primera mutación identificada como causante de este tipo de enfermedades, en concreto la FCMD, fue detectada en Japón (Kobayashi *et al.*, 1998), tratándose de una mutación fundadora ancestral posteriormente mapeada en el gen codificador de la fukutina (*FKTN*) (Kobayashi *et al.*, 2001). No obstante, hasta la fecha se han descrito más de 20 pacientes no japoneses con distrofias musculares congénitas-distroglicanopatías (MDDG) y mutaciones en el gen *FKTN*, algunos con fenotipo de FCMD (Lee *et al.*, 2009) y otros con fenotipos más graves, como WWS y MEB (Cotarelo *et al.*, 2008; Silan *et al.*, 2003; Yis *et al.*, 2011). Posteriormente se identificaron mutaciones en el gen *POMGNT1*, como asociado a la MEB (Yoshida *et al.*, 2001), al WWS y a otras distroglicanopatías menos severas (Clement *et al.*, 2008; Hehr *et al.*, 2007; Mercuri *et al.*, 2009; Yoshida *et al.*, 2001). El gen *FKRP* fue también relacionado con diferentes formas de MDDG (Brockington *et al.*, 2001; Mercuri *et al.*, 2003), y poco después se encontraron mutaciones en los genes *POMT1* (Beltrán-Valero de Bernabé *et al.*, 2002) y *POMT2* (van Reeuwijk, 2005) asociadas a WWS. Mutaciones en el gen *LARGE* se asociaron a distroglicanopatías severas como WWS y MEB, y a otras menos graves pero que cursaban con retraso mental (Clement *et al.*, 2008; Longman *et al.*, 2003; Mercuri *et al.*, 2009).

La mayoría de las proteínas que participan en la ruta de glicosilación del α -DG han sido localizadas en el músculo esquelético. Los genes *POMT1* y *POMT2* han sido detectados en varios tejidos, y con mayor intensidad en el cerebro y testículos además del músculo (Jurado *et al.*, 1999; Willer *et al.*, 2002; Yamamoto *et al.*, 2004). En este trabajo hemos detectado por primera vez la expresión de estos dos genes tanto a nivel de ARNm como de proteína en la retina neural humana, de mono, bovina, de rata y de ratón. Las proteínas *POMT1* y *POMT2* migraban en geles de electroforesis y Western blots con una *Mr* aparente de 82 kDa y 84-85 kDa (según la especie), respectivamente. A nivel endógeno, *POMT1* había sido detectada anteriormente con una masa molecular

de aprox. 72 kDa en el corazón y músculo esquelético de ratón (Prados *et al.*, 2007), si bien este valor, a diferencia de nuestros resultados, no se correspondía con la masa molecular de esta proteína calculada a partir de su secuencia de aminoácidos.

La expresión *POMGNT1* se ha detectado a nivel de ARNm en el sistema nervioso central (SNC), corazón, páncreas, hígado, riñones y otros órganos humanos (Yamamoto *et al.*, 2004; Yoshida *et al.*, 2001). A nivel de proteína se ha detectado en biopsias musculares de pacientes con MEB e individuos sanos (Oliveira *et al.*, 2008; Saredi *et al.*, 2012), en glioblastomas y tejido cerebral sano (Lan *et al.*, 2015), y en múltiples líneas celulares establecidas (Jiao *et al.*, 2013; Pereira *et al.*, 2014; Raducu *et al.*, 2012; Tachikawa *et al.*, 2012; Xiong *et al.*, 2006). En este trabajo se ha hecho extensiva la presencia de *POMGNT1* a la retina neural de las especies de mamíferos estudiadas, donde hemos detectado expresión del gen *POMGNT1* tanto a nivel de ARNm como de proteína.

El gen *FKTN* se ha visto expresado a nivel de ARNm en una amplia variedad de tejidos humanos fetales y adultos, sanos y tumorales, y a con niveles más elevados en el corazón, el cerebro, el músculo esquelético y el páncreas (Hiroi *et al.*, 2011; Kobayashi *et al.*, 2001, 1998; Oo *et al.*, 2016; Sasaki *et al.*, 2000; Taniguchi-Ikeda *et al.*, 2011; Yamamoto *et al.*, 2004, 2002). Se ha detectado expresión de la proteína fukutina también en corazón, músculo esquelético y cerebro humano, además del páncreas, hígado, pulmones, linfoblastos y riñones (Hiroi *et al.*, 2011; Saito *et al.*, 2000; Sasaki *et al.*, 2000; Taniguchi-Ikeda *et al.*, 2011; Yamamoto *et al.*, 2008, 2004, 2002). En este trabajo hemos detectado expresión del ARNm y la proteína producto del gen *FKTN* en la retina neural de todos los vertebrados estudiados. En los Western blots, la fukutina migraba con una *Mr* aparente de 60 kDa, en concordancia con el tamaño descrito previamente en diferentes órganos humanos como el cerebro, la medula espinal, la piel, el riñón y el cuello uterino (Saito *et al.*, 2000; Yamamoto *et al.*, 2008, 2002), en la línea de mioblastos de ratón C2C12 (Matsumoto *et al.*, 2004), y en una línea celular 1321N1 de astrocitoma humano (Yamamoto *et al.*, 2012). La discrepancia con la *Mr* predicha a partir de la secuencia de aminoácidos de la proteína fukutina (53-54 kDa) puede explicarse, al menos en parte, en base al procesamiento alternativo del ARNm del gen, o a posibles modificaciones post-traduccionales de la proteína. En este contexto, en este

trabajo se ha identificado también una posible isoforma de la proteína fukutina en la retina neural bovina, con una masa molecular de aprox. 56 kDa. Si bien se han descrito diferentes transcritos alternativos del gen *FKTN* que podrían originar potencialmente diferentes isoformas de la proteína fukutina en otros tejidos (Kobayashi *et al.*, 2001), en la retina sería preciso abordar este tipo de investigaciones. Esta cuestión requiere, en definitiva, estudios experimentales más amplios.

Los transcritos de gen *FKRP* también se expresan en una amplia variedad de tejidos, con mayores niveles en músculo esquelético, placenta y corazón (Brockington *et al.*, 2001). En este trabajo hemos detectado expresión de *FKRP* tanto a nivel de ARNm como de proteína en la retina neural de todas las especies de mamíferos estudiadas, incluidos roedores (rata y ratón), vaca y primates (mono y humano). *FKRP* migraba con una *Mr* aparente de 55 kDa, consistente con la masa molecular predicha a partir del transcrito canónico de *FKRP* y con los resultados obtenidos por otros autores en músculo esquelético humano y de ratón (Beedle *et al.*, 2007; Keramaris-Vrantsis *et al.*, 2007; Matsumoto *et al.*, 2004).

La expresión del ARNm de *LARGE* se ha evidenciado mediante Northern blotting, dot blot, RT-PCR e hibridación *in situ* en diferentes tejidos humanos como el cerebro, corazón, músculo esquelético, estómago, vejiga, páncreas, placenta, pulmón e hígado, y en embriones de ratón (Grewal *et al.*, 2005; Peyrard *et al.*, 1999). Además se ha descrito un transcrito del gen *LARGE* de ~4.7 kb en la retina de ratón (Lee *et al.*, 2005). En este trabajo se detectó la expresión del gen *LARGE* a nivel de ARNm en la retina de todas las especies estudiadas, y mediante secuenciación de los productos obtenidos se confirmó la especificidad de los cebadores diseñados para este propósito. A nivel de proteína también se ha determinado la expresión de *LARGE* en diversos tejidos, y a niveles más elevados en el corazón, cerebro, músculo esquelético y riñón (Brockington *et al.*, 2005; Goddeeris *et al.*, 2013; Willer *et al.*, 2014). Sin embargo, en la retina no se había descrito hasta la fecha la expresión de esta proteína, a pesar de que en algunas de las patologías relacionadas con mutaciones en este gen, se observan daños estructurales en la retina. En nuestro análisis mediante Western blotting se detectó únicamente la proteína *LARGE* en la retina de ratón, migrando con una *Mr* de 88 kDa (Figura 2.2F) consistente con la masa molecular predicha a partir de su secuencia de aminoácidos.

Aunque no se detectaron bandas en las demás especies, estos resultados no nos permiten descartar que esta proteína se exprese en la retina de los otros mamíferos estudiados, lo cual sería además esperable, siendo necesario para su detección otras técnicas o nuevos anticuerpos que permitan ponerla de manifiesto.

En la retina de mamíferos, el α -DG se ha localizado en la CPE, donde establecen sinapsis los fotorreceptores con las células bipolares y horizontales; en la membrana limitante interna (MLI) en los pies terminales de las células de Müller y en el endotelio de los vasos sanguíneos (Ackroyd *et al.*, 2009; Dalloz *et al.*, 2001; Moukhles *et al.*, 2000; Takahashi *et al.*, 2011). En diferentes modelos animales de DGPs se ha observado un adelgazamiento de las capas nucleares de la retina, con ausencia total o parcial de glicosilación del α -DG y disminución o ausencia de inmunorreactividad de sus proteínas ligando en la MEC: pikachurina en la CPE y laminina en la MLI (Hu *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2013). A nivel fisiológico se ha encontrado una reducción en la amplitud y aumento del tiempo implícito de las ondas a y b del electroretinograma (Liu *et al.*, 2006; Takahashi *et al.*, 2011). Adicionalmente, se ha visto una discontinuidad de la MLI junto con aumento en la reactividad de astrocitos y glía de Müller (Hu *et al.*, 2010; Takahashi *et al.*, 2011). Los genes asociados a DGPs han sido poco estudiados en la retina. El análisis de la expresión de los 6 genes estudiados en este trabajo es el primer paso para identificar la función de sus proteínas producto en la retina neural, y determinar su implicación en los defectos oculares que se presentan en las patologías asociadas. Hasta la fecha, únicamente se ha demostrado la expresión del ARNm de los genes *FKTN* en la retina humana (Hino *et al.*, 2001) y *Pomt1* en la retina embrionaria de ratones (Prados *et al.*, 2007), y a nivel de proteína de POMGnT1 en la retina adulta de ratón (Xu *et al.*, 2016).

Aquí hemos demostrado la expresión a nivel de ARNm y proteína de los genes *POMT1*, *POMT2*, *POMGNT1*, *FKTN*, *FKRP* y *LARGE* en la retina neural de diferentes especies de mamíferos (humano, mono, vaca, rata y ratón), con la excepción de la proteína *LARGE*, cuya expresión únicamente fue detectada en la retina neural de ratón.

Así mismo, mediante estudios inmunohistoquímicos hemos abordado la distribución de POMGnT1 en la retina de ratón. En concreto, POMGnT1 se localiza en

este tejido en los segmentos internos de los fotorreceptores, lugar en el que se concentra la maquinaria biosintética de proteínas de este tipo celular (Young, 1976). En este trabajo hemos demostrado por primera vez la presencia de POMGnT1 en el aparato de Golgi en un tejido adulto de mamífero, la retina. En este contexto, nuestros resultados apoyan que esta proteína desempeña un papel fundamental en los fotorreceptores, es decir, en la glicosilación del α -DG en el aparato de Golgi, que se requiere para la interacción con su ligando en la matriz extracelular de la OPL, la pikachurina (Hu *et al.*, 2011; Kanagawa *et al.*, 2010). Esta unión, a su vez, ha demostrado ser crucial para la estructura y función de las sinapsis que se establece, entre los fotorreceptores y sus células postsinápticas.

Así mismo, hemos empleado técnicas de microscopía confocal con el fin de analizar el patrón de inmunolocalización de la proteína fukutina en la retina de ratón. Nuestros resultados permiten concluir que la fukutina se expresa en todas las diferentes células principales de la retina, y se colocaliza parcialmente con el citocromo c, una proteína perteneciente a la cadena respiratoria mitocondrial.

Por otra parte, el estudio inmunohistoquímico realizado en la retina de ratón adulto permitió localizar la proteína FKRP en el aparato de Golgi de todos los tipos neuronales principales de la retina, distribuidos en los SI, la CNI y la CCG. Estudios anteriores realizados en tejidos humanos (corazón y músculo esquelético), tejidos de ratón (músculo esquelético, músculo cardíaco e hígado), y en líneas celulares transfectadas (CHO, C2C12, NIH3T3, Cos-7, H9c2, MO13.3, SH-SY5Y y mioblastos humanos), indican que la proteína FKRP se localiza preferencialmente en el aparato de Golgi (Alhamidi *et al.*, 2011; Dolatshad *et al.*, 2005; Esapa *et al.*, 2002; Kanagawa *et al.*, 2016; Keramaris-Vrantsis *et al.*, 2007; Torelli *et al.*, 2005; Xu *et al.*, 2013). Sin embargo, también ha sido localizada en el retículo endoplásmico rugoso de miotúbulos en formación (Matsumoto *et al.*, 2004). En la CPE, FKRP se visualizó en forma de un patrón punteado colocalizándose con el β -DG, y distribuida entre la cintilla sináptica de los fotorreceptores (marcada para CtBP2), y las dendritas de las células horizontales (marcadas para calbindina). Dado que el análisis de la secuencia de la proteína FKRP predice que su dominio transmembrana se solapa con un péptido señal (Esapa *et al.*, 2002) y que se ha demostrado que la proteína FKRP es secretada al medio extracelular

in vivo en células musculares de ratón y en células en cultivo (Beedle et al., 2007; Lu et al., 2010), podría explicarse su ubicación en la capa plexiforme externa (CPE), como anclada a la membrana de las células presinápticas, o incluso secretada a la matriz extracelular de la hendidura sináptica de los fotorreceptores. Es necesario realizar investigaciones más amplias para determinar el papel de la proteína FKRP en las sinapsis entre fotorreceptores y sus neuronas postsinápticas, y su relación con las alteraciones fenotípicas oculares en las DGPs asociadas a mutaciones en el gen *FKRP*.

Recientemente se ha dilucidado por completo la 3ª ruta de O-manosilación del α -DG y las proteínas involucradas en su síntesis. En la síntesis de este núcleo M3 participan las proteínas fukutina, FKRP y LARGE. Las dos primeras enzimas añaden secuencialmente moléculas de Rbo5P (ribitol 5 fosfato) en tándem al núcleo iniciado en el retículo endoplásmico, el cual ha sido previamente fosforilado en la posición 6 de la manosa (Kanagawa et al., 2016). Estas moléculas de Rbo5P son necesarias para que la glicosiltransferasa LARGE adicione repeticiones del disacárido xilosa–fucosa, completando así la síntesis del “matriglicano” en el aparato de Golgi (Inamori et al., 2012; Yoshida-Moriguchi & Campbell, 2014). En este trabajo hemos identificado a la proteína fukutina en estrecha aposición al citocromo c, una proteína perteneciente a la cadena respiratoria mitocondrial. Cabe destacar que las células neuronales poseen un retículo endoplásmico complejo que se encuentra en estrecha asociación con las mitocondrias, especialmente en el soma, dendritas, y la terminación sináptica (Berridge, 1998). En la retina de ratón se ha observado que las proteínas calreticulina y SERCA3, dos chaperonas de unión a calcio en el retículo endoplásmico, se encuentran en cercana aposición a las mitocondrias. Particularmente, SERCA3 ha sido observada en los segmentos internos de los fotorreceptores y en la CPE (Johnson et al., 2007). En este contexto, podemos plantear el escenario en la retina, en el cual la proteína fukutina añadiría la primera molécula de Rbo5P al núcleo M3 fosforilado en el retículo endoplásmico y FKRP añadiría la segunda molécula de este azúcar-fosfato en el aparato de Golgi, a partir de la cual continuaría la extensión, que finalizaría con la actuación de la glicosiltransferasa LARGE.

La determinación con la mayor precisión posible de la localización de las enzimas implicadas en la O-manosilación del α -DG, mediante técnicas de microscopía electrónica

y/o fraccionamiento celular, se hace muy necesaria para esclarecer el mecanismo preciso de síntesis de las estructuras O-glicosídicas del α -DG en la retina. Conocer el papel de estas proteínas en el origen de los defectos oculares que se presentan en las distroglicanopatías permitirá la búsqueda de dianas terapéuticas útiles para el tratamiento de las distrofias neuromusculares hereditarias.

Parte de este capítulo ha sido publicado en:

Uribe, M.L., Haro, C., Ventero, M.P., Campello, L., Cruces, J., Martín-Nieto, J., 2016. Expression pattern in retinal photoreceptors of POMGnT1, a protein involved in muscle-eye-brain disease. *Mol. Vis.* 22, 658–73.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

POMGnT1 y POMGnT2: Dos *N*-acetilglucosaminiltransferasas de proteínas que actúan sobre un mismo sustrato, el α -dístroglicano

La síntesis del principal *O*-manosilglicano del α -dístroglicano (α -DG), NeuAc α 2-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-2Man α -*O*-Ser/Thr, esencial para su correcta unión a las proteínas de la matriz extracelular, se inicia con la incorporación de una unidad de manosa a residuos de serina y treonina del dominio de tipo mucina del α -DG, catalizada por las glicosiltransferasas POMT1 y POMT2. En las estructuras glicosídicas M1 y M2, la proteína POMGnT1 se encarga de catalizar el siguiente paso: la adición de un residuo de *N*-acetilglucosamina a la *O*-manosa previamente unida. En la estructura M3 quien se encarga de esta transferencia es la proteína POMGnT2.

Las mutaciones en el gen *POMGNT1* se detectaron inicialmente en pacientes con la enfermedad de músculo-ojo-cerebro (MEB). Posteriormente, el espectro fenotípico se expandió para incluir el síndrome de Walker-Warburg (WWS), la distrofia muscular congénita de Fukuyama (FCMD) y la distrofia muscular de cinturas tipo 2O (LGMD2O). Las mutaciones asociadas al gen *POMGNT2* hasta ahora solo se han descrito en pacientes con WWS y MEB.

En este capítulo se describen dos enzimas que actúan sobre el mismo sustrato: el α -DG. Aunque POMGnT1 y POMGnT2 poseen la misma función, actúan en diferentes compartimentos celulares y no presentan homología en sus secuencias y dominios. Usando diferentes herramientas bioinformáticas y bases de datos de libre acceso en Internet, se realizó un análisis y revisión de la información disponible para obtener una mayor comprensión del conocimiento sobre ellas actualmente disponible.

3.1 Introducción.

Los *O*-manosilglicanos constituyen aproximadamente un 25% del total de *O*-glicanos en el cerebro (Breloy *et al.*, 2012; Chai *et al.*, 1999). Solo un número reducido de proteínas del tejido nervioso y muscular de mamíferos han podido ser identificadas como *O*-manosilproteínas. Además del α -DG en diferentes especies (Chiba *et al.*, 1997; Sasaki *et al.*, 1998; Smalheiser *et al.*, 1998), también las proteínas CD24 (Bleckmann *et al.*, 2009), los receptores (específicos de neuronas) proteína tirosina fosfatasa β (RPTP β) (Abbott *et al.*, 2008), y ζ (RPTP ζ / fosfacán) (Dwyer *et al.*, 2012), la neurofascina (Pacharra *et al.*, 2012), 4 lecticanos (Pacharra *et al.*, 2013), 37 cadherinas y 6 plexinas (Lommel *et al.*, 2013; Vester-Christensen *et al.*, 2013) han sido identificadas como *O*-manosilproteínas. Sin embargo, el α -DG es la proteína cuya función y sitios *O*-manosilados han sido caracterizados con mayor detalle (Stalnaker *et al.*, 2010).

Se sabe que la *O*-glicosilación anormal del α -DG conlleva la patogénesis de diferentes tipos de distrofias neuromusculares, denominadas distroglicanopatías (DGPs), debido a la pérdida de interacción entre el α -DG y las proteínas de la matriz extracelular (MEC) mediada por los *O*-glicanos unidos covalentemente al α -DG, el cual constituye la parte central del complejo distrofina-glicoproteína (DGC) (Barresi & Campbell, 2006)

Los *O*-manosilglicanos han sido caracterizados en el α -DG aislado de diferentes tejidos y órganos, como son nervio periférico bovino (Chiba *et al.*, 1997), cerebro de oveja (Smalheiser *et al.*, 1998) y músculo esquelético de conejo y humano (Nilsson *et al.*, 2010; Sasaki *et al.*, 1998; Stalnaker *et al.*, 2010), además a partir de células en cultivo de la línea HEK293 (Yoshida-Moriguchi *et al.*, 2010). Se han identificado diferentes *O*-manosilglicanos en el α -DG, y la ausencia o reducción de estos se asocia a una migración neuronal anormal y distrofia muscular (Michele *et al.*, 2002). De acuerdo con la nomenclatura más recientemente introducida (Yoshida-Moriguchi *et al.*, 2013), existen tres diferentes estructuras de *O*-manosilglicanos que se unen al DG: el núcleo M1, el núcleo M2 ramificado, y el más recientemente descubierto, núcleo M3 (Figura 3.1).

El primer azúcar con que se inician las cadenas de *O*-manosilglicanos en el α -DG es la manosa. Esta molécula es transferida en el retículo endoplásmico a residuos de serina/treonina de aquél por el heterodímero formado por las proteínas POMT1 y POMT2 (Akasaka-Manyá *et al.*, 2006; Jurado *et al.*, 1999; Manyá *et al.*, 2004; Willer *et al.*, 2002). Más tarde, en el aparato de Golgi, la enzima llamada proteína *O*-manosa β -1,2-*N*-acetilglucosaminiltransferasa 1 (POMGnT1) transfiere una molécula de GlcNAc a la manosa previamente unida, mediante un enlace β -1,2, en los núcleos M1 y M2 (Takahashi *et al.*, 2001) (Figura 3.1). Otra enzima que actúa sobre la manosa para originar la segunda rama del núcleo M2, es la proteína α -1,6-manosilglicoproteína β 1-6-*N*-acetilglucosaminiltransferasa (GnT-Vb o GnT-IX), que actúa tras la acción de POMGnT1 añadiendo una nueva molécula de GlcNAc en paralelo por medio de un enlace β -1,6 (Inamori *et al.*, 2004). Finalmente, en la síntesis del núcleo M3 actúa la enzima recientemente descubierta, llamada proteína *O*-manosa β -1,2-*N*-acetilglucosaminiltransferasa 2 (POMGnT2), también conocida como GTDC2 (Yoshida-Moriguchi *et al.*, 2013) (Figura 3.1).

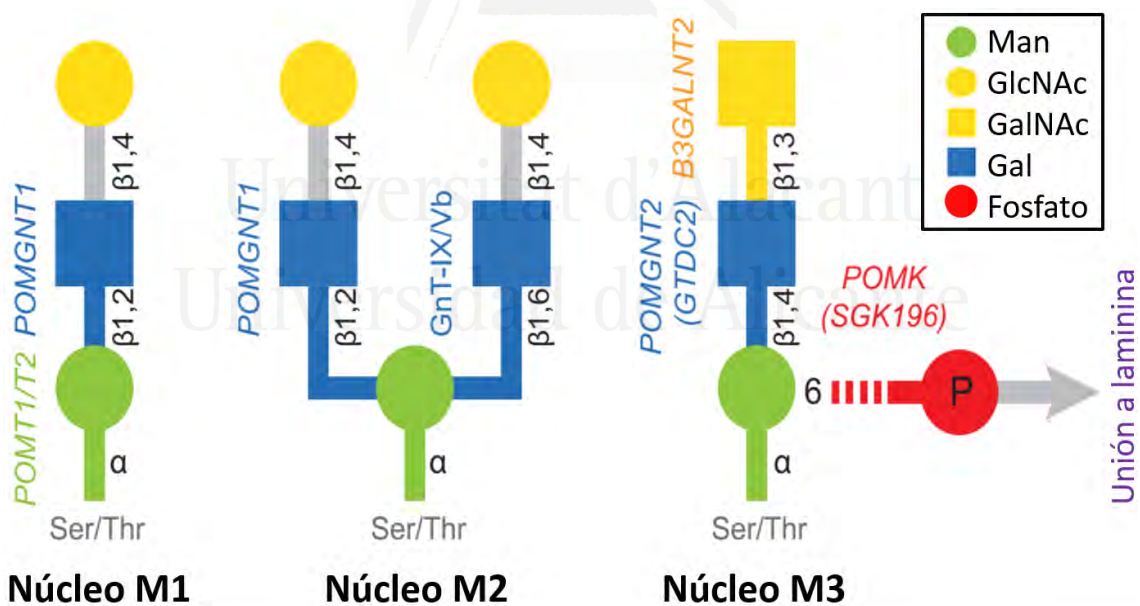


Figura. 3.1. Modelo de estructuras glicosídicas del α -DG (propuesto por Yoshida-Moriguchi *et al.*, 2013). La clasificación propuesta para cada núcleo de *O*-manosilglicano se indica debajo de cada estructura (Núcleo M1-M3). Las enzimas responsables de catalizar cada reacción se indican a la izquierda de su respectiva estructura. En itálicas se indican los correspondientes genes codificantes de proteínas asociadas a distroglicanopatías (*POMT1/2*, *POMGnT1* y *2*, *B3GALNT2* y *POMK*).

En la síntesis de cada una de las tres estructuras de *O*-manosilglicanos que se han descrito en el α -DG, M1-M3, participan varias enzimas. Se han identificado y caracterizado siete β -1,4-galactosiltransferasas humanas (B4GalTs), aunque sigue siendo desconocida la enzima que actúa tras la adición de GlcNAc al α -DG por la enzima POMGnT1 (Endo, 2015). Otras enzimas periféricas que participan en la construcción de los *O*-manosilglicanos unidos al α -DG son galactosiltransferasas, sialiltransferasas, glucuroniltransferasas, sulfotransferasas y la α 1,3-fucosiltransferasa-9, las cuales residen en el aparato de Golgi, pero su mecanismo de acción en la síntesis del *O*-manosilglicano no se ha caracterizado aún (Endo, 2015). En la estructura de unión a laminina mas recientemente descrita (M3), se encuentran involucradas otras enzimas en su síntesis: B3GALnT2 añadiendo galactosa (Yoshida-Moriguchi *et al.*, 2013) y POMK (SGK196) fosforilando la posición 6 de la manosa (Yoshida-moriguchi *et al.*, 2013), y además fukutina, FKR (Kanagawa *et al.*, 2016), B4GAT1 (Praisman *et al.*, 2014; Willer *et al.*, 2014) e ISPD (Riemersma *et al.*, 2015) generando los sustratos para la xilosil- y glucuroniltransferasa LARGE (Inamori *et al.*, 2012) y la xilosiltransferasa TMEM5 (Praisman *et al.*, 2016).

3.2 Proteína *O*-manosa β 1,2-*N*-acetilglucosaminiltransferasa 1

La enzima UDP-*N*-acetilglucosamina: *O*-manosa β -1,2-*N*-acetilglucosaminiltransferasa 1 (POMGnT1), esta codificada por el gen *POMGNT1* (Figura 3.2). Este gen fue aislado por primera vez de una fracción microsomal de cerebro de rata (Takahashi *et al.*, 2001), contiene 22 exones y está localizado en la región 34.1 del brazo corto del cromosoma 1 (1p34.1). Su transcripción constitutiva genera una molécula de ARNm de 2,7 kb en 23 tejidos diferentes como son el músculo esquelético, el riñón, el hígado, la glándula tiroidea, el corazón y el cerebro (Yamamoto *et al.*, 2004; Yoshida *et al.*, 2001). Un transcrito adicional de 3,4 kb se ha detectado en los ganglios linfáticos, médula espinal y tráquea, sugiriendo la presencia de un segundo sitio de inicio de la transcripción o de “splicing” alternativo en estos órganos (Yoshida *et al.*, 2001).

Desde que mutaciones en el gen *POMGNT1* (OMIM: 606822) se relacionaron por primera vez con la enfermedad de músculo-ojo-cerebro (MEB) (Yoshida *et al.*, 2001), se han descrito más de 25 mutaciones independientes en homocigosis en 21 regiones exónicas de este gen (Geis *et al.*, 2016; Jiao *et al.*, 2013; Muntoni *et al.*, 2007; Raducu *et al.*, 2014, 2012; Saredi *et al.*, 2012; Voglmeir *et al.*, 2011; Yiş *et al.*, 2014). La mayoría de estas mutaciones se han asociado a MEB y otras distroglicanopatías como WWS y FCMD, pero muy recientemente se han identificado en otra patología fuera del espectro de las distrofias musculares: la retinosis pigmentaria (Wang *et al.*, 2016; Xu *et al.*, 2016).

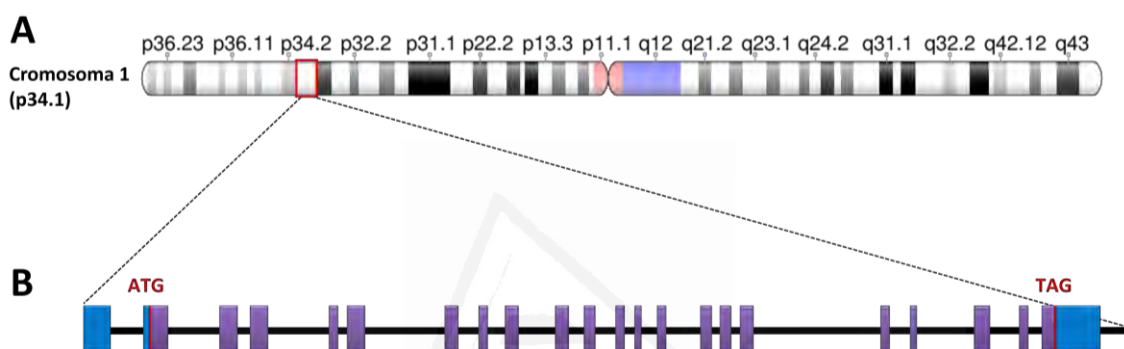


Figura 3.2. Localización cromosómica y estructura del gen *POMGNT1* humano. *POMGNT1* se localiza en el cromosoma 1 (región p34.1, recuadro rojo, **A**) y contiene 22 exones (recuadros azules y púrpuras, **B**). El exón 1 contiene la región 5'-UTR, en el exón 2 se encuentra el codón de iniciación (ATG) y en el exón 22 el codón de terminación (TAG) y la región 3'-UTR. La longitud secuenciada del gen completo es de 31,6 kb (Gene ID: 55624).

POMGnT1 es una proteína de la familia GT13 de glicosiltransferasas (EC2.4.1.101; “Carbohydrate-Active enZymes database”, o CAZY). Su secuencia está constituida por 660 aminoácidos, y su masa molecular predicha es de 75,2 kDa (Yoshida *et al.*, 2001). La secuencia polipeptídica de esta proteína es similar a la de la enzima GnT-I humana (proteína α 3-D-manosa β 1,2-N-acetilglucosaminiltransferasa), involucrada en la biosíntesis de *N*- y *O*-glicanos (Unligil *et al.*, 2000). *POMGnT1* es una proteína típica de membrana de tipo II y se ha demostrado que se localiza en el aparato de Golgi en células Cos-7 transfectadas con el gen humano (Xiong *et al.*, 2006). Basándose en la estructura y secuencia de GnT-I, *POMGnT1* ha sido estructurada en cuatro dominios: N-terminal o cola citoplásmica (Met1-Arg37), transmembranal (Phe38-Ile58), troncal o “stem” (Leu59-Leu300) y catalítico (Asn301-Thr660) (Akasaka-Manyá *et al.*, 2004; Takahashi *et al.*, 2001).

Según diferentes bases de datos y herramientas bioinformáticas, la proteína POMGnT1 cuenta con otros dominios funcionales predichos, los cuales se resumen en la [Figura 3.3](#). En su dominio troncal presenta una secuencia homóloga a la familia de proteínas ILEI (de sus siglas en inglés; Interleukin-like EMT inducer; Pfam PF15711) entre los aminoácidos 129 y 220. En su dominio catalítico presenta una región con una alta homología con el dominio catalítico de GnT-I (Pfam PF03071), subdividido a su vez en una región de unión de UDP-GlcNAc y Mn²⁺ (Asn301-Leu530) y una región específica aceptora implicada en el reconocimiento de la proteína sustrato (Arg531-Glu563) ([Akasaka-Manyá et al., 2004](#)) a([Figura 3.3](#)).

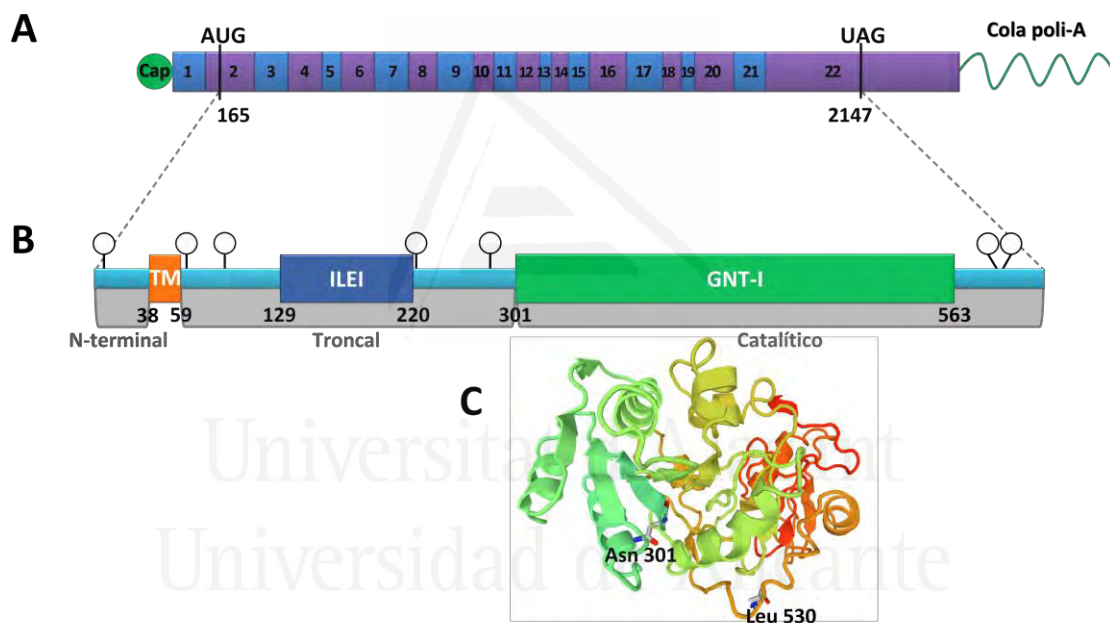


Figura 3.3. Esquema del transcrito de *POMGNT1* humano y la proteína que codifica. A) Estructura en exones del ARNm maduro de *POMGNT1*. **B)** Proteína POMGnT1 humana. Se indican sus dominios estructurales y funcionales: N-terminal; TM, transmembrana; troncal; catalítico; ILEI, “interleukin-like EMT inducer”; y GNT-I, familia de glicosiltransferasas G13. Los círculos blancos sobre la proteína indican posibles sitios de *O*-glicosilación. **C)** Modelo 3D del dominio GNT-I de la proteína POMGnT1 humana basado en la estructura cristalizada de la proteína MGAT1 de conejo (PDB ID: 2AM5). Asn301 y Leu530 corresponden a la región de unión de UDP-GlcNAc y Mn²⁺ ([Akasaka-Manyá et al., 2004](#)). Figura de elaboración propia basada en las anotaciones depositadas en Pfam, NCBI Nucleotide, UniProtKB e InterPro, y con el uso de NetOGly y Swiss-Model ([Biasini et al., 2014](#)).

La función de POMGnT1 se describió por primera vez en 2001 como catalizadora de la transferencia de GlcNAc desde UDP-GlcNAc a residuos de *O*-manosa unidos covalentemente a glicoproteínas ([Yoshida et al., 2001](#)). POMGnT1 se localiza en el

aparato de Golgi, donde su dominio citoplasmático se asocia a la proteína GOLPH3 (fosfoproteína del Golgi 3). Ésta es responsable de dirigir y mantener a POMGnT1 y a otras glicosiltransferasas en el Golgi (Pereira *et al.*, 2014). POMGnT1 también interacciona de forma directa con la fukutina en el aparato de Golgi, a través de su dominio transmembrana (Xiong *et al.*, 2006). En POMGnT1 se han identificado núcleos de *O*-glicosilglicano de tipo mucina, los cuales no afectan su actividad enzimática (Xin *et al.*, 2015). Aunque POMGnT1 no contiene potenciales sitios de *N*-glicosilación, sí presenta posibles sitios de *O*-glicosilación (Figura 3.3, círculos blancos) fuera de su dominio catalítico.

Hasta la fecha se han descrito tres ratones modelo “knockout” (KO) para el gen *Pomgnt1* empleando distintas estrategias, los cuales presentan diferentes fenotipos. Uno de estos modelos se generó mediante inserción de un cassette “gene-trapping” en el exón 2. Este ratón presentó alteraciones musculares, cerebrales y oculares semejantes a los pacientes con MEB, además de una glicosilación anormal del α -DG y una disminución de su actividad de unión a laminina (Hu *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2007). El segundo modelo animal se obtuvo mediante el remplazamiento del exón 18 por un cassette con el gen de resistencia a la neomicina, y mostró un fenotipo muscular más leve que el anterior (Miyagoe-Suzuki *et al.*, 2009). En este modelo también se estudiaron las alteraciones fenotípicas causadas por la mutación en la retina, la cual presentaba desprendimiento, fibrosis vascular y del nervio óptico, y disminución en la amplitud de las ondas a y b de los electroretinogramas (Takahashi *et al.*, 2011). El modelo KO más reciente de *Pomgnt1* se generó mediante el sistema Cre-loxP eliminando los exones 7 a 16 en todas las células embrionarias. Este ratón presentaba lesiones cerebrales de severidad media, además de pérdida de inmunorreactividad del epítipo glicosilado I1H6 del α -DG en diferentes tejidos nerviosos (Booler *et al.*, 2015). También se ha estudiado el efecto de la supresión del gen *pomgnt1* en el pez cebra (Tamaru, 2014). En este modelo “knockdown” se utilizaron oligonucleótidos morfolino antisentido para silenciar dicho gen en los embriones. Los peces con supresión moderada y severa del gen, presentaron disminución del tamaño ocular, morfología anormal de la cola y edema pericardial.

3.3 Proteína O-manosa β 1,4-N-acetilglucosaminiltransferasa 2

POMGNT2 es el gen que codifica la enzima denominada proteína O-manosa β 1,4-N-acetilglucosaminiltransferasa 2. Fue identificado en 2012 mediante la técnica de secuenciación completa de exomas orientada a identificar los genes mutados en pacientes con WWS (Manzini *et al.*, 2012). *POMGNT2* se encuentra localizado en el brazo corto del cromosoma 3 humano (3p22.1; Figura 3.4), y contiene dos exones y un gran intrón con una longitud superior a 24 kb. El primer exón consta de 248 pb, mientras que el segundo contiene 2.307 pb. Este contiene la secuencia codificante de la proteína (ORF), cuyo codón de inicio (ATG) se halla en la base 24655 y el de terminación (TAG) en la base 26397 (Figura 3.4).

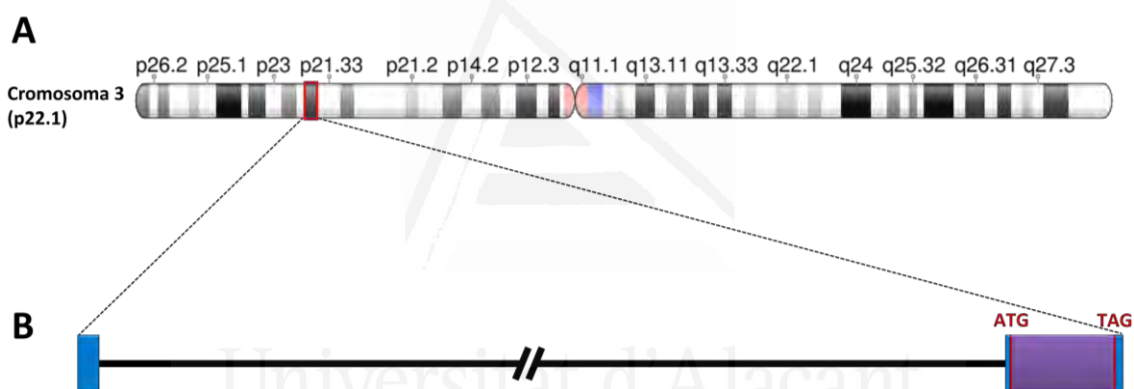


Figura 3.4. Localización cromosómica y estructura del gen *POMGNT2*. *POMGNT2* se encuentra localizado en el cromosoma humano 3 (p22.1, cuadro rojo, **A**) y contiene dos exones (caja azul y púrpura, **B**) y un gran intrón (línea negra). El codón de iniciación (ATG) y el de terminación (TAG) se localizan en el exón 2 de la proteína. La longitud secuenciada del gen es 26,9 kb (Gene ID: 84892).

POMGNT2 presenta altos niveles de expresión en el cerebro, músculo, corazón y riñón, tanto en tejido fetal como en tejido adulto, sugiriendo la importancia de este gen durante el desarrollo de estos órganos (Manzini *et al.*, 2012) en su mayoría afectados en pacientes con DGPs. En enfermos con WWS severo se han identificado tres variantes alélicas distintas en homocigosis del gen *POMGNT2* (Manzini *et al.*, 2012). Recientemente en tres pacientes con distrofia muscular de cinturas (LGMD) de grado medio, también se encontraron variantes alélicas en homocigocis y heterocigocis de este gen (Endo *et al.*, 2015).

POMGnT2 es una proteína residente del retículo endoplásmico que cataliza la adición de GlcNAc a la *O*-manosa del α -DG en su dominio de tipo mucina, necesario para la unión de aquel a la laminina (Ogawa *et al.*, 2013; Yagi *et al.*, 2013; Yoshida-Moriguchi *et al.*, 2013). Se trata de una glicosiltransferasa de la familia GT61 (EC2.4.1.94; CAZy), que en nuestra especie está formada por 582 aminoácidos y tiene una masa molecular calculada a partir de su secuencia de 66,6 kDa. Esta proteína contiene tres dominios topológicos potenciales (UniProtKB): una cola citoplasmática (Met1-Ser4), una región transmembrana (Ala5-Leu25) y un dominio luminal (Arg26-Thr580). POMGnT2 presenta tres dominios funcionales predichos: un péptido señal en su extremo N-terminal (Met1-Ala16) que le permite unirse a la membrana del ER (Manzini *et al.*, 2012), un dominio catalítico perteneciente a la familia de glicosiltransferasas GT61 (Met165-Val391; IPR007657) y un dominio fibronectina tipo III (Ala488-Thr580) (Figura 3.5).

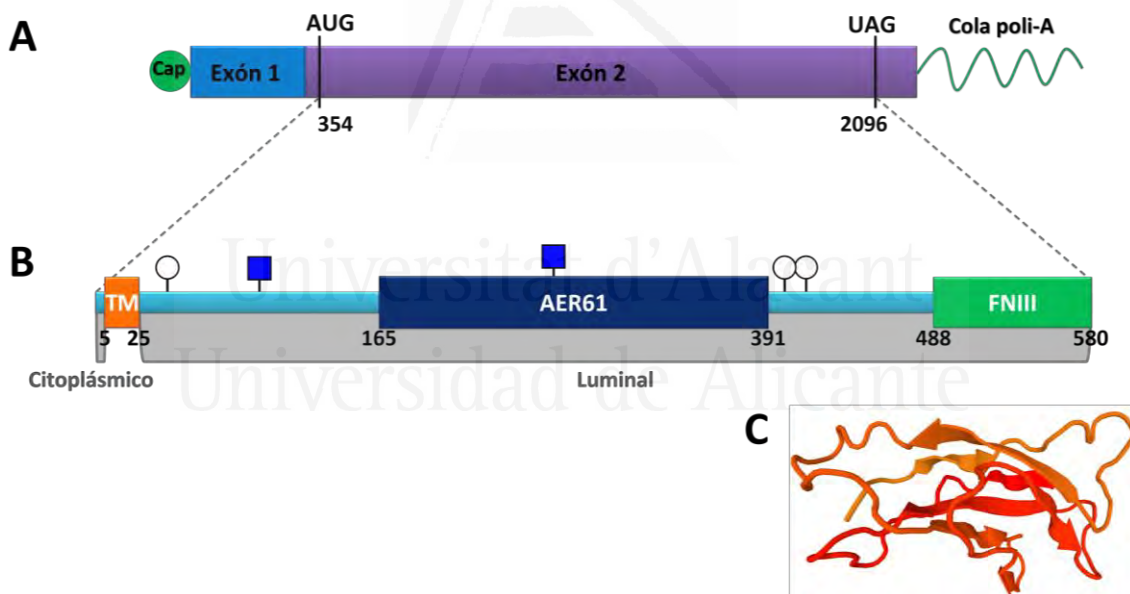


Figura 3.5. Esquema del ARNm de *POMGNT2* humano y su proteína producto. A) Estructura en exones del ARNm maduro de *POMGNT2*. **B)** Proteína *POMGnT2* humana. Se indican sus dominios estructurales y funcionales: citoplásmico; TM, transmembranal; luminal; AER61, familia de glicosiltransferasas GT61 (DUF563); y FNIII, fibronectina tipo III. Los círculos blancos sobre la proteína indican posibles sitios de *O*-glicosilación y los cuadrados azules posibles sitios de *N*-glicosilación. **C)** Modelo 3D del dominio FNIII de la proteína *POMGnT2* humana, basado en la estructura cristalizada de la proteína FND3A humana (PDB ID: 2CRZ). Esquemas de elaboración propia basados en las anotaciones de Pfam, NCBI Nucleotide, UniProtKB e InterPro, y usando las herramientas on-line NetNGly, NetOGly y Swiss-Model (Biasini *et al.*, 2014).

POMGnT2 interacciona selectivamente y de forma no covalente con ciertas proteínas o complejos proteicos. Su actividad de glicosilación se continúa en el retículo

endoplásmico por la proteína B3GALnT2, quien añade una molécula de *N*-acetilgalactosamina a la *N*-acetilglucosamina unida previamente (Figura 3.1). El trisacárido GalNAc β 1-3GlcNAc β 1-4Man α 1-*O*-Ser/Thr más tarde es reconocido por la proteína POMK (SGK196), encargada de fosforilar la posición 6 de la *O*-manosa (Yoshida-Moriguchi *et al.*, 2013).

Aunque POMGnT2 es una proteína que ha sido recientemente asociada a distroglicanopatías, ya se han desarrollado modelos animales para su estudio. Yagi *et al.*, (2013) han generado un ratón KO portador de un alelo del gen *Pomgnt2* inactivado mediante la sustitución de parte del exón codificante (2) por un gen de resistencia a neomicina. Los ratones homocigotos para este alelo presentaron un tamaño ligeramente menor que los controles y murieron durante el primer día de nacimiento (Yagi *et al.*, 2013). En este estudio se observó una formación anómala de la lámina basal cerebral, con defectos en la migración neuronal y en la organización laminar de la corteza. También se ha estudiado el efecto de la pérdida de expresión de la proteína POMGnT2 sobre el desarrollo cerebral y muscular del pez cebra, mediante el uso de dos oligonucleótidos morfolino antisentido contra el codón de inicio y el sitio donador de corte-empalme del intrón 1. En este animal knock-down se observó que a medida que disminuía la expresión del gen *pomgnt2* se originaban rasgos típicos de WWS, como son hidrocefalia, defectos oculares y distrofia muscular (Manzini *et al.*, 2012).

3.4 Análisis bioinformático de POMGnT1 y POMGnT2.

Si bien las proteínas POMGnT1 y POMGnT2 actúan en la *O*-manosilación del α -DG (Yoshida-Moriguchi *et al.*, 2013) adicionando el mismo azúcar (GlcNAc), lo hacen mediante enlaces distintos (β 1-2 y β 1-4) y en diferentes compartimentos sub-celulares: aparato de Golgi (Xiong *et al.*, 2006) y retículo endoplásmico (Yoshida-Moriguchi *et al.*, 2013), respectivamente. En este trabajo hemos realizado varios análisis bioinformáticos utilizando diferentes herramientas de libre acceso en Internet (“webtools”), con el objetivo de resumir y estructurar la información disponible sobre de estas dos proteínas en las bases de datos públicas.

3.4.1 Adquisición de datos.

Como semilla utilizamos las secuencias de POMGnT1 y POMGnT2 designadas como canónicas en la base de datos UniProtKB [<http://www.uniprot.org/>]. Las secuencias Q8WZA1 de POMGnT1 y Q8NAT1 de POMGnT2 humanas fueron descargadas en formato FASTA y se utilizaron para el análisis *in silico* mediante diferentes herramientas bioinformáticas, como se describe a continuación.

3.4.2 Análisis filogenético y búsqueda de ortólogos.

La conservación de determinadas secuencias proteicas puede reflejar su posible función en un organismo. Con el objetivo de identificar un patrón evolutivo en estas dos proteínas entre diferentes especies seleccionadas, se utilizó un método basado en la filogenia. Las secuencias de las proteínas para cada especie fueron recuperadas utilizando la herramienta BLAST (Basic Local Alingment Search Tool) [<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>] del NCBI (Altschul *et al.*, 1990), que permite a partir de una secuencia “query” realizar alineamientos con todas las secuencias de la base de datos seleccionada “target”.

Inicialmente realizamos un alineamiento global pareado, utilizando la herramienta EMBOSS Stretcher con los parámetros por defecto [http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_stretcher/] (Li *et al.*, 2015). Se usaron como secuencias semilla las de POMGnT1 y POMGnT2 humanas para identificar zonas de similitud o identidad, que podrían indicar relaciones funcionales o evolutivas, y verificar si comparten dominios topológicos o funcionales en sus estructuras (Figura 3.6). El porcentaje de identidad, que mide las coincidencias por cada 100 posiciones analizadas, en esta comparación de secuencias fue bajo (16,3 %). Sin embargo, se pudo observar que los dominios catalíticos de ambas proteínas, GNT-I y AER61, los cuales pertenecen a las familias de glicosiltransferasas GT13 y GT61, respectivamente, poseen un cierto grado de similitud, que les permite su alineamiento y la identidad de algunos aminoácidos. El grado de similitud de las dos proteínas en el alineamiento global fue del 29%.

PMGT1_HUMAN	1	MDDWKPSPLIKPFGARKKRSWY-LTWKYKLTNQRALRRFCQTGAVLFLLV	49
		
PMGT2_HUMAN	1	MH-----LSAVFNALLVSVLAAVLWKHV-----RLREHAAT-----	31
PMGT1_HUMAN	50	TVIVNIKLILDTRRAISEANEDPEPEQ--DYDEALGRLEPPRRRSGPRR	97
		: . . . : : : : : 	
PMGT2_HUMAN	32	-----LEEELALSQRQATEPAPALRIDYPKALQILME-----GGTHM	67
PMGT1_HUMAN	98	VLDVEVYSSRSKVYVAVDGTTVLEDEAREQGRGIHVIVLNQATGHVMAKR	147
	 : :	
PMGT2_HUMAN	68	VCTGRTHTDRI CRFKWLCYSNEAE E F I F F H G -- N T S V M L P N L G S R R F Q P	114
PMGT1_HUMAN	148	VFDTYSPHEDEAMVFLNMPVAPGRVLICTVKDEGSFHLKDTAKALLRSLG	197
		
PMGT2_HUMAN	115	ALLDLSTVEDHNTQYFNFVELPAAALRFMPKP--VFVPDVALIANRFNP	161
PMGT1_HUMAN	198	SQAGPALGWRDWTAFVGRKGGPFVFGKHSKSPALSSWGDVPLLKTDVPLS	247
	 : : :	
PMGT2_HUMAN	162	DNLMHVFDHLLPLFYTLRQFPGLAHE-ARLFFMEGWEGEGAHFDLYKLLS	210
PMGT1_HUMAN	248	SAEEAECHWADTELNRRRRRCFSKVEGYGVCCKDPTPIEFSPDPLPDN	297
	 :	
PMGT2_HUMAN	211	PKQPL----LRAQLKTLGRLLCFS--HAFVGLSKITTWYQYG-FVQPQG	252
PMGT1_HUMAN	298	KVLNVPVAVIAGNRPNYLRMLRSLLSAQ--GV--SPQMITVFIDGYEE	343
		. . . : : : 	
PMGT2_HUMAN	253	PKANI---LVSGNEIRQFARFMTKLNVSHTGVPLGEEYILVFSRTQNR	299
PMGT1_HUMAN	344	PMDVVALFGLRGIQHTPI S I K N A R V S Q H Y K A S L T A T F N L F P E A K F A V V L E	393
		. : : : : .	
PMGT2_HUMAN	300	ILNEAELL-LALAQEFQMKTVTVSLEDHTFADVV--RLVSNASMLVSMH	345
PMGT1_HUMAN	394	EDLDIAVDFFSFLSQSIHLLLEDDSLYCISAWNDQGYEHTAEDPALLYRV	443
	 :	
PMGT2_HUMAN	346	GAQLVTTTLFLPRGATVVELFP-----YAVNPDHYTPYKTLAMLPGM----	386
PMGT1_HUMAN	444	ETMPGLGWVLRRLSRYKEELEPKWPTPEKLWDWDMWMMRMPEQRREGRECIIP	493
		. . : . . : : :	
PMGT2_HUMAN	387	----DLQYVAWRNMPENTVTH---PERPWDQGGITHLDRAEQARILQSR	429
PMGT1_HUMAN	494	DVSRSYHFGIVGLNMNGYFHEAYFKKHKFNTPVPGVQ-LRNVDLKKKEAYE	542
		: . . : : :	
PMGT2_HUMAN	430	EVPRH----LCCRNPEWLF--IYQDTKVDIPSLIQITIRRVVKGRPGPRK	473
PMGT1_HUMAN	543	VEVHRLLSAEVLDHSKNCPEDSFLPDTEGHTYVAFIRMEKDDDFTTWTQ	592
	 : : : :	
PMGT2_HUMAN	474	QKWTVGLYPGKVREAR--CQASVHGASEARLTVSW-QIPWNLKYLKVRE	519
PMGT1_HUMAN	593	LAKCLHIWDLDVRGNHRGLWRLFRKKNHFLMVGVPASPYSVKKPPSVTP	641
	 :	
PMGT2_HUMAN	520	VK--YEVW-LQEQQENTYVPYILALQNHTFTENIKPFTTYLVWVRCIFNK	566
PMGT1_HUMAN	642	IFLEPPPKEEGAPGAPEQT 660	
		
PMGT2_HUMAN	567	ILLGP-----FADVLVCNT 580	

Figura 3.6. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de POMGnT1 y POMGnT2 humanas. Alineamiento con Clustal Omega de las secuencias semilla de POMGnT1 (Q8WZA1) y POMGnT2 (Q8NAT1) humanas. Se muestran los dominios funcionales de glicosiltransferasas GNT-I en POMGnT1 (púrpura), y AER61 en POMGnT2 (verde). Las líneas verticales (|) indica los aas idénticos, los puntos (.) los cambios conservativos de aas, y dos puntos (:) cambios no conservativos. Identidad 109/669 (16.3%) y similitud 194/669 (29.0%).

En la búsqueda de secuencias de proteínas homólogas mediante el uso de la herramienta BLASTp, se utilizó la matriz de sustitución de aminoácidos BLOSUM-62, que es la más utilizada, ya que considera regiones de alineamiento de baja identidad. Se eligió la base de datos de proteínas no redundantes y se limitó la búsqueda al filo de los

cordados (taxón: 7711). Los resultados con un porcentaje de cobertura igual o superior al 98% se consideraron como significativos. Se escogieron las secuencias que tenían un tamaño igual al de la secuencia semilla ± 5 aas, y se omitieron secuencias de baja calidad o parciales en la construcción de los alineamientos y arboles filogenéticos.

3.4.2.1 Análisis filogenético de POMGnT1.

Una vez aplicados los filtros antes descritos, se obtuvieron 125 secuencias homólogas para la proteína POMGnT1 (Tabla 3.1), la mayoría de las cuales pertenecían a la clase de las aves. No obstante, las que poseían un mayor porcentaje de identidad y score (valor numérico que describe la calidad general del alineamiento) pertenecían a los órdenes de primates (identidad: 98-99%; score: 1352-1367), perisodáctilos (identidad: 99%; score: 1352-1357) y quirópteros (identidad: 99%; score: 1351-1358). El orden de los roedores presentó una alta variabilidad en el porcentaje de identidad (95-99%) y score (1286-1352). De las proteínas humanas se obtuvieron 3 secuencias diferentes, de jabalí 2 y de vaca 2, y del resto de las especies una sola secuencia. Una tabla detallada con todas las secuencias obtenidas tras la búsqueda con BLASTp se incluye en el Anexo: Tabla S3.1.

A partir de las secuencias homólogas a POMGnT1 obtenidas mediante BLASTp, se realizó un alineamiento múltiple con la herramienta Clustal Omega con el objetivo de identificar zonas conservadas entre las proteínas homólogas. Este alineamiento múltiple sirvió como punto de partida para construir los árboles filogenéticos. Utilizando el editor y visualizador de alineamientos múltiples Jalview v.2.0 [<http://www.jalview.org/>] (Waterhouse *et al.*, 2009), se pudieron identificar dichas regiones y establecer la secuencia consenso del alineamiento.

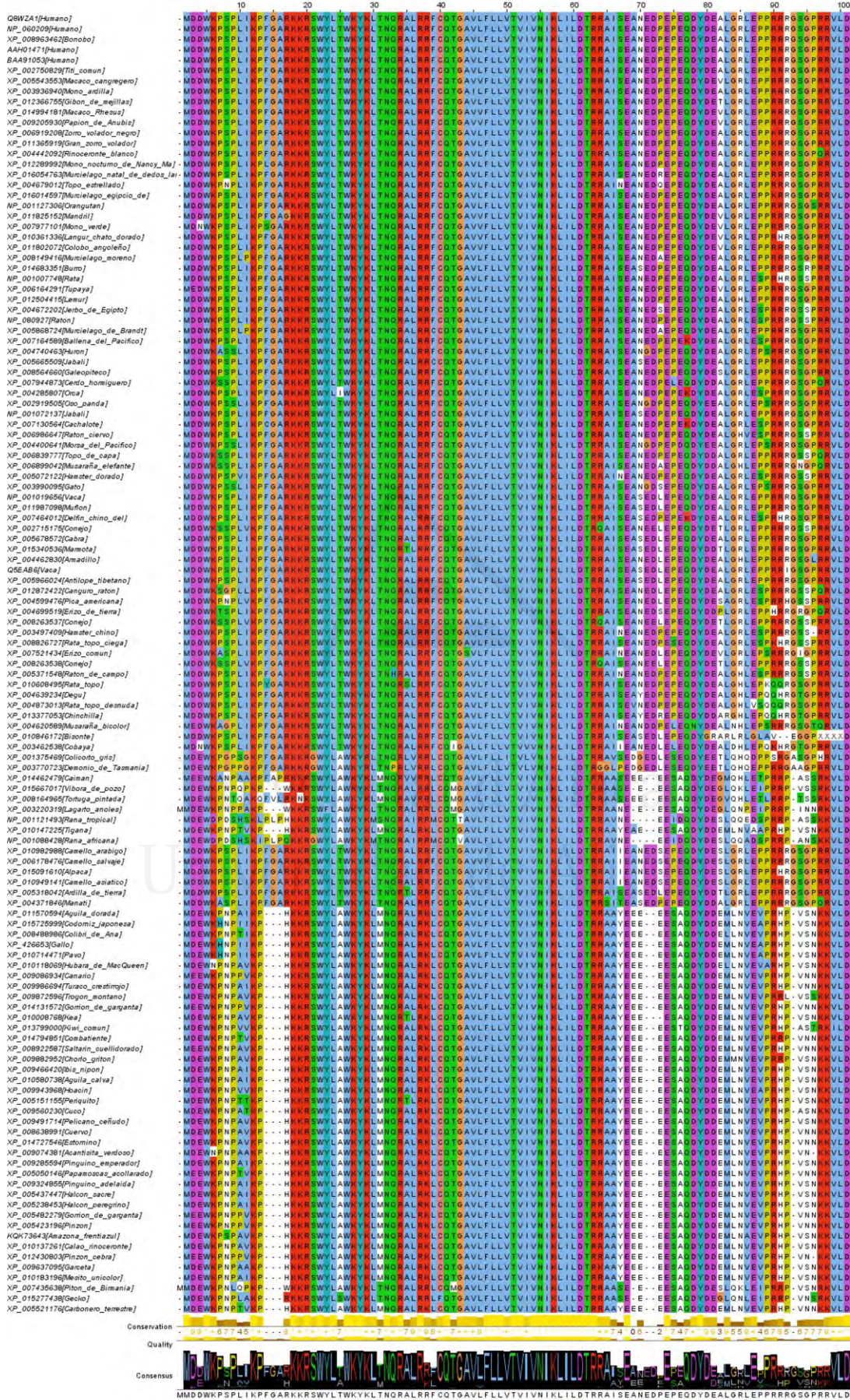
Tabla 3.1. Proteínas homólogas a POMGnT1 humana. Resultados obtenidos en la búsqueda de secuencias con BLASTp y utilizadas para el análisis filogenético.

Clase/orden	Nº de secuencias	Longitud (aas)	Identidad (%)	Score	
Anfibios	2	655	81-85	1137-1145	
Reptiles	6	656-659	83-86	1154-1182	
Aves	38	656-664	84-86	1129-1162	
Mamíferos	Artiodáctilos	12	658-660	95-98	1299-1349
	Cetáceos	4	660	98	1343-1350
	Carnívoros	4	660	98	1345-1350
	Lagomorfos	4	658-660	97-98	1333-1343
	Marsupiales	2	662	89-90	1211-1246
	Quirópteros	6	660	99	1351-1358
	Perisodáctilos	2	660	99	1352-1357
	Placentarios*	11	658-660	95-99	1333-1355
	Primates	17	660	98-99	1352-1367
	Roedores	16	659-660	95-99	1286-1352
Total/promedio	124	660	93	1269	

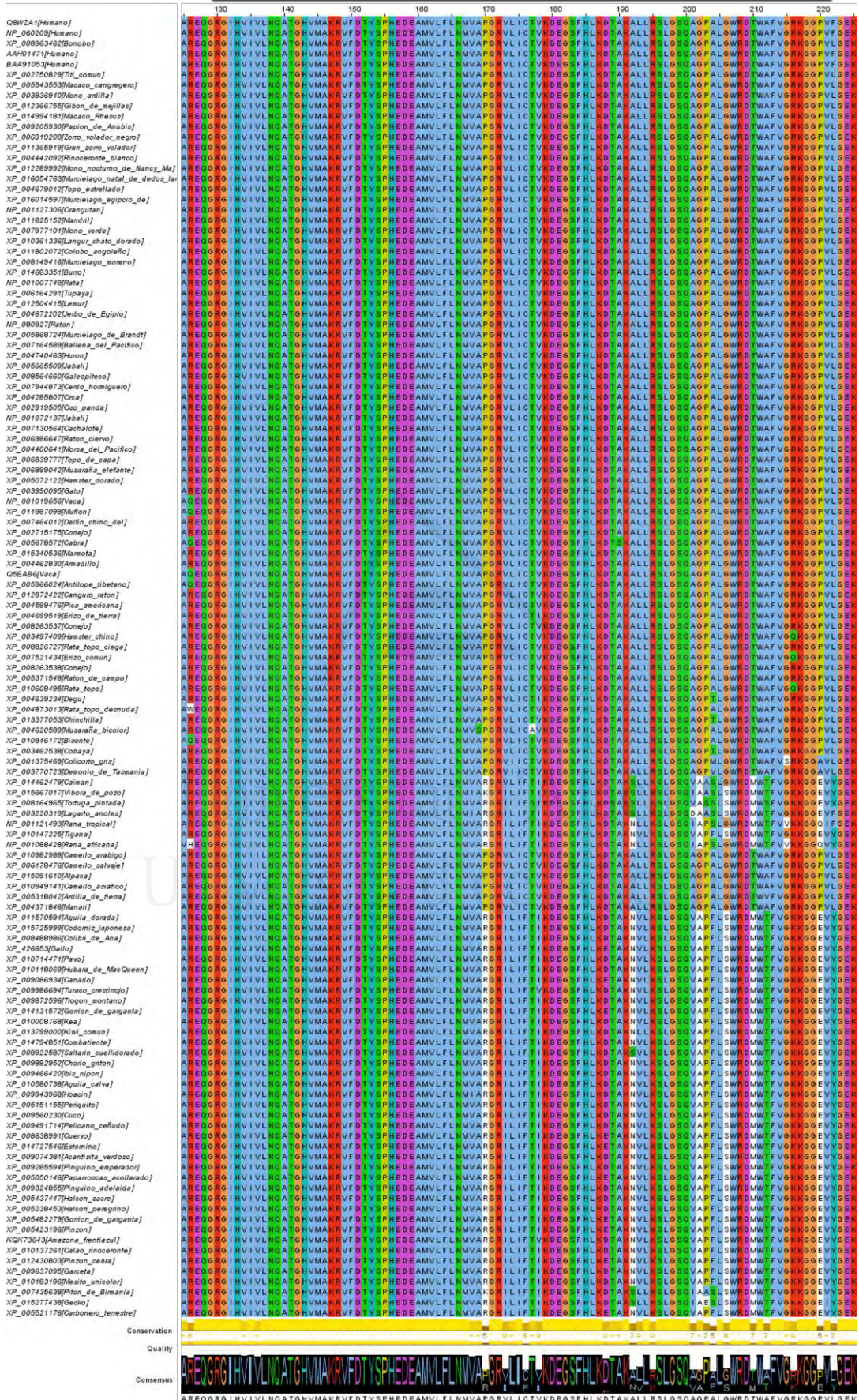
En la 1ª columna se indica la clase/orden taxonómico (*infraclass), en la 2ª el número de secuencias por grupo, en la 3ª el rango de tamaños de las secuencias en número de aas, en la 4ª el rango de identidades en % y en la 5ª el rango de puntuaciones (“score”) obtenidos en la búsqueda con BLASTp.

El alineamiento múltiple completo de las 124 secuencias homólogas a la proteína POMGnT1 humana, se encuentra plasmado en el [Anexo: Figura S3.1](#). Sus dominios topológicos y funcionales se pueden observar en la [Figura 3.7](#), representados en cajas negras. La secuencia transmembrana (TM), importante para su localización en el aparato de Golgi, se observó con un elevado grado de conservación en todas las especies analizadas. Las secuencias de aas Phe47-Ile49, Thr51-Val52 y Val54-Ile58, se presentaron invariables en todas las especies, y en general todo el dominio TM presentó ausencia de “gaps” (huecos). En el dominio funcional ILEI, la secuencia con mayor grado de conservación fue Leu137-Ala169 y en el dominio GNT-I, la secuencia Val306-Pro530.

En base al alineamiento múltiple de las secuencias homólogas a POMGnT1 ([Figura 3.7](#)), y mediante el programa MEGA7 [<http://www.megasoftware.net/>] ([Kumar et al., 2016](#)), se construyó el árbol filogenético utilizando el algoritmo basado en distancias “neighbor joining” (vecino más próximo) ([Saitou & Nei, 1987](#)), con la matriz p-distance ([Nei & Kumar, 2000](#)) y el método estadístico de remuestreo “bootstrap” usando 1000 réplicas ([Felsenstein, 1985](#)) para estimar la confianza del árbol construido, es decir, el porcentaje de veces que se ha obtenido la tipología de cada rama del árbol.



LEI



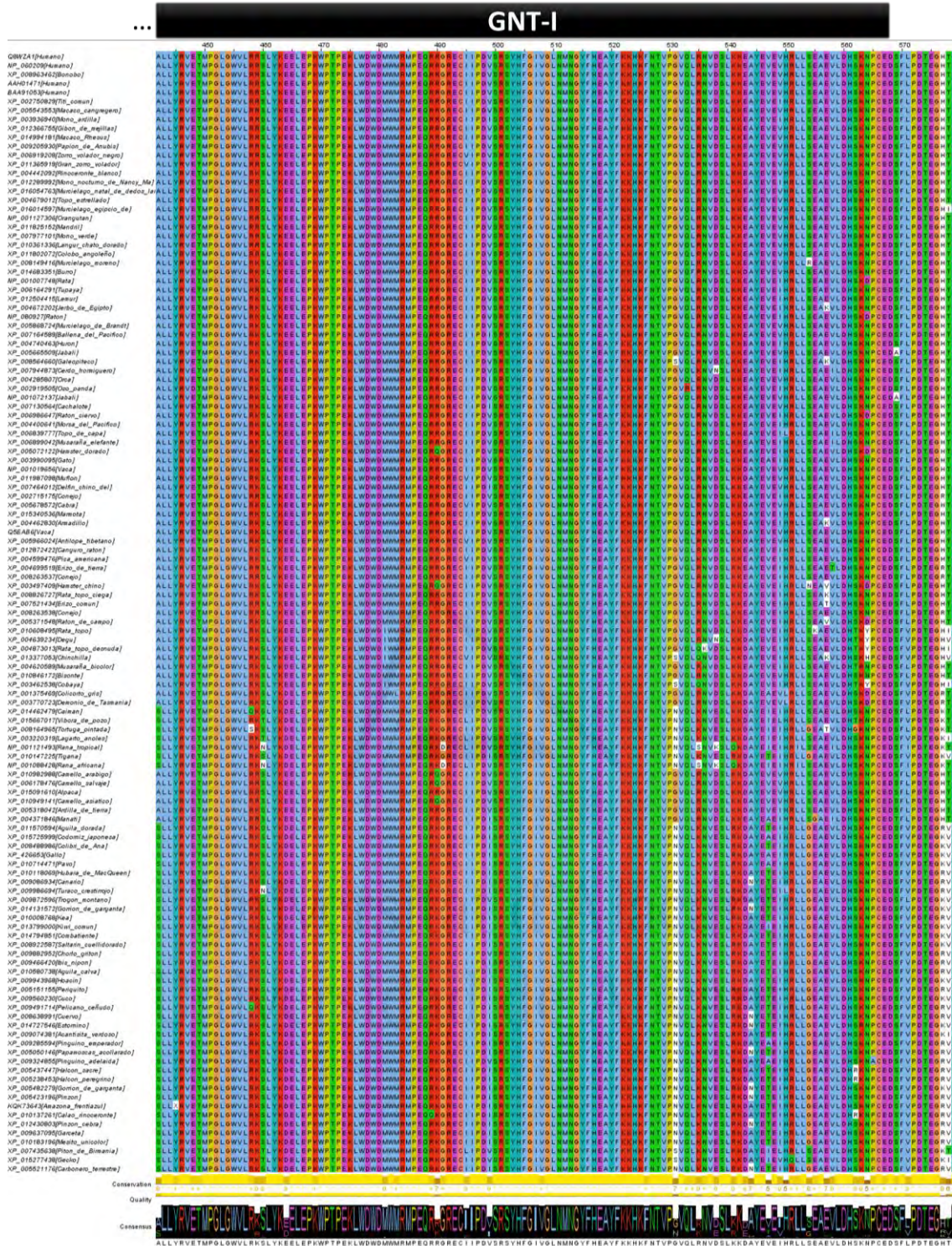


Figura 3.7. Alineamiento múltiple de secuencias homólogas a la proteína POMGnT1 en cordados. Vista general del alineamiento múltiple de secuencias homólogas a la proteína POMGnT1 de diferentes especies de vertebrados. Sobre el alineamiento se indican los dominios funcionales de la proteína humana: TM: transmembrana; ILEI: interleukin-like EMT inducer; GNT-I: glicosiltransferasa GT13. En la parte inferior, la secuencia consenso. Alineamiento realizado con Clustal Omega y editado con Jalview.

Como se puede observar en la Figura 3. 8, se obtuvo un árbol con una topología bien definida y agrupaciones cladísticas en un orden lógico acorde a su clasificación

taxonómica (Tabla 3.1). Las especies de las principales clases de cordados se mantuvieron agrupadas en cuatro grandes clados: anfibios, reptiles, aves y mamíferos. En el orden de los mamíferos, algunas especies aparecieron fuera de su grupo taxonómico, como son la musaraña arborícola china, el armadillo y el galeopiteco, que pertenecen a la infraclase de los Placentarios, el lémur de Madagascar del orden de los Primates y el jabalí del orden de Artiodáctilos.

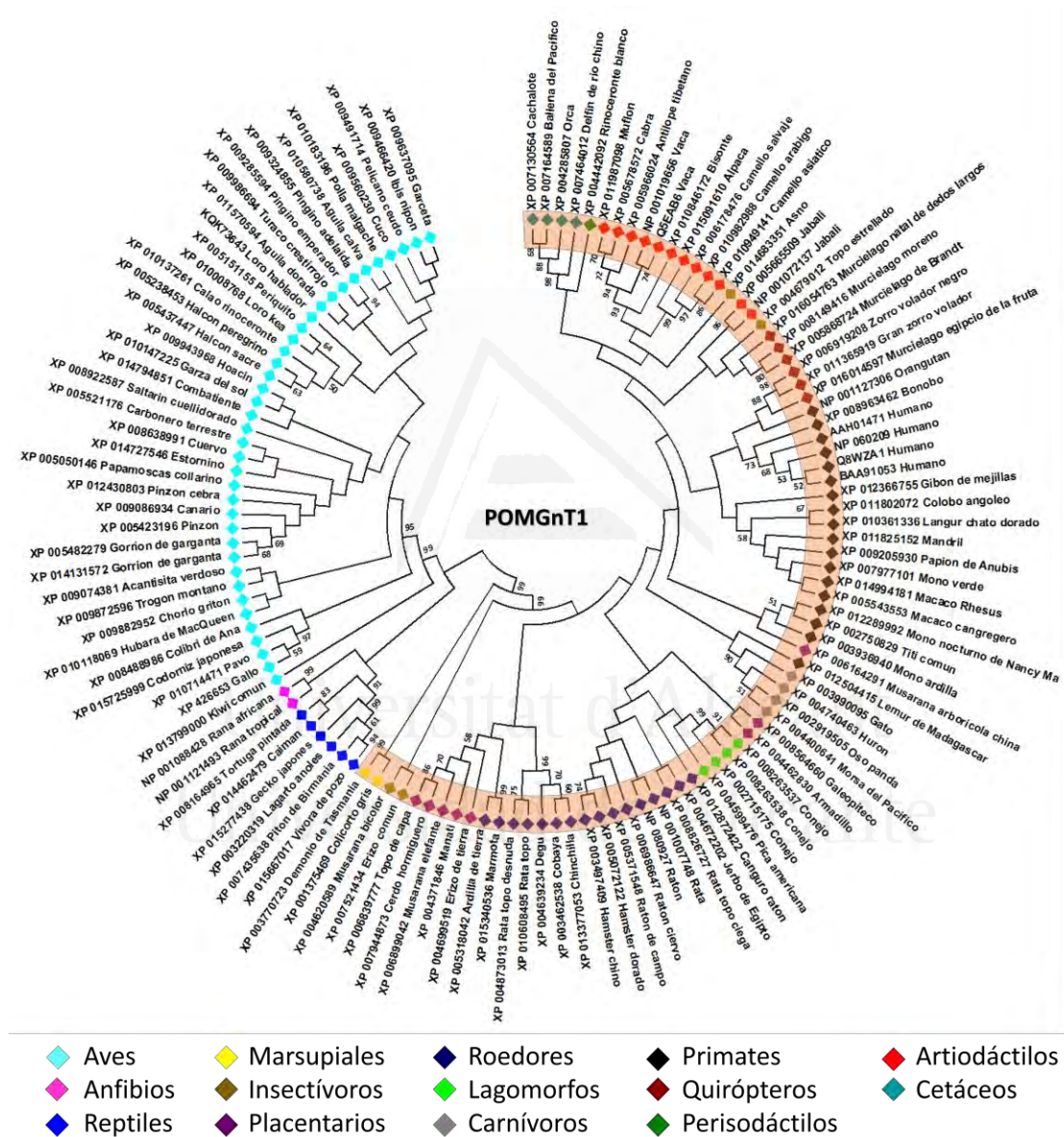


Figura 3.8. Análisis filogenético de POMGnT1. Representación circular del árbol filogenético consenso para 125 secuencias aminoacídicas de la proteína POMGnT1 (la longitud de las ramas no se encuentran dibujadas a escala). Se muestran en cada rama los porcentajes de réplicas (“bootstrap”) > 50%. El análisis filogenético se llevó a cabo utilizando el programa MEGA7 (Kumar *et al.*, 2016). Se eliminaron todas las posiciones que contenían “gaps” y se analizaron un total de 631 posiciones de aminoácidos. Al final de cada rama se indica el número de acceso de la base de datos correspondiente de cada secuencia proteica y su especie. Debajo del árbol se indica el código de colores utilizado para cada clase, infraclase u orden de especies. La clase de Mamíferos aparece sombreada en naranja.

3.4.2.2 Análisis filogenético de POMGnT2.

Para la búsqueda de secuencias homólogas a POMGnT2 se aplicaron los mismos parámetros que para la búsqueda en el caso de POMGnT1. Se obtuvieron 157 secuencias (Tabla 3.2), de las cuales 56 (un 35,7%) pertenecían a la clase Aves. Los porcentajes de identidad y los scores mayores se observaron en los órdenes de los Primates y los Perisodáctilos. Una notable variabilidad en los porcentajes de identidad se identificó en la infraclase de los Placentarios, con un rango entre el 89 y 97%. Para cada una de las especies *Mus musculus* (Roedor), *Nestor notabilis*, *Cariama cristata* (Aves), *Xenopus laevis* (Anfibio), *Cyprinus carpio*, *Sinocyclocheilus rhinoceros* y *Sinocyclocheilus anshuiensis* (Peces) se obtuvieron dos secuencias homologas a POMGnT2, para el pez cebra se obtuvieron tres, y para el resto de las especies solo una secuencia. El Anexo: Tabla S3.1 contiene toda la información detallada del resultado obtenido en la búsqueda de secuencias para POMGnT2.

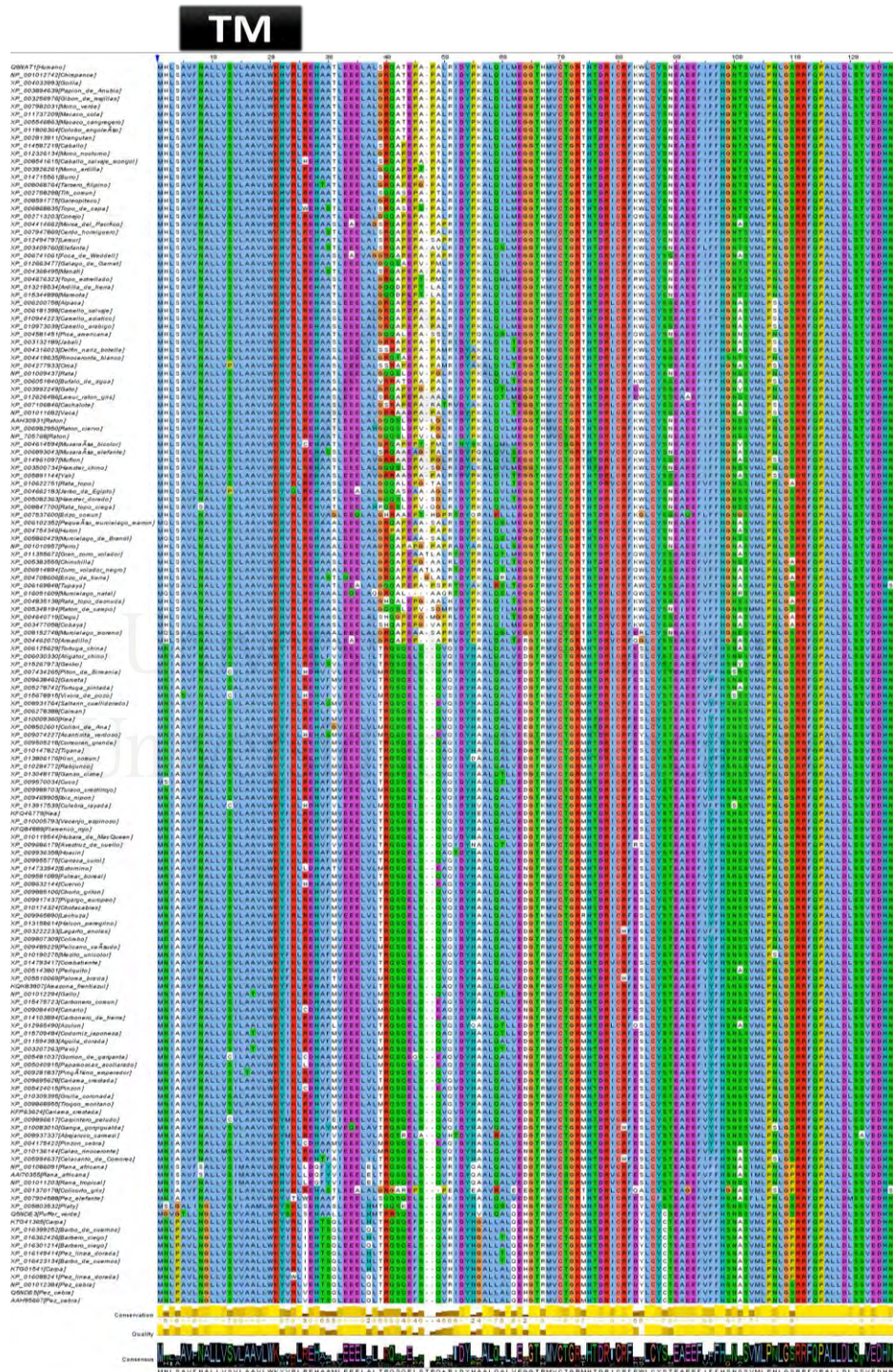
Tabla 3.2. Proteínas homologas a POMGnT2 humana. Resultados obtenidos en la búsqueda de secuencias con BLASTp y utilizadas para el análisis filogenético.

Clase/orden	Nº de secuencias	Longitud (aas)	Identidad (%)	Score
Peces	15	576-585	71-77	865-958
Anfibios	3	576-578	75	945-949
Reptiles	9	578	79-81	981-1004
Aves	56	577-582	78-80	1129-1162
Artiodáctilos	9	580	93-96	1107-1132
Cetáceos	3	580	94	1114-1119
Carnívoros	5	580	94-97	1085-1169
Lagomorfos	2	580	95-97	1125-1171
Marsupiales	1	578	77	908
Quirópteros	6	577-581	92-94	1063-1093
Perisodáctilos	4	580	96-98	1117-1185
Placentarios*	12	577-580	89-97	1039-1173
Primates	15	580	94-99	1114-1202
Roedores	17	580	89-96	1065-1140
Total/promedio	157	579	86	1040

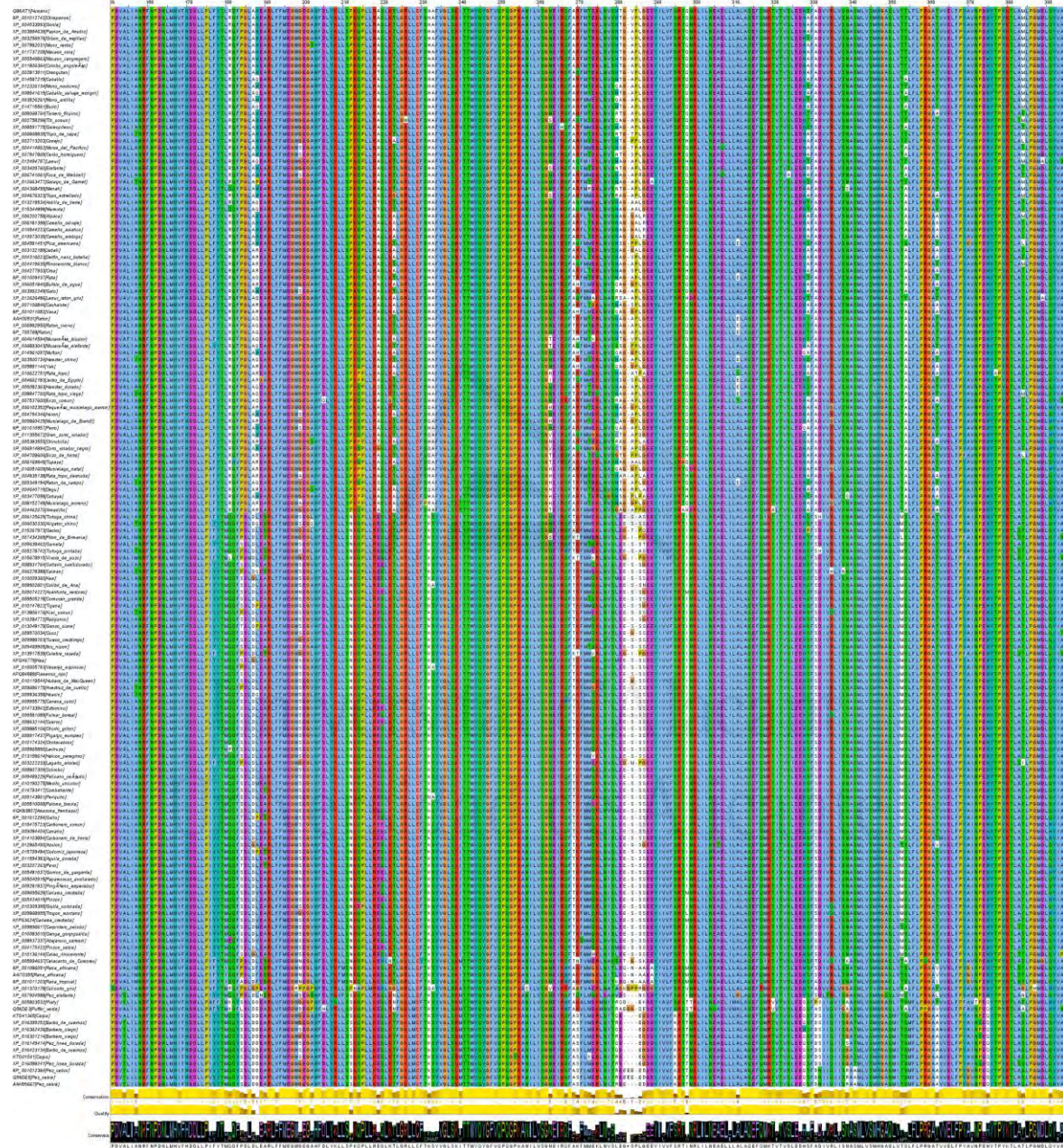
En la 1ª columna se indica la clase/orden taxonómico (*infraclase), en la 2ª el número de secuencias por grupo, en la 3ª el rango de tamaños de las secuencias en número de aas, en la 4ª el rango de identidades en % y en la 5ª el rango de puntuaciones ("score") obtenidos en la búsqueda con BLASTp.

En el alineamiento múltiple de POMGnT2, al igual que en el realizado para POMGnT1, también se encontró un alto grado de conservación en sus dominios predichos (Figura 3.9). Si bien el dominio glicosiltransferasa GT61 (AER61/DUF563)

presentó múltiples zonas con “gaps”, más evidentes en los aminoácidos centrales del dominio, se pudo observar un alto grado de conservación en los aminoácidos restantes. Por otro lado, el dominio fibronectina tipo III (FNIII) tampoco presentó diferencias muy evidentes a lo largo de todas las especies, esto nos permite inferir que este dominio podría tener importancia para la función de la proteína POMGnT2. El alineamiento múltiple completo de las 157 secuencias homólogas a la proteína POMGnT2 humana, se encuentra en el [Anexo: Figura S3.2](#).



AER61



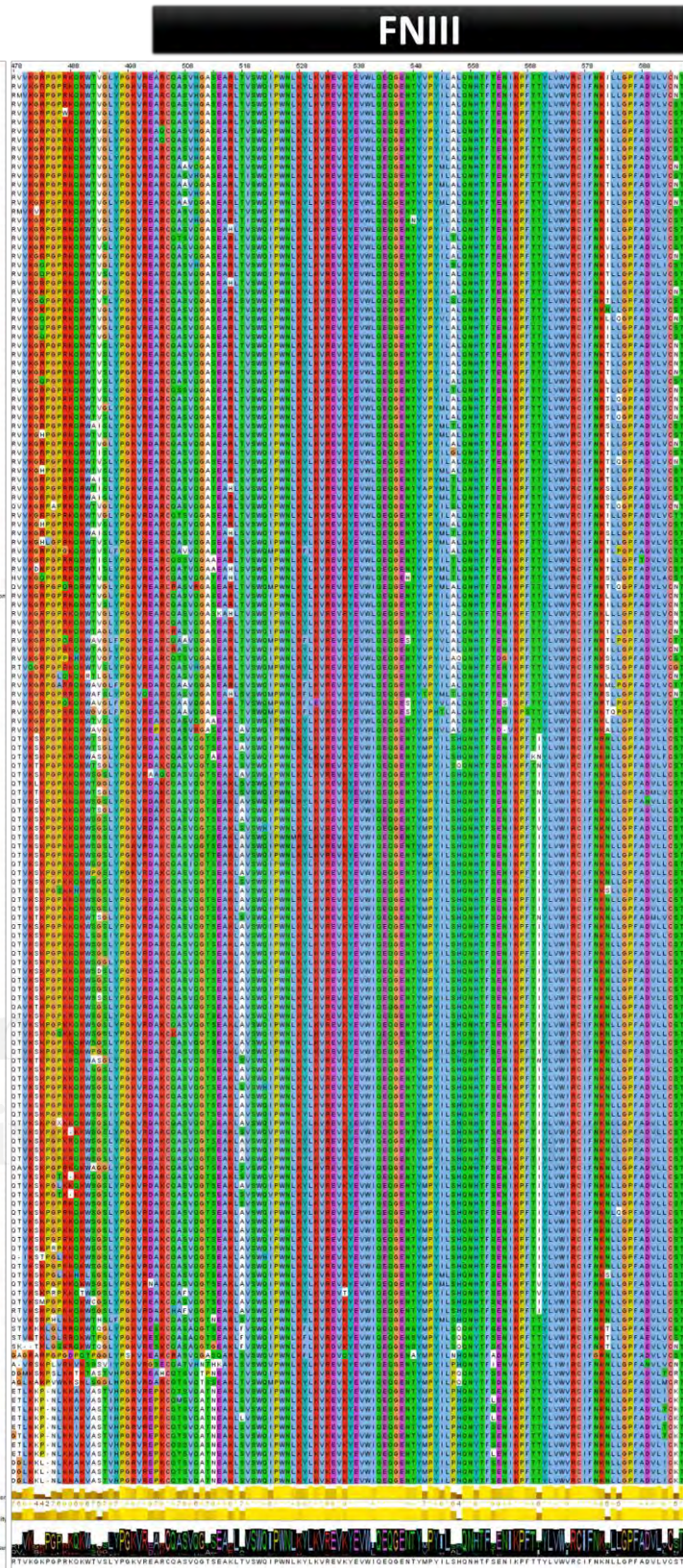


Figura 3.9. Alineamiento múltiple de secuencias homólogas a la proteína POMGnT2 en cordados. Vista general del alineamiento múltiple de secuencias homólogas a la proteína POMGnT1 de diferentes especies de vertebrados. Sobre el alineamiento se indican los dominios funcionales de la proteína humana: TM: transmembrana; AER 61/DUF563: glicosiltransferasa GT61 y FNIII: fibronectina tipo 3. En la parte inferior la secuencia consenso. Alineamiento realizado con Clustal Omega y editado con Jalview.

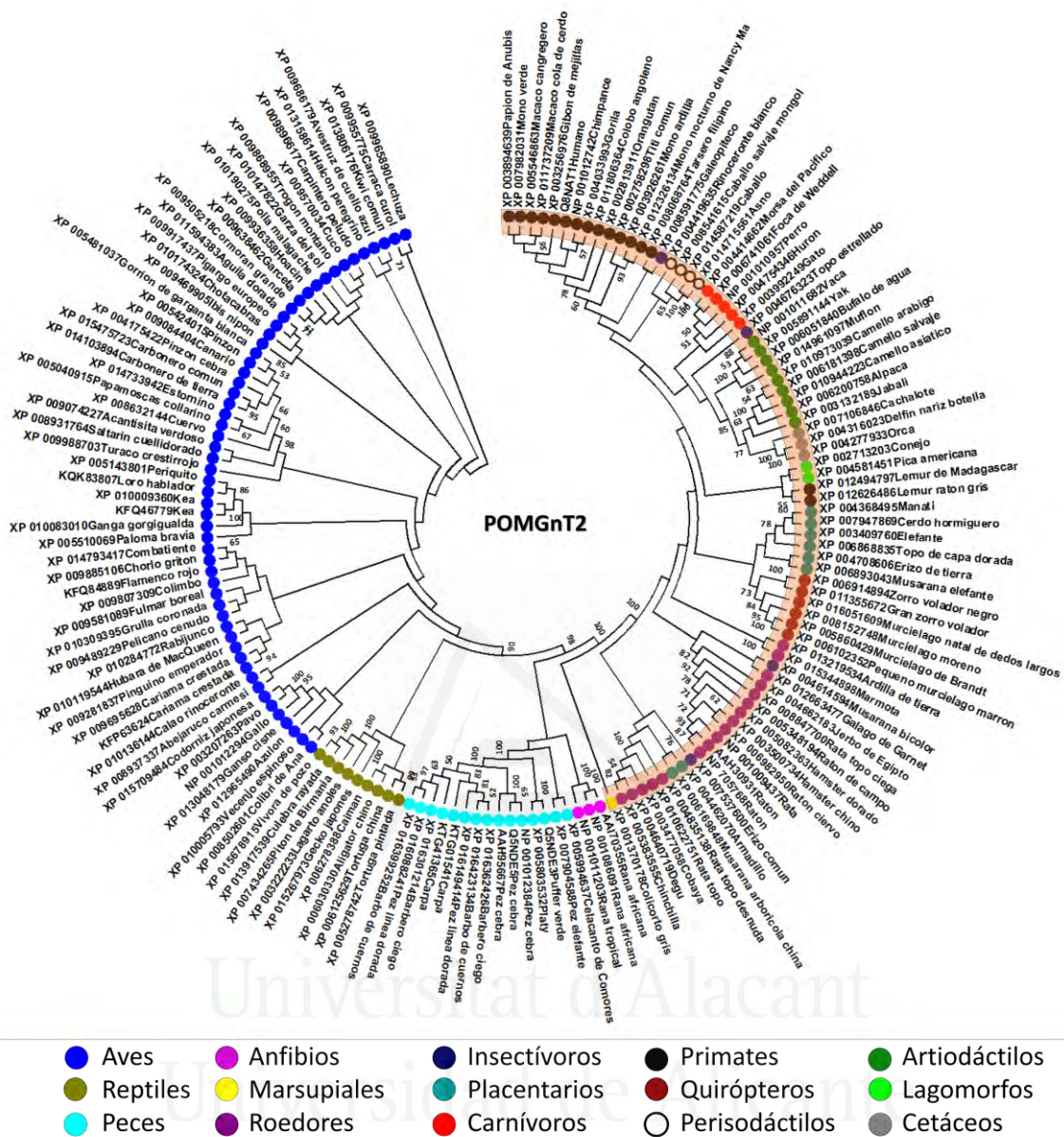


Figura 3.10. Análisis filogenético de POMGnT2. Representación circular del árbol filogenético consenso para 158 secuencias aminoacídicas de la proteína POMGnT2 (la longitud de las ramas no se encuentra dibujada a escala). El porcentaje de réplicas (“Bootstrap”) > 50% se muestra en cada rama. El análisis filogenético se llevó a cabo utilizando el programa MEGA7 (Kumar *et al.*, 2016). Se eliminaron todas las posiciones que contenían “gaps” y se analizaron un total de 578 posiciones. Al final de cada rama se indica el número de acceso de la base de datos correspondiente de cada secuencia proteica y su especie. Debajo del árbol se indica el código de colores utilizado para cada clase, infraclase u orden de especies. La clase de Mamíferos aparece sombreada en naranja.

Una vez realizado el alineamiento múltiple de las secuencias homólogas a POMGnT2, se realizó la reconstrucción filogenética para esta proteína (Figura 3.10) utilizando la misma metodología y parámetros que fueron considerados para la proteína

POMGnT1. Al igual que para el árbol de POMGnT1, en este análisis filogenético se identificaron las con agrupaciones cladísticas tal y como se conocen evolutivamente los principales taxones (Tabla 3.2). Las cinco clases principales de cordados se agruparon en clados bien diferenciados (Peces, Anfibios, Reptiles, Aves y Mamíferos). Cabe destacar que algunas de las especies de mamíferos pertenecientes a la infraclase de Placentarios aparecieron dispersas en diferentes grupos, es decir sin asociación a ningún clado en particular. Estas especies fueron: el erizo común, la musaraña bicolor, el galeopiteco y el topo estrellado.

3.5 Discusión.

Las distrofias musculares congénitas denominadas distroglicanopatías (DGPs) constituyen un conjunto de trastornos hereditarios que se heredan de forma autosómica recesiva. Actualmente se conocen 18 genes (*POMT1*, *POMT2*, *POMGNT1*, *FKTN*, *FKRP*, *LARGE*, *ISPD*, *POMGNT2*, *DAG1*, *TMEM5*, *B3GALNT2*, *POMK*, *B3GNT1*, *GMPPB*, *DOLK*, *DPM1*, *DPM2* y *DPM3*) asociados a DGPs. Estas últimas se clasifican como de tipo A a tipo C de mayor a menor gravedad, según sus síntomas.

Las mutaciones en los genes que codifican las proteínas POMGnT1 y POMGnT2 afectan al desarrollo del cerebro y del músculo, dando lugar a síntomas típicos de distroglicanopatías como MEB, WWS y FCMD. Estas dos enzimas tienen la función de catalizar la adición de GlcNAc a la *O*-manosa del α -DG en distintos compartimentos y por medio de diferentes enlaces, β 1,2 en el aparato de Golgi y β 1,4 en el retículo endoplásmico.

El gen *POMGNT1* fue mapeado en brazo corto del cromosoma 1 (1p34.1) por Yoshida *et al.* (2001) constituido por 22 exones y 22 intrones, que comprenden una longitud de 61,6 kb. La proteína codificada por este gen, es denominada proteína *O*-manosa β -1,2-*N*-acetilglucosaminiltransferasa 1, está compuesta 660 aminoácidos. Por otro lado, el gen *POMGNT2* de 26,6 kb de longitud, se encuentra codificado en el brazo corto del cromosoma humano 3 (3p22.1), contiene dos exones y un gran intrón,

(Manzini *et al.*, 2012) y codifica la enzima *O*-manosa β -1,4-*N*-acetilglucosaminil-transferasa 2 compuesta por 248 aminoácidos.

La búsqueda y recopilación de información estructural y funcional disponible en distintas bases de datos de dominio público y el uso de diferentes herramientas bioinformáticas disponibles en Internet, permitió la comprobación de los dominios estructurales de POMGnT1: citoplásmico (aas 1-37), transmembranal (aas 38-58) troncal (aas 59-300) y catalítico (aas 301-660), los cuales habían sido previamente descritos (Yoshida *et al.*, 2001). Además, se identificaron dominios funcionales ILEI (aas 129-220) dentro del dominio troncal y GNT-I (aas 301-530) dentro del dominio catalítico. Con respecto a la proteína POMGnT2, se observaron los dominios: fibronectina tipo III (aas 488-580) y AER61/DUF563 (aas 165-391) el cual está presente en la familia de proteínas con actividad glicosiltransferasa GT61. También se pudieron identificar posibles dominios estructurales, como son la región citoplasmática (aas 1-5), la región transmembranal (aas 6-25) y la región luminal (aas 26-580).

Otra información relevante, encontrada utilizando las herramientas bioinformáticas NetOGlyc y NetNGlyc, fueron sitios putativos de *O*-glicosilación en las posiciones 7, 66, 93, 226, 280, 638 y 640 que contenían residuos de Ser o Thr en la secuencia de la proteína POMGnT1 y en las posiciones 43, 215 y 228 en la secuencia de la proteína POMGnT2, y de *N*-glicosilación en las posiciones 99 y 276 de la secuencia de POMGnT2 que contenían residuos de asparaginas.

El alineamiento global realizado entre las secuencias semilla de las proteínas POMGnT1 y POMGnT2 humanas, mostró un porcentaje bajo de similitud e identidad. Si bien estas dos proteínas añaden el mismo azúcar a la *O*-manosa del α -DG, cada una de ellas lo hace mediante un enlace diferente y en compartimentos subcelulares diferentes (Endo, 2015). Por tanto es de esperar que estas proteínas no compartan homología en sus dominios catalíticos, o en sus secuencias señal. Probablemente ambas proteínas no compartan un ancestro común en su cadena evolutiva.

Dados los altos porcentajes de identidad encontrados en los alineamientos múltiples de las proteínas homologas (ortólogos) a POMGnT1 (promedio, 93%) y a POMGnT2 (promedio, 86%), se puede concluir que los dominios TM y catalíticos de

ambas proteínas (GNT-I en POMGnT1 y AER61 en POMGnT2) se encontraban muy conservados entre las diferentes especies de cordados analizadas, desde peces a mamíferos.

Finalmente, se procedió a la elaboración de un árbol filogenético de cordados para la proteína POMGnT1 humana con 123 secuencias de proteínas homólogas y otro para la proteína POMGnT2 humana con 156 secuencias homólogas. El programa utilizado (MEGA7) eliminó las posiciones que contenían discontinuidades, por lo que finalmente se analizaron un total de 631 y 578 posiciones para POMGnT1 y POMGnT2, respectivamente. Con los resultados obtenidos en ambos árboles se puede decir que los cordados constituyen un grupo monofilético para estas dos proteínas, las cuales provienen cada una de ellas de un ancestro común a todas las especies. Ello implica que todas las secuencias son ortólogas, es decir, secuencias homólogas que se han separado en distintos eventos de especiación.

Es preciso ahondar experimentalmente en el conocimiento de la estructura en dominios y función de estas proteínas, para permitir el abordaje de nuevas perspectivas terapéuticas en las distrofias neuromusculares.

Los resultados presentados en este capítulo darán origen al artículo:

Uribe, M.L., Cruces, J., Martín-Nieto, J. (2016) POMGnT1 and POMGnT2: Two protein *N*-acetylglucosaminyltransferases acting on the same substrate, α -dystroglycan. (Manuscrito en preparación)



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

Alteraciones estructurales en la retina de un ratón KO condicional en el gen *Pomt1*, modelo de distroglicanopatías

La proteína *O*-manosiltransferasa 1 (POMT1) es responsable del primer paso en la ruta de *O*-manosilación del α -DG. Esta glicoproteína en la retina se localiza en la capa plexiforme externa (CPE), en la membrana limitante interna (MLI) y alrededor de los vasos sanguíneos. Mutaciones en el gen *POMT1* humano causan síndrome de Walker-Warburg (WWS), enfermedad de músculo-ojo-cerebro (MEB) y otras DGPs menos graves. Pacientes con WWS y MEB presentan deficiencias oculares severas, que implican displasia retiniana, desprendimiento de retina y anomalías en los ERG.

Dado que la inactivación del gen *Pomt1* en ratones origina letalidad embrionaria, se ha generado un ratón modelo KO condicional (KOc) para el gen *Pomt1* específicamente en los fotorreceptores. En este trabajo hemos caracterizado a nivel morfológico la retina de este modelo *Pomt1* KOc. Los resultados obtenidos, apoyan los análisis fisiológicos de este modelo, los cuales revelan una disminución en la amplitud de la onda b de los ERG y un aumento en su tiempo implícito. La retina externa de los ratones KOc mostró importantes cambios morfológicos, además de una ausencia de proteínas necesarias para la estructura de la sinapsis entre fotorreceptores y las células bipolares. A nivel de la retina interna, se encontró un aumento en la reactividad de los astrocitos.

La ausencia de la enzima POMT1 en la retina causa graves modificaciones estructurales y funcionales. Se concluye que POMT1 es esencial para la formación y mantenimiento de las sinapsis en cinta, y para la electrofisiología normal de la retina.

4.1 Introducción.

Las distroglicanopatías (DGPs) constituyen un grupo heterogéneo de distrofias neuromusculares con herencia autosómica recesiva y presentan un amplio espectro de alteraciones neurológicas, las cuales se extienden en la mayoría de los casos a la retina (Godfrey *et al.*, 2011). La característica molecular común a todas las DGPs es la presencia de alteraciones en la glicosilación del α -distroglicano (α -DG). Este constituye el componente central del complejo distrofina-glicoproteína (DGC), siendo responsable de la unión del citoesqueleto de células musculares y nerviosas a la matriz extracelular (MEC) (Barresi & Campbell, 2006; Muntoni *et al.*, 2007). El α -DG necesita ser extensivamente glicosilado para su correcto funcionamiento, interactuando mediante sus *O*-manosilglicanos con una serie de proteínas de la MEC, como son la laminina, la agrina, la neurexina, el perlecán, Slit y la pikachurina, esta última exclusiva de la retina (Bouchet-Séraphin *et al.*, 2015; Endo, 2015).

La *O*-manosilación comienza en el retículo endoplásmico con la acción de la proteína *O*-manosiltransferasa 1 (POMT1), que junto con POMT2 añade covalentemente la molécula inicial de manosa a residuos de Ser/Thr presentes en el dominio de tipo mucina del α -DG (Manya *et al.*, 2004). Mutaciones en el gen *POMT1* pueden causar DGPs severas que cursan con síntomas graves en músculo, sistema nervioso y sistema ocular, como son el síndrome de Walker-Warburg (WWS) (Beltrán-Valero de Bernabé *et al.*, 2002) y la enfermedad músculo-ojo-cerebro (MEB) (Godfrey *et al.*, 2007), además de DGPs más leves como la MDDGB1 y la MDDGC1.

Aunque las disfunciones visuales y las alteraciones morfológicas oculares son anomalías típicas de las formas más severas de DGPs, el papel del DG en la estructura y desarrollo del ojo no se encuentra totalmente caracterizado. En pacientes con mutaciones en el gen *POMT1* que presentan WWS y MEB se ha descrito una amplia variedad de anomalías oculares, las cuales incluyen malformaciones retinianas (displasia, atrofia y desprendimiento), disgenesia vítreo-retinal, hipoplasia del nervio óptico y ceguera (Cormand *et al.*, 2001; Godfrey *et al.*, 2007).

La expresión del α -DG y su *O*-manosilación ha sido documentada en diferentes ratones modelo de DGPs, deficientes en genes que codifican glicosiltransferasas o proteínas que actúan de forma indirecta en la formación de *O*-manosilglicanos (Holzfeind *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2006; Takahashi *et al.*, 2011), o el mismo DG (Omori *et al.*, 2012). La función de la POMT1 humana en el sistema visual aún no ha sido descrita en profundidad, dado que ratones 'knockout' constitutivos para el gen que codifica esta proteína no sobreviven a la etapa embrionaria (Willer *et al.*, 2004).

Dada la no disponibilidad de ratones modelo de DGPs con mutaciones en *Pomt1*, el grupo de investigación del Dr. Jesús Cruces de la Universidad Autónoma de Madrid, con quien colaboramos estrechamente desde hace años, ha generado un ratón knockout condicional para este gen específicamente en la retina (Rubio-Fernández *et al.*, 2016). Para el desarrollo de este modelo se utilizaron células madre embrionarias (ES) procedentes del Consorcio EUCOMM conteniendo en el gen *Pomt1* de ratón dos secuencias *loxP* flanqueando los exones 3 y 4. Ratones quiméricos obtenidos tras su microinyección en blastocistos se cruzaron con ratones silvestres para obtener individuos heterocigotos para la construcción (Figura 4.1A). Estos últimos fueron a su vez cruzados con ratones transgénicos que expresan la recombinasa FLP (flipasa), con objeto de eliminar los marcadores de selección *lacZ* y *neo* localizados entre las secuencias FRT reconocidas por dicha enzima y obtener animales heterocigotos para la construcción 'floxeada' *Pomt1*^{+/*loxP*}. Luego, se realizaron cruzamientos de estos últimos entre sí, para obtener animales homocigotos *Pomt1*^{*loxP/loxP*}. Finalmente estos ratones fueron cruzados con ratones transgénicos que expresaban la recombinasa Cre bajo el promotor del gen *Crx* (cone-rod homebox), que codifica un factor de transcripción específico de fotorreceptores (Furukawa *et al.*, 2002). Como resultado, obtuvieron un ratón *Pomt1*^{-/-}, en el que se eliminaron los exones 3 y 4 de *Pomt1*, específicamente en los fotorreceptores (*Pomt1* knockout condicional; KOc).

A nivel de ARNm la inactivación de este gen trajo como resultado la detección de un transcrito correspondiente al alelo nulo de *Pomt1* que contenía un codón de terminación prematuro en el exón 5 (Figura 4.1B). En la retina del ratón *Pomt1* KOc, se perdió el glicoepítipo del α -DG detectado por el anticuerpo VIA4-1 junto con su capacidad de unión a laminina (Figura 4.1C). Se confirmó así que el ratón se comportaba

genotípica y bioquímicamente de forma esperada, y se demostró la importancia de la actividad de POMT1 en la interacción del α -DG con la laminina también en la retina (Rubio-Fernández *et al.*, 2016), al igual que se había puesto de manifiesto en el músculo esquelético (Akasaka-Manyá *et al.*, 2011; Martín, 2003; Sciandra *et al.*, 2015).

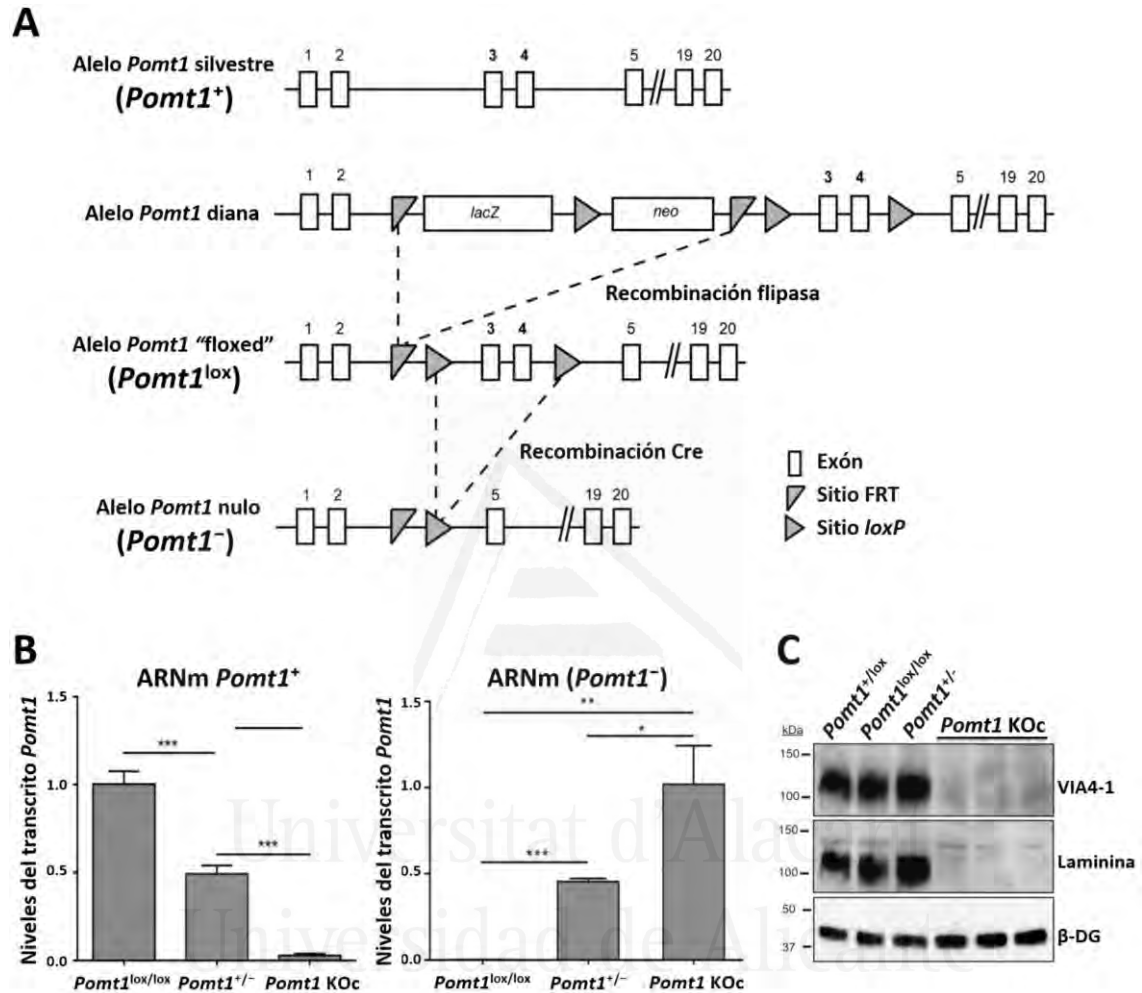


Figura 4.1. Generación del ratón modelo *Pomt1* KOc. **A)** Estrategia para la generación de alelos nulos de *Pomt1*. El alelo *Pomt1* diana (construido artificialmente e insertado en células ES) fue "floxeado" mediante recombinación mediada por la enzima flipasa, eliminándose el segmento de ADN entre los dos sitios FRT. En el alelo "floxeado" resultante (*Pomt1*^{lox}), los exones 3 y 4 se encontraban flanqueados por dos sitios loxP y estos fueron posteriormente eliminados mediante recombinación llevada a cabo por la recombinasa Cre en fotorreceptores, dando lugar al alelo *Pomt1* nulo (*Pomt1*⁻). **B)** Análisis mediante qRT-PCR del ARNm de las retinas de ratones *Pomt1*^{lox/lox}, *Pomt1*^{+/-} y *Pomt1* KOc. El diagrama de barras de la izquierda muestra los niveles detectados (media \pm SD, n=4) del transcrito de *Pomt1* silvestre, y la de la derecha, los niveles del transcrito de *Pomt1* nulo (media \pm SD, n=4). Diferencias estadísticamente significativas: * p=0,0299; ** p=0,0058; *** p<0,001). **C)** Análisis mediante Western blotting de la glicosilación del α -DG utilizando el anticuerpo VIA4-1 (panel superior), ensayo de unión a laminina (panel intermedio) y expresión del β -DG (panel inferior) en extractos de retina enriquecidos con WGA de ratones control (*Pomt1*^{+/-lox}, *Pomt1*^{lox/lox} y *Pomt1*^{+/-}) y *Pomt1* KOc. Figura modificada de Rubio-Fernández *et al.*, 2016.

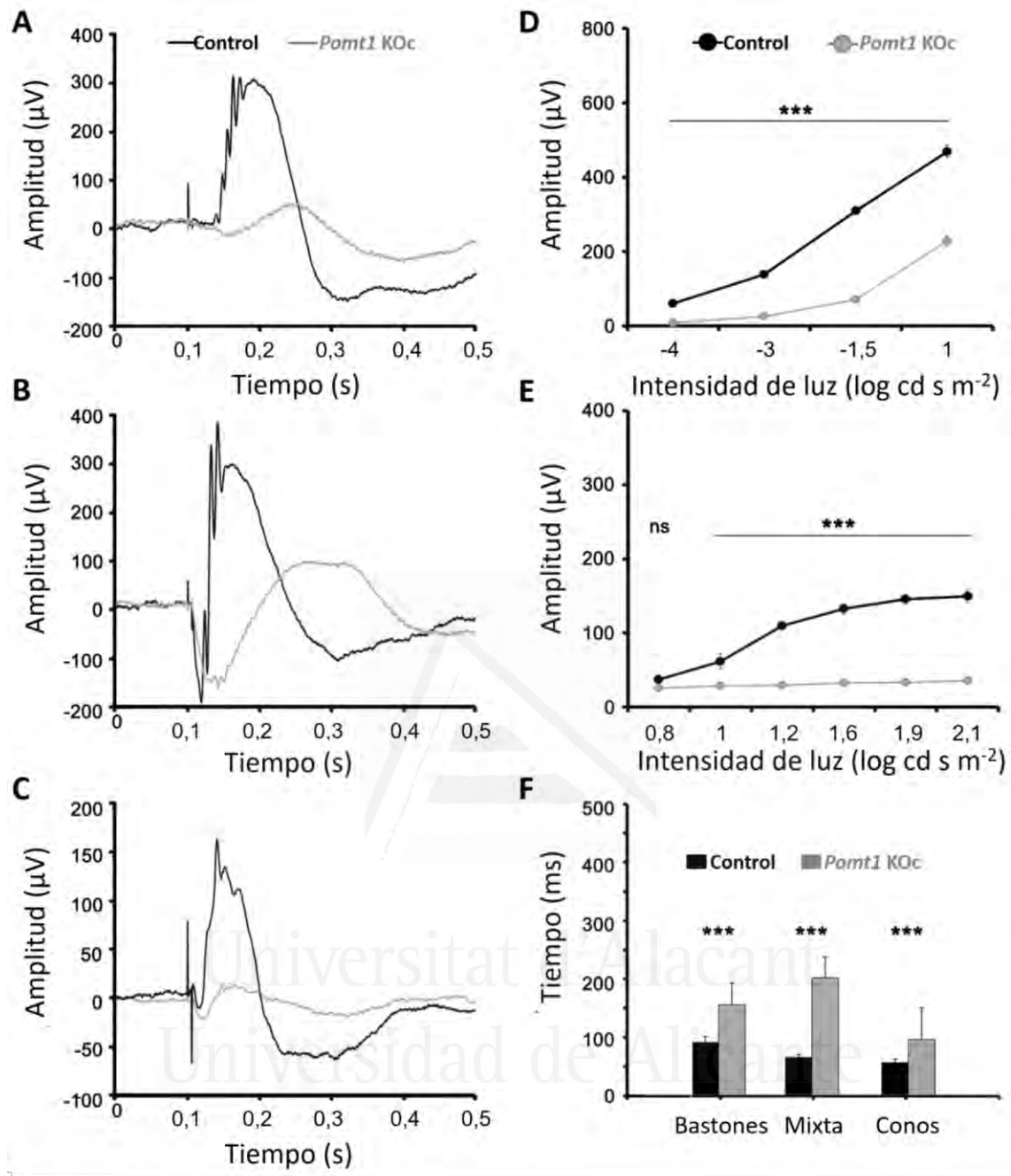


Figura 4.2. Respuestas funcionales de la retina de ratones *Pomt1* KOc. (A-C) Se muestran las respuestas electroretinográficas de un ratón representativo control (línea negra) y uno *Pomt1* KOc (línea gris). (A) ERG en condiciones escotópicas, respuesta de los bastones a un estímulo de $-1,5 \log\text{-cd}\cdot\text{s}\cdot\text{m}^{-2}$. (B) Respuesta mixta del ERG evocada por un estímulo de $1 \log\text{-cd}\cdot\text{s}\cdot\text{m}^{-2}$ en condiciones escotópicas. (C) ERG en condiciones fotópicas, mostrando la respuesta de los conos a un estímulo de $1,6 \log\text{-cd}\cdot\text{s}\cdot\text{m}^{-2}$. (D) Amplitud de la onda b (media \pm SD, $n=18$) en función de la intensidad de luz utilizada ($\log\text{-cd}\cdot\text{s}\cdot\text{m}^{-2}$) en condiciones escotópicas y (E) en condiciones fotópicas. Todas las amplitudes de las respuestas mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los ratones control y *Pomt1* KOc (** $p < 0,001$). (F) Tiempo implícito en la respuesta de los bastones, de los conos y mixta, en el que también se observan diferencias estadísticamente significativas entre los controles y los animales *Pomt1* KOc (** $p < 0,001$). Figura modificada de Rubio-Fernández *et al.*, 2016.

En el laboratorio del Dr. Pedro de la Villa en la Universidad de Alcalá, con quien también colaboramos, se realizó una evaluación de la respuesta visual del modelo *Pomt1* KOc (Figura 4.2). Los registros electroretinográficos (ERG) obtenidos en los animales *Pomt1*^{+/lox}, *Pomt1*^{lox/lox} y *Pomt1*^{+/-} no mostraron diferencias significativas, y por tanto fueron considerados como animales control. En la evaluación del ratón *Pomt1* KOc se encontró una reducción en la amplitud de la onda b del ERG tanto en condiciones escotópicas (Figura 4.2A,B,D) como fotópicas (Figura 4.2C,E), así como un aumento del tiempo implícito de estas respuestas (Figura 4.2F) (Rubio-Fernández *et al.*, 2016). No existían, sin embargo, cambios en la amplitud de la onda a. Las alteraciones detectadas en los ratones *Pomt1* KOc eran indicativas de un defecto en la transmisión de la información visual entre los fotorreceptores (conos y bastones) y sus neuronas postsinápticas (células bipolares). Los trastornos en el ERG son comparables en su severidad con los causados por la pérdida del DG en la CPE (Omori *et al.*, 2012).

En este trabajo se describen las alteraciones estructurales y morfológicas presentes en la retina externa (sinapsis en la CPE) de los ratones *Pomt1* KOc, dada la ausencia de la proteína POMT1 en este tejido. También se estudiaron las alteraciones en la retina interna de los ratones KOc, presumiblemente a causa del daño funcional en la primera sinapsis. Los hallazgos identificados aquí, confirman los defectos fisiológicos que presenta a nivel visual este modelo animal de DGPs.

4.2 Materiales y Métodos.

4.2.1 Animales experimentales.

Los ratones *Pomt1* KOc fueron desarrollados en la Universidad Autónoma de Madrid, en el grupo del Dr. Jesús Cruces (Rubio-Fernández *et al.*, 2016) de acuerdo con la legislación europea (Directiva 2010/63/EU) y española (RD 53/2013) para el manejo de animales de experimentación, y con la aprobación de los comités de ética de la Universidad Autónoma de Madrid y la Universidad de Alcalá. La generación del animal modelo *Pomt1* KOc ha sido descrita en la introducción de este capítulo (Figura 4.1). Tras los estudios

fisiológicos realizados en la Universidad de Alcalá ([Figura 4.2](#)), se realizó el sacrificio de los ratones de acuerdo a las normas establecidas por ARVO (Association for Research in Vision and Ophthalmology, EEUU) para el uso de animales en investigación visual y oftalmológica.

4.2.2 Secciones verticales de retina.

Los ojos de ratones de entre 3-5 meses de edad fueron enucleados y fijados en una solución de paraformaldehído (PFA) al 4% en tampón fosfato salino (PBS) 0,1 M a pH 7,4 durante 1 h. Posteriormente, a cada ojo se le eliminó la córnea, el iris y el cristalino, y se criopreservó mediante inmersión secuencial en soluciones crecientes de sacarosa en PBS al 20%, 30% y 40%, durante 1 h, 1,5 h y toda la noche, respectivamente. Tras eliminar el exceso de sacarosa, el resto del globo ocular fue recubierto con el compuesto OCT (Tissue-Tek, Sakura Finetek) y congelado en N₂. Se obtuvieron secciones verticales de 14-16 μm utilizando un criostato Leica CM 1900 (Leica Microsystems), que se depositaron sobre portaobjetos Superfrost Plus (Thermo Scientific) y se almacenaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.2.3 Microscopía de inmunofluorescencia.

Algunas secciones verticales fueron teñidas con hematoxilina-eosina para la identificación general de la morfología de la retina, siguiendo procedimientos estandarizados ([Jörundsson et al., 1999](#)).

Para la microscopía de inmunofluorescencia, las preparaciones se descongelaron a temperatura ambiente, se realizaron 3 lavados con tampón fosfato (PB) durante 5 min cada uno, y se bloquearon con seroalbúmina bovina (BSA) al 5% en PB durante 1 h a temperatura ambiente. A continuación, tras lavar nuevamente 3 veces con PB durante 5 min cada vez, las secciones se incubaron en presencia de los correspondientes anticuerpos primarios, a las diluciones indicadas en la [Tabla 4.1](#), en PB suplementado con Triton X-100 al 1% (PBX) en una cámara humidificada con agitación suave durante una noche a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, se realizaron 3 nuevos lavados con PB, y las secciones se incubaron en oscuridad en presencia de anticuerpos secundarios anti-IgG de conejo, IgG de ratón y/o IgG de cabra (Molecular Probes),

conjugados con Alexa Fluor 488 (verde), Alexa Fluor 546 o 555 (rojo), o Alexa Fluor 647 (rojo lejano), todos ellos a una dilución 1:100 en PBX durante 1 h en cámara humidificada. Simultáneamente, las secciones fueron incubadas con el colorante 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) para teñir los núcleos celulares, y en algunos casos con aglutinina de cacahuete (PNA) conjugada a fluoresceína (Vector Laboratoire) para marcar los pedículos de los conos. Finalmente, tras lavar de nuevo 3 veces con PB, cada portaobjetos se montó añadiendo una gota de Citifluor AF1 (Citifluor Ltd.) y un cubreobjetos, sellado con laca de uñas. Como controles negativos, se incubaron en paralelo secciones de retina con PBX en las que se omitieron los anticuerpos primarios, con el fin de comprobar que la inmunoreactividad no provenía de los anticuerpos secundarios.

Tabla 4.1. Anticuerpos primarios.

Antígeno	Origen	Casa comercial, nº de catálogo	Dilución
β -Distroglicano	Ratón (mAb)	Abcam, clon 8D5, ab49515	1:100
Bassoon	Ratón (mAb)	Enzo Life Sciences, clon SAP7F407, ADI-VAM-PS003	1:1000
c- Arrestina	Conejo (pAb)	Millipore, AB15282	1:500
Calbindina	Ratón (mAb)	Sigma, clon CB-955, C9848	1:500
Calretinina	Cabra (pAb)	Swant, CG1	1:500
CRALBP	Conejo (pAb)	Proteintech, 15356	1:100
CtBP2	Ratón (mAb)	BD Transduction Labs., clon 16/CtBP2, 612044	1:1000
Distrofina	Conejo (pAb)	Abcam, ab15277	1:100
GFAP	Ratón (mAb)	Sigma, clon G-A-5, G3893	1:500
Pikachurina	Conejo (pAb)	Proteintech, 14578-1-AP	1:50
PKC α	Ratón (mAb)	Santa Cruz Biotechnology, clon MC5, sc-80	1:100
PKC α	Conejo (pAb)	Santa Cruz Biotechnology, sc-10800	1:100
Recoverina	Conejo (pAb)	Millipore, AB5585	1:500
Rodopsina	Ratón (mAb)	Millipore, clon Rho 1D4, MAB5356	1:250
Sinaptofisina	Conejo (mAb)	Abcam, clon EP1098Y, ab52636	1:500

Se indica para cada anticuerpo, en la 1ª columna el antígeno, en la 2ª su especie de origen y entre paréntesis la clonalidad (mAb: monoclonal; pAb: policlonal), en la 3ª la casa comercial de la que se obtuvo y su número de referencia (se especifica también el nº del clon para los mAb) y en la 4ª la dilución a la que se empleó para microscopía.

Las secciones se observaron en un microscopio confocal espectral invertido Leica TCS SP2. Para la inmunofluorescencia se utilizaron tres fuentes de láser: 1) azul de Ar, con una λ de excitación de 450-490 nm; 2) verde de He-Ne, con una λ de excitación de 515-560 nm y 3) rojo de He-Ne, con una λ de excitación 633 nm. Para la visualización del colorante DAPI se utilizó un diodo UV, que emitía a una λ de 405 nm. En los casos en que se visualizaron dos o más fluoróforos sobre la misma muestra, estos fueron excitados secuencialmente, y no simultáneamente, para evitar interferencias entre los canales de emisión. Los objetivos utilizados fueron Leitz Plan-apocromáticos de inmersión en aceite mineral, de 40 \times , 63 \times y 100 \times . La platina del microscopio era galvanométrica de alta precisión y alta velocidad para controlar el eje z. Las fotografías, obtenidas a una resolución de 300 dpi, se almacenaron en formato TIFF y se procesaron mediante el programa Adobe Photoshop CS5 v.12.0 (Adobe Systems).

4.2.4 Análisis estadístico.

El grosor de la capa nuclear externa (CNE) y la capa plexiforme externa (CPE) se midió en secciones transversales de retina cuyos núcleos habían sido teñidos con el colorante DAPI. Se eligieron secciones cercanas al nervio óptico (aprox. 2-5 mm), para asegurar que la comparación se realizaba en las mismas regiones de la retina en los diferentes animales. Se analizaron 4 ratones KOc y 4 controles, y al menos 7 fotografías en cada animal obtenidas con el objetivo de 63 \times . El grosor de la CNE y la CPE se cuantificó usando el programa ImageJ v1.47 (NHI) a partir de un mínimo de 30 mediciones lineales en cada fotografía.

El cálculo de la intensidad de la fluorescencia se realizó igualmente con el software ImageJ. Cada imagen fue capturada con el microscopio confocal, utilizando los mismos parámetros de potencia, ganancia, apertura del iris y tamaño. Se calculó el promedio de más de 20 imágenes para cada tipo de animal, (n=4). La intensidad relativa se definió como: (densidad integrada – área seleccionada) \times intensidad media del fondo, así se obtuvo la intensidad relativa corregida. Para comparar los promedios obtenidos, se realizó el test t de Student para muestras independientes, utilizando el software Prism v.5.01 (GraphPad Software). Los datos se expresaron como la media \pm error estándar de la media (SEM), y se consideró estadísticamente significativo un valor $P < 0,001$.

4.3 Resultados

Los resultados aquí descritos, constituyen parte de un trabajo multidisciplinar realizado entre tres grupos de investigación de la Universidad Autónoma de Madrid, la Universidad de Alcalá y la Universidad de Alicante. El objetivo común en este estudio fue la caracterización genética, morfológica y funcional de un animal modelo de distroglicanopatías: un ratón knockout condicional (KOc) para el gen *Pomt1*, que experimentaba una delección intragénica específicamente en los fotorreceptores durante el desarrollo de la retina.

4.3.1 Morfología de la retina de ratones *Pomt1* KOc.

Tras la caracterización genética y funcional de los animales *Pomt1* KOc (ver [4.1 introducción](#) de este capítulo), se realizó un análisis morfológico de la retina. Para ello, se llevó a cabo una tinción con hematoxilina-eosina de secciones transversales de criostato de las retinas de ratones mutantes y controles. En la evaluación histológica de los animales control, se observaron todas las capas nucleares y plexiformes de la retina sin alteraciones apreciables, en la distribución de los cuerpos celulares, ni en el grosor aparente de las cinco capas, como se muestra en la [Figura 4.3A](#). En el animal KOc, se observaron importantes alteraciones en la CNE, de mayor interés en este estudio ya que contiene las células en las que se inactiva el gen *Pomt1*, y en la CPE, donde establecen contacto las células fotorreceptoras con sus células postsinápticas ([Figura 4.3B](#)). La zona comprendida por la CNE, la CPE y la capa nuclear interna (CNI), presentó un elevado grado de desestructuración. Algunos de los núcleos de esta zona, correspondientes a los fotorreceptores, células bipolares y horizontales, y glía de Müller, aparecen desplazados de la CNE a la CPE y de la CNI a la CPE, ocupando en este desplazamiento la CPE, presentando así, esta última un menor espesor con respecto a los controles. En contraste, en la capa plexiforme interna (CPI) y la capa de células ganglionares (CCG) se destaca la preservación de la citoarquitectura retiniana tanto en la distribución como en la morfología de las células.

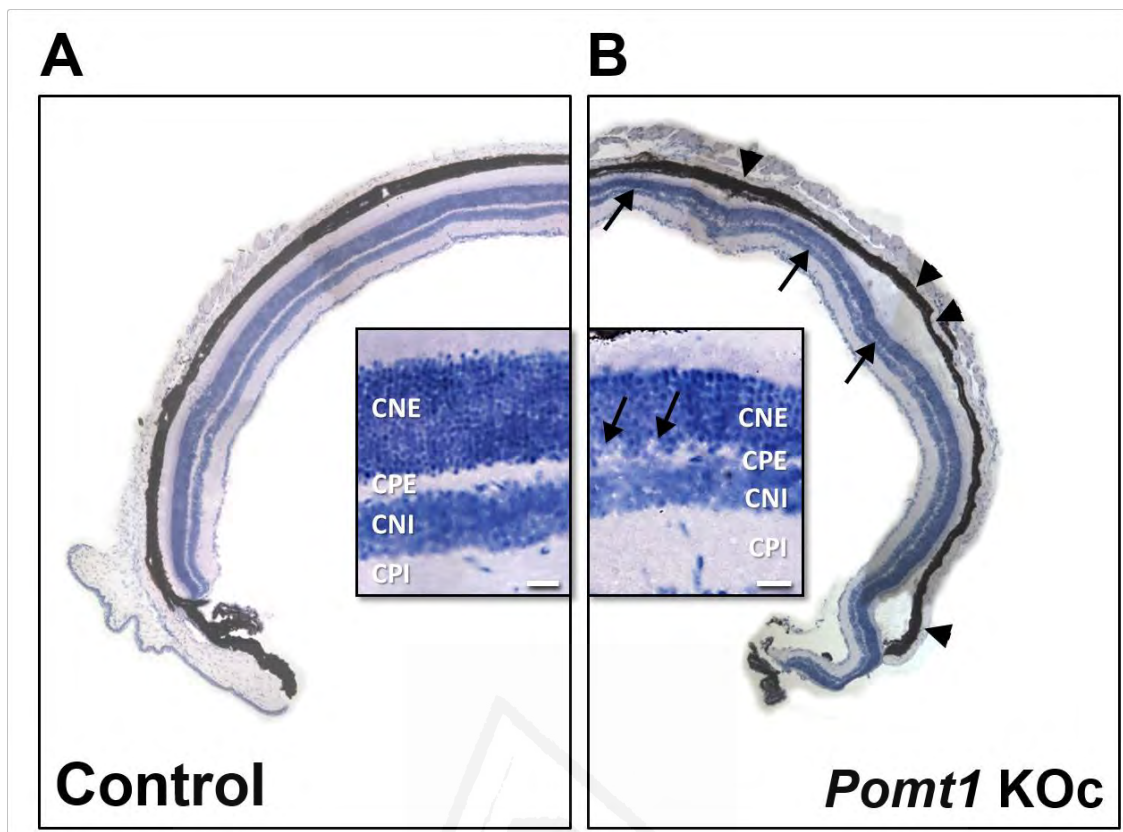


Figura 4.3. Análisis histológico de la retina de ratones control y *Pomt1* KOc. Secciones transversales de la retina de ratones control (A) y *Pomt1* KOc (B) teñidas con hematoxilina-eosina. En la retina de los ratones control se observa una distribución normal de las capas celulares y plexiformes. En la retina del ratón KOc se ve una clara desestructuración de las capas externas, zonas con desprendimiento de retina (cabeceras de flecha) y disminución del espesor de la CPE (flechas). En los recuadros centrales se muestran secciones ampliadas de la retina de ambos animales. Barra de escala: 20 µm. Abreviaturas: CNE, capa nuclear externa; CPE, capa plexiforme externa; CNI, capa nuclear interna; CPI, capa plexiforme interna.

Con el objeto de cuantificar el espesor de las capas de la retina de los ratones *Pomt1* KOc y controles, se utilizaron secciones transversales de dicho tejido, teñidas con el colorante nuclear DAPI (Figura 4.4A,B). A partir de un mínimo de 7 fotografías de cada sección de retina, se realizó la medición del espesor de la CNE, la CPE, la CNI, la CPI y la CCG en secciones cercanas al nervio óptico (Figura 4.4C).

La CNE de los ratones *Pomt1* KOc presentó un espesor menor ($49,69 \pm 0,53 \mu\text{m}$) que la de los ratones control ($60,72 \pm 0,32 \mu\text{m}$) (Figura 4.4A,B). Al igual que en la CNE, también se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,001$) en el espesor de la CPE, siendo más delgada en la retina de los animales KOc ($6,19 \pm 0,14 \mu\text{m}$) que en los controles ($11,23 \pm 0,15 \mu\text{m}$) (Figura 4.4C). Sin embargo, el espesor de la

CNI ($41,32 \pm 0,49 \mu\text{m}$), la CPI ($47,80 \pm 0,34 \mu\text{m}$) y la CCG ($12,10 \pm 0,41 \mu\text{m}$) en los ratones *Pomt1* KOc, no mostró diferencias estadísticamente significativas con respecto al espesor de la CNI ($43,24 \pm 0,24 \mu\text{m}$), la CPI ($47,28 \pm 0,44 \mu\text{m}$) y la CCG ($12,60 \pm 0,40 \mu\text{m}$), en la retina de los controles (Figura 4.4C).

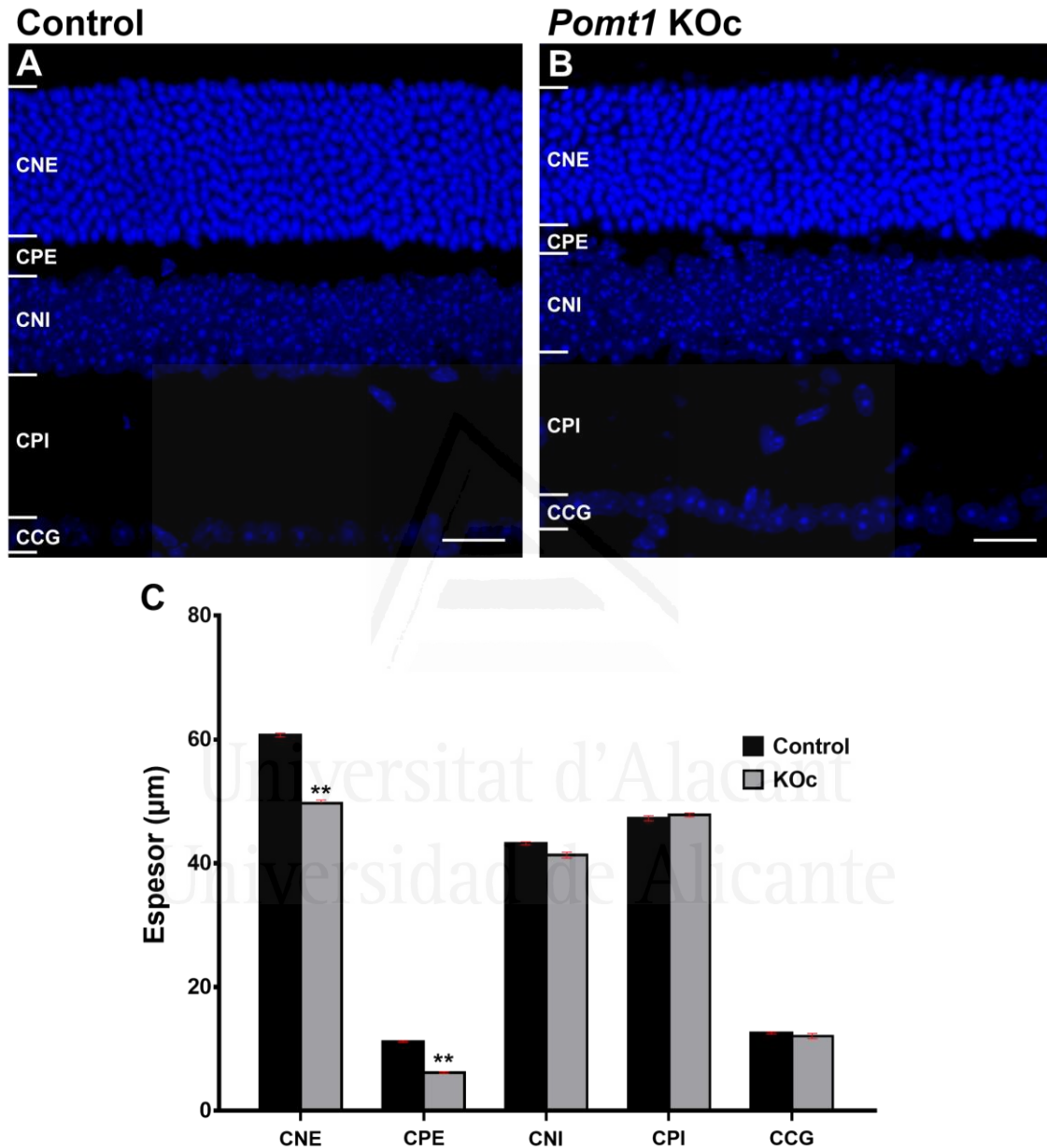


Figura 4.4. Espesor de las capas de la retina en ratones control y *Pomt1* KOc. Secciones transversales de la retina de ratones control (A) y *Pomt1* KOc (B) teñidas con el colorante nuclear DAPI. Se observa un destacado adelgazamiento de la CNE y la CPE en los ratones *Pomt1* KOc en comparación con los ratones control. (C) Espesor de las capas de la retina de ratones control y *Pomt1* KOc. Las barras corresponden a la media, y el valor SEM se muestra en rojo. Test *t*-Student: ** $p < 0,001$. Abreviaturas: CNE, capa nuclear externa; CPE, capa plexiforme externa; CNI, capa nuclear interna; CPI, capa plexiforme interna; CCG, capa de células ganglionares. Barra de escala: 20 μm.

4.3.2 Cambios morfológicos de la retina externa del ratón *Pomt1* KOc.

Dado que el ratón modelo *Pomt1* KOc experimenta una delección en el gen *Pomt1* selectivamente en los fotorreceptores, se realizaron estudios inmunohistoquímicos para determinar los cambios morfológicos en este tipo celular de la retina, en el cual tiene lugar el proceso de la fototransducción. Así mismo, se analizaron los contactos sinápticos establecidos entre estas y las células bipolares y horizontales en la CPE. Para ello, se realizaron inmunotinciones con anticuerpos contra dos proteínas específicas de los fotorreceptores: rodopsina (bastones) y c-arrestina (conos), junto a la recoverina, que se expresa en bastones y conos (Figura 4.5).

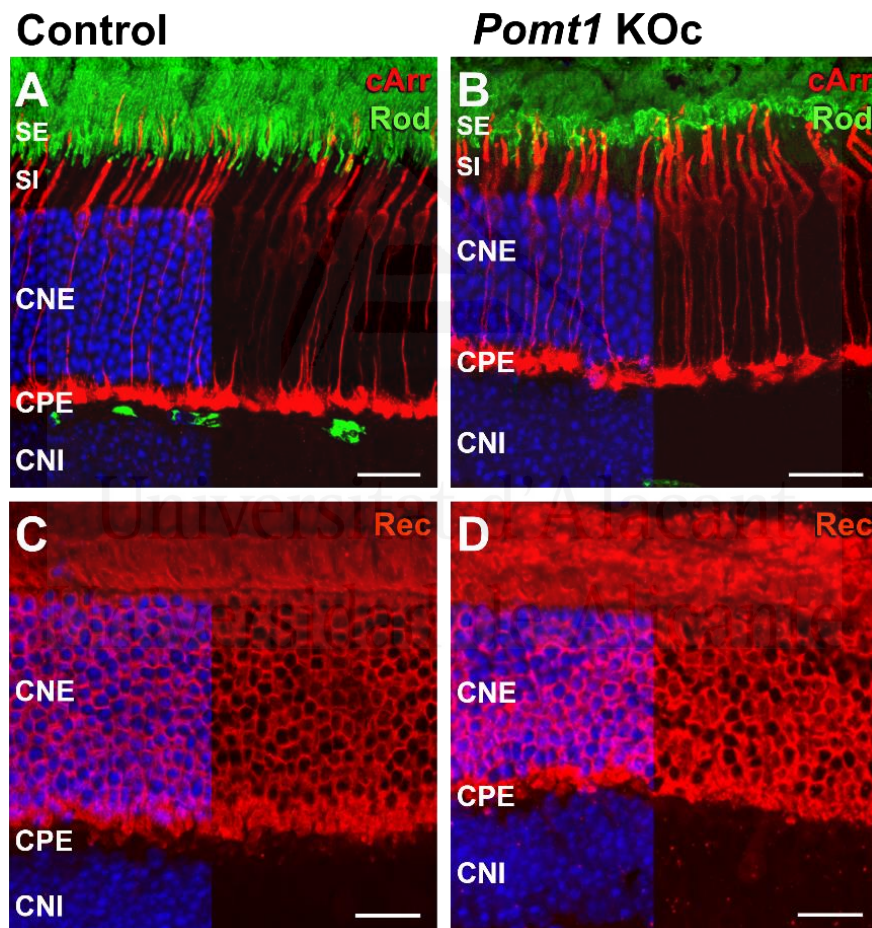


Figura 4.5. Alteraciones estructurales de los fotorreceptores en la retina de ratones *Pomt1* KOc. Doble inmunotinción de las proteínas c-arrestina (cArr; rojo) y rodopsina (Rod; verde) en la retina de ratones control (A) y *Pomt1* KOc (B). La proteína cArr presenta inmunorreactividad en los segmentos externos (SE) e internos (SI) y en los cuerpos celulares de los conos y la proteína Rod únicamente en los SE de los bastones. Inmunotinción de la proteína recoverina (Rec; rojo) en la retina de ratones control (C) y *Pomt1* KOc (D). En la mitad izquierda de cada micrografía, se muestran los núcleos teñidos con DAPI. Abreviaturas: SE, segmentos externos; SI, segmentos internos; CNE, capa nuclear externa; CPE, capa plexiforme externa; CNI, capa nuclear interna. Barras de escala: 20 μ m.

Los ratones control y *Pomt1* KOc no mostraron alteraciones morfológicas importantes en los fotorreceptores. Presentaron un patrón normal en la distribución de la rodopsina, una proteína transmembrana implicada en la cascada de la transducción visual en los bastones, de la arrestina de conos, que se expresa específicamente en fotorreceptores de tipo conos y la glándula pineal (Figura 4.5A,B), y de la recoverina, presente en todo el cuerpo celular de los fotorreceptores (Figura 4.5C,D). No obstante, se observó un cierto acortamiento de los SE de conos y bastones, así como de los axones de los conos (Figura 4.5B) en ratones *Pomt1* KOc en comparación con los controles.

Con el fin de investigar posibles alteraciones en la estructura de las sinapsis establecidas entre los terminales de los axones de los fotorreceptores y las células horizontales, se realizó una doble inmunotinción con anticuerpos contra sinaptofisina, una proteína de la vesícula presináptica, y contra la calbindina, que marca las células horizontales. No se observaron diferencias evidentes entre las retinas de ratones control y *Pomt1* KOc en el patrón de inmunotinción de sinaptofisina o en la morfología y el número de células horizontales (Figura 4.6A,B). También, con el objetivo de evaluar los contactos sinápticos en la CPE entre fotorreceptores y células bipolares, se utilizaron los anticuerpos contra Bassoon, una proteína asociada a la cintilla sináptica, y contra la proteína quinasa C (isoforma α), un marcador de células bipolares de bastón. Este doble inmunomarcaje no mostró diferencias en el patrón de asociación entre Bassoon y las dendritas de las células bipolares de bastón (Figura 4.6C,D). Sin embargo, sí se observó un crecimiento anormal (“sprouting”) de las dendritas de las células bipolares de bastón, hacia el interior la CNE. Este crecimiento anómalo ocurrió junto con la retracción de los terminales presinápticos de los fotorreceptores ya mencionada (Figura 4.5B).

Continuando con la evaluación del efecto del “noqueado” condicional del gen *Pomt1* sobre la estructura de la CPE de la retina, y dado que la proteína POMT1 participa en la ruta de O-glicosilación del α -DG, se realizó un análisis mediante microscopía confocal de inmunofluorescencia utilizando anticuerpos contra algunos de los elementos constitutivos del complejo distrofina-glicoproteína y proteínas asociadas al mismo. En la retina de los ratones control, el β -DG se localizó en los terminales presinápticos de los fotorreceptores, mostrando un patrón punteado a lo largo de la CPE

(Figura 4.7A,C), como es esperable. Por el contrario, en la retina de los ratones *Pomt1* KOc la inmunorreactividad del β -DG estaba ausente en esta capa (Figura 4.7B,D).

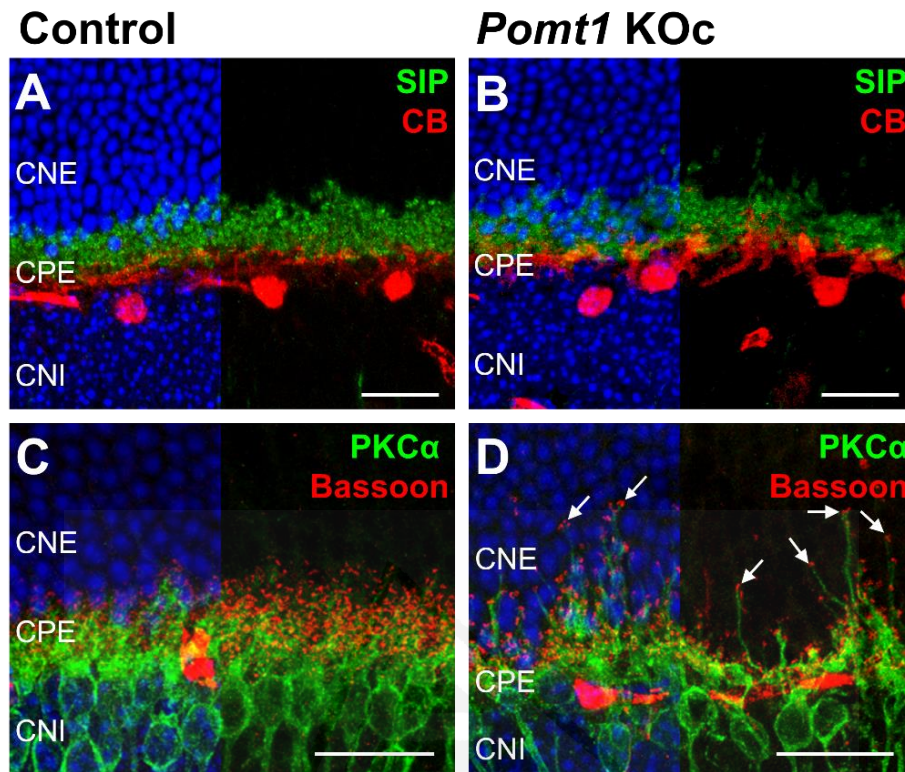


Figura 4.6. Alteraciones estructurales en la CPE de ratones *Pomt1* KOc. Análisis inmunohistoquímico con anticuerpos contra la sinaptofisina (SIP; verde) y la calbindina (CB; rojo) en la retina de ratones control (A) y de ratones *Pomt1* KOc (B). Doble inmunotinción de los contactos entre las terminales presinápticas, marcadas con el anticuerpo contra la proteína Bassoon (rojo) y las dendritas de las células bipolares, marcadas con el anticuerpo contra la isoforma alfa de la proteína quinasa C (PKC α , verde), en la retina de ratones control (C) y de ratones *Pomt1* KOc (D). Las dendritas de las células bipolares de bastón muestran crecimiento “sprouting” invadiendo la CNE en la retina de ratones mutantes (D, flechas). Los núcleos teñidos con DAPI son mostrados en la mitad izquierda de cada micrografía. Abreviaturas: CNE, capa nuclear externa; CPE, capa plexiforme externa; CNI, capa nuclear interna; CPI, capa plexiforme interna. Barras de escala: 20 μ m.

Adicionalmente, se observó una señal intensa de inmunofluorescencia del β -DG en los tres plexos vasculares de la retina: superficial, intermedio y profundo, que no mostró diferencias entre los ratones control y KOc, al igual que ocurría en la MLI, donde el β -DG mantuvo su distribución continua en ambos animales (Figura 4.7A,B). Con respecto a la distrofina, una proteína encargada de actuar como nexo de unión entre el β -DG y el citoesqueleto en los terminales presinápticos de conos y bastones, se encontró distribuida a lo largo de la CPE en forma de un patrón punteado, colocalizándose significativamente con el β -DG en la retina de los animales control (Figura 4.7C). En la

retina de los ratones KOc, el patrón de distribución de la distrofina fue esencialmente el mismo que en los controles. Sin embargo, se observó una cierta pérdida de alineamiento de los puntos inmunorreactivos para esta proteína (Figura 4.7D). En contraste, la inmunotinción observada para la pikachurina, una proteína de la MEC en la CPE, que se asocia al α -DG glicosilado (Sato *et al.*, 2008), mostró un patrón punteado en los ratones control (Figura 4.7E) que se encontraba totalmente ausente en los animales *Pomt1* KOc (Figura 4.7F).

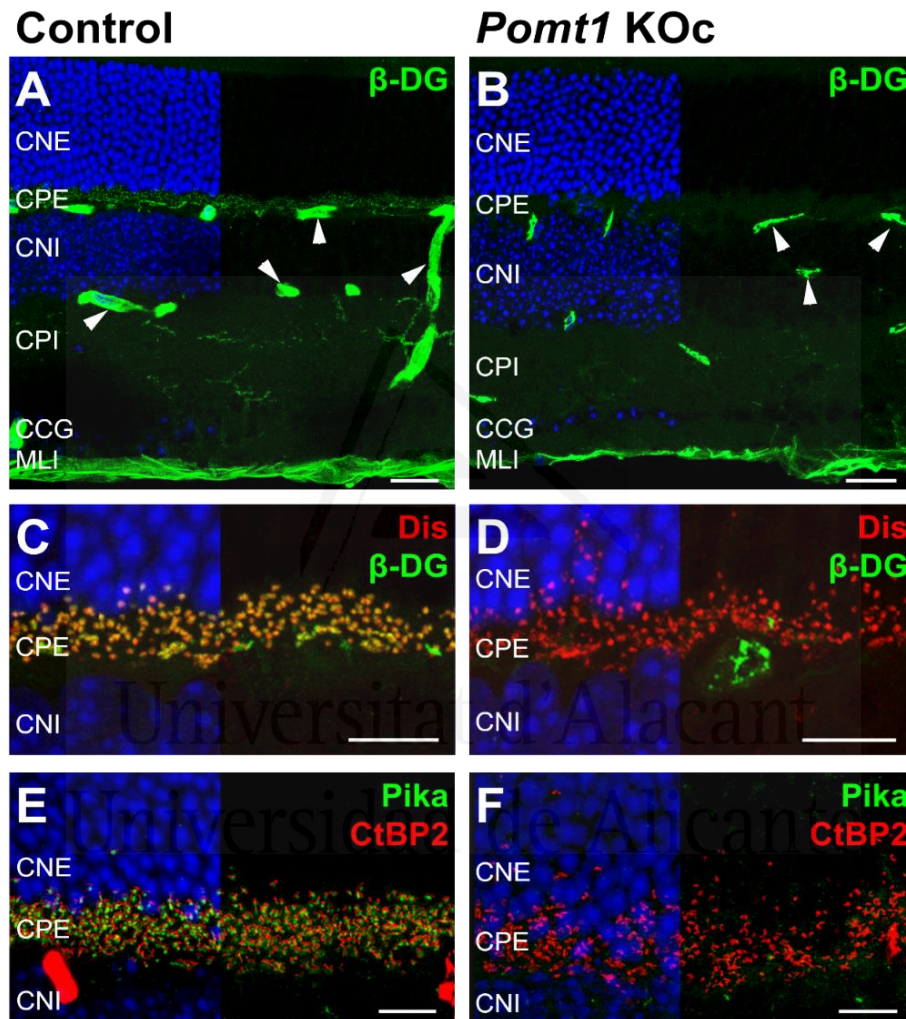


Figura 4.7. Alteraciones en los elementos del DGC y proteínas asociadas, en la CPE de ratones *Pomt1* KOc. Secciones transversales de retina de ratones control (A,C,E) y *Pomt1* KOc (B,D,F) se inmunomarcaron con anticuerpos contra el β -DG (A-D; verde), la distrofina (Dis: C,D; rojo), la pikachurina (Pika: E,F; verde) y CtBP2 (E,F; rojo). El β -DG y la pikachurina se encontraban ausentes en la CPE de ratones *Pomt1* KOc, por el contrario, la distrofina y CtBP2 permanecían inalteradas en ambos animales. El β -DG no mostró diferencia en los vasos sanguíneos (A,B; cabezas de flecha) ni en la MLI de los ratones *Pomt1* KOc, en comparación con los controles. Los núcleos teñidos con DAPI son mostrados en la mitad izquierda de cada micrografía. Abreviaturas: CNE, capa nuclear externa; CPE, capa plexiforme externa; CNI, capa nuclear interna; CCG, capa de células ganglionares; MLI, membrana limitante interna. Barras de escala: 10 μ m, excepto en A y B: 20 μ m.

(Figura 4.7F). Por el contrario, la proteína CtBP2, un marcador de la cintilla sináptica que presenta forma de herradura en el terminal sináptico de los fotorreceptores, no mostró cambios apreciables en su estructura, a juzgar por su patrón normal de inmunotinción en los mutantes *Pomt1* KOc (Figura 4.7E,F).

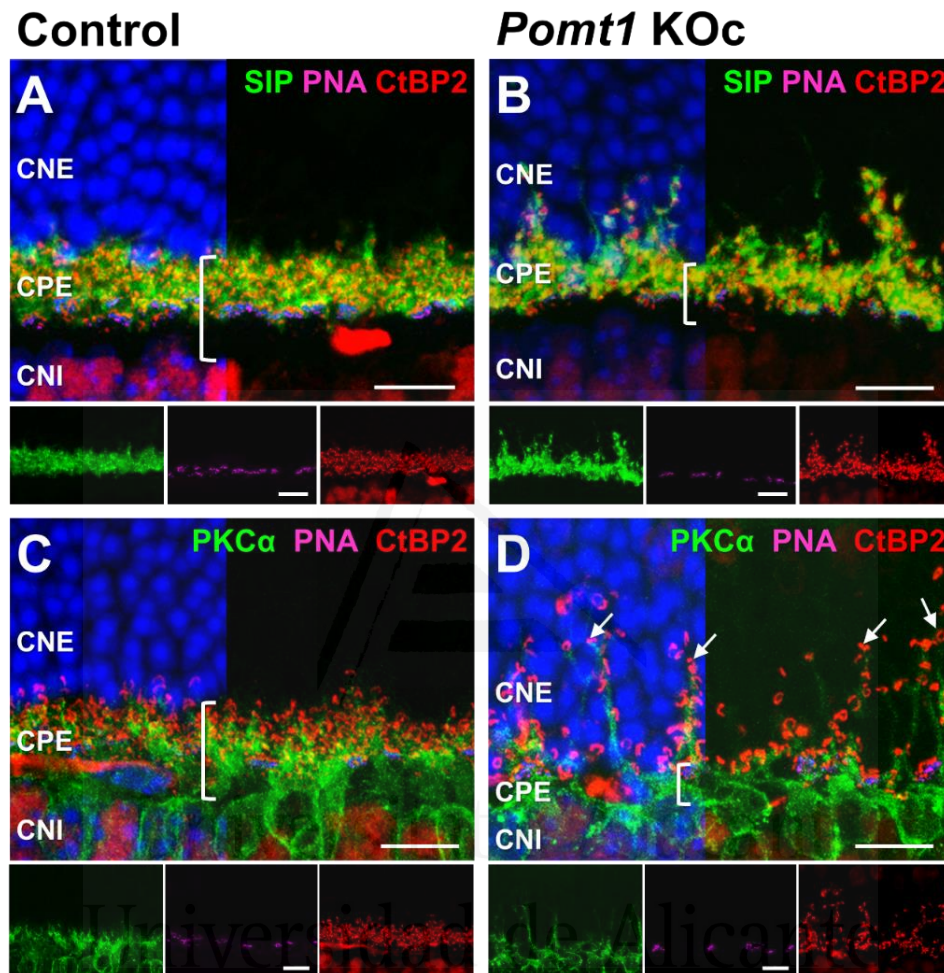


Figura 4.8. Alteraciones en los terminales pre- y postsinápticos en la CPE de ratones *Pomt1* KOc. Secciones transversales de la retina de ratones control (A,C) y *Pomt1* KOc (B,D) se inmunomarcaron con anticuerpos contra las proteínas CtBP2 (A-D; rojo), sinaptofisina (Sip; A,B; verde) y PKC α (C,D; verde), y con la lectina PNA (A-D; magenta). Los núcleos teñidos con DAPI aparecen en la mitad izquierda de cada micrografía. En la retina de los animales KOc se observa una pérdida del normal alineamiento en la CPE entre las proteínas sinápticas ubicadas en la mitad superior de esta capa (corchetes) y un crecimiento anormal (“sprouting”) de las dendritas de las células bipolares invadiendo la CNE (D, flechas). Los recuadros debajo de cada micrografía muestran los tres canales de fluorescencia por separado. Abreviaturas: CNE, capa nuclear externa; CPE, capa plexiforme externa; CNI, capa nuclear interna. Barras de escala: 10 μ m.

Dadas las alteraciones observadas en la retina de los ratones *Pomt1* KOc, como son: la cierta desestructuración general de la CPE (Figura 4.3B), la retracción de los SE y de los terminales presinápticos de los fotorreceptores (Figura 4.5B y Figura 4.6B,D), y

el crecimiento anormal de las dendritas de células bipolares de bastón hacia la CNE (Figura 4.6D), se realizaron dobles inmunomarcajes con anticuerpos contra proteínas seleccionadas de entre las presentes en los terminales axónicos de las células fotorreceptoras, con el objeto de identificar diferencias en la estructura de estas últimas. Mediante este análisis inmunohistoquímico se observó un desalineamiento de los terminales presinápticos, tanto de los conos como de los bastones, en la CPE de los ratones KOc, detectable utilizando anticuerpos contra las proteínas CtBP2 (Figura 4.8A-D) y sinaptofisina (Figura 4.8A,B), además de la lectina PNA (Figura 4.8A-D), que se une a los terminales sinápticos de los conos. Esta anomalía se asoció con el crecimiento e invasión de la CNE por parte de las dendritas de las células bipolares de bastón en los ratones KOc, marcadas con PKC α , aunque sin pérdida aparente de los contactos sinápticos con las esférulas de los bastones en los ratones mutantes (Figura 4.8D; flechas).

4.3.3 Cambios morfológicos en la retina interna del ratón *Pomt1* KOc.

Si bien la inactivación del gen *Pomt1* en los animales KOc se diseñó para tener lugar en la retina externa, específicamente en los fotorreceptores, se estudió también el posible efecto de la pérdida de su producto proteico a nivel de la retina interna. Con el objeto de explorar esta última, en los ratones *Pomt1* KOc, se utilizaron anticuerpos contra las proteínas calretinina, un marcador de células amacrinas y ganglionares de ratón; PKC α , que se expresa ampliamente en las células bipolares de bastón; CRALBP, un componente fundamental de las células gliales de Müller; y GFAP, que se expresa constitutivamente en los astrocitos y también en la glía reactiva durante procesos degenerativos, inflamatorios o infecciosos de la retina (Cuenca *et al.*, 2014).

La doble inmunotinción realizada con los anticuerpos contra la calretinina y la PKC α no mostró diferencias en la distribución e intensidad de estas proteínas entre los ratones KOc y los controles (Figura 4.9A-B). Con el anticuerpo contra la calretinina se observaron las células ganglionares y las células amacrinas con sus conexiones sinápticas en la CPI, y con el anticuerpo contra la proteína PKC α las células bipolares de bastón que se distribuyen en la CNI. Según estos resultados, la supresión del gen *Pomt1* de forma condicional en la retina interna de los ratones KO, no altera la morfología y estructura

de las principales neuronas de la retina interna. Sin embargo, se observa de nuevo el alargamiento de las dendritas de las células bipolares invadiendo la CNE, como se ha mencionado antes (Figura 4.6D y Figura 4.8D)

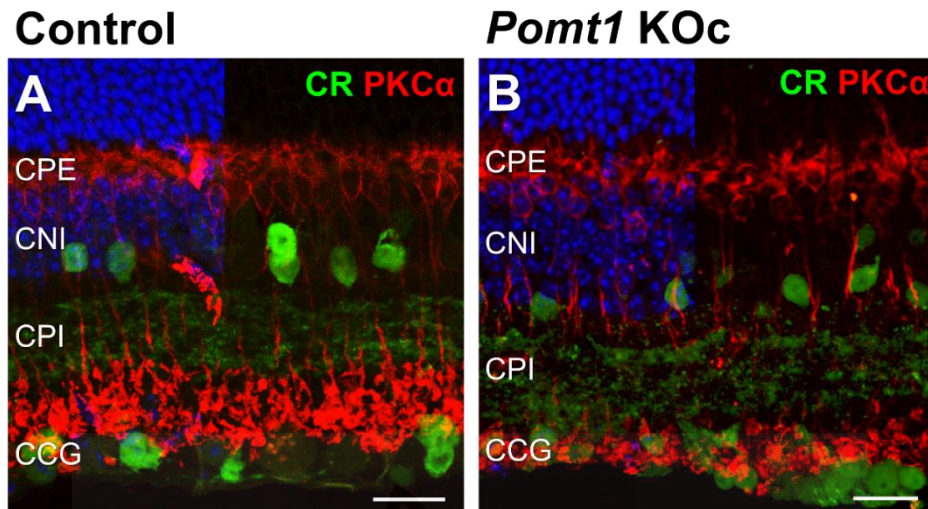


Figura 4.9. Alteraciones en las células de la retina interna en ratones *Pomt1* KOc. Células marcadas con anticuerpos contra las proteínas calretinina (verde) y PKCα (rojo) en secciones de retina de ratón control (A) y *Pomt1* KOc (B). No se encontraron diferencias en la expresión de estas dos proteínas entre ambos animales. En la mitad izquierda de cada micrografía se observan los núcleos teñidos con DAPI. Abreviaturas: CPE, capa plexiforme externa; CNI, capa nuclear interna; CPI, capa plexiforme interna; CCG, capa de células ganglionares. Barras de escala: 20 μm.

El inmunomarcaje de las proteínas CRALBP y GFAP se muestra en la Figura 4.10. En este se observó un aumento de inmunoreactividad de la GFAP en la CCG de la retina de los ratones mutantes, en comparación con la retina de los controles (Figura 4.10A-B), mientras que el marcador CRALBP no mostró diferencias evidentes entre ambos animales. Con el objetivo de comparar la intensidad de ambos inmunomarcajes en los dos grupos de animales, se realizó un análisis cuantitativo de la intensidad de fluorescencia de cada proteína en la retina de ratones *Pomt1* KOc y control. Este análisis mostró diferencias estadísticamente significativas para la proteína GFAP (Figura 4.10C; $p < 0,001$) entre ambos animales, con una mayor intensidad relativa en la retina de los ratones *Pomt1* KOc ($154,86 \pm 9,59$) que en la retina de los ratones control ($66,63 \pm 2,91$). La cuantificación de la fluorescencia de la proteína CRALBP no reveló diferencia estadísticamente significativa entre los ratones control y *Pomt1* KOc ($p = 0,667$). Dichos efectos podrían ser bien secundarios de la mutación, o bien el reflejo de una reacción inmunológica ante los defectos estructurales ocurridos en la retina externa

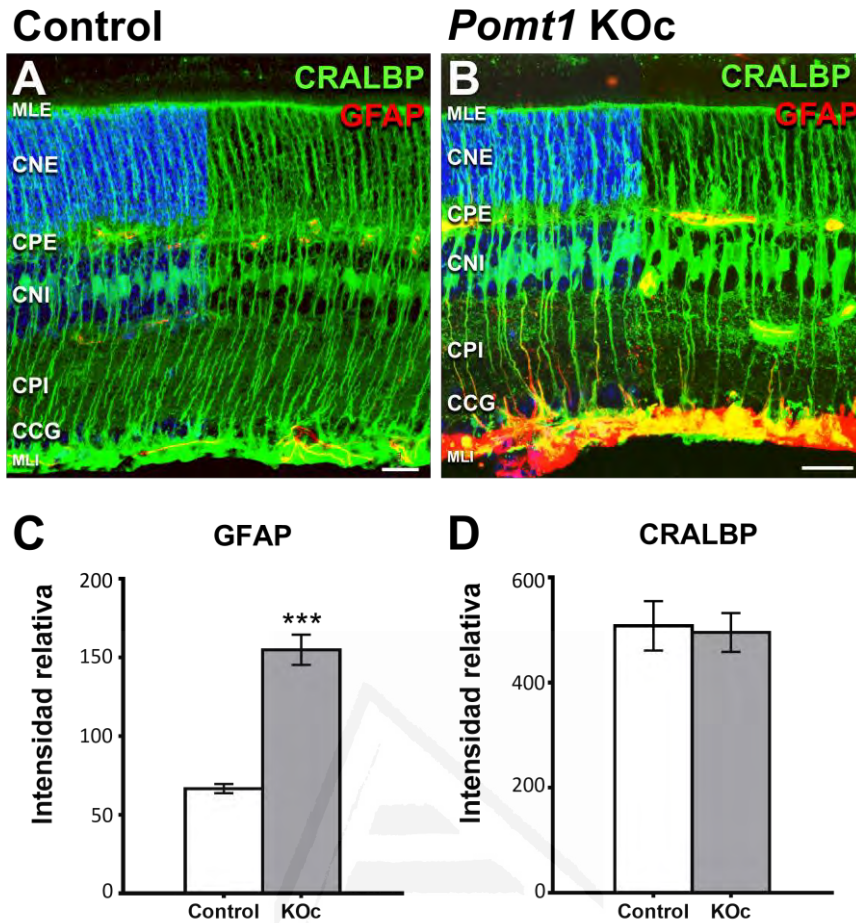


Figura 4.10. Alteraciones en la glía de Müller en la retina de ratones *Pomt1* KOc. Doble inmunotinción de secciones de la retina de ratones control (A) y *Pomt1* KOc (B) para CRALBP (verde) y GFAP (rojo). Cuantificación de la intensidad relativa de GFAP (C) y CRALBP (D), las barras representan la media de la intensidad relativa \pm el error estándar de la media. La tinción con el anticuerpo contra la proteína CRALBP, muestra niveles de expresión similares en la retina de ambos animales ($p=0,667$). Por el contrario, se observa un gran aumento en los niveles de la proteína GFAP en la retina de ratones *Pomt1* KOc, en comparación con los controles (***) ($p<0,001$). En la mitad izquierda de cada micrografía se muestran los núcleos teñidos con DAPI. Abreviaturas: MLE, membrana limitante externa, CNE, capa nuclear externa; CPE, capa plexiforme externa; CNI, capa nuclear interna; CPI, capa plexiforme interna; CCG, capa de células ganglionares; MLI, membrana limitante interna. Barras de escala: 40 μ m.

4.4 Discusión

Las distroglicanopatías, recientemente designadas como distrofias musculares-distroglicanopatías (MDDGs), son un grupo de distrofias neuromusculares congénitas recesivas causadas por mutaciones en 18 genes identificados hasta el momento (Endo, 2015; Yoshida-Moriguchi & Campbell, 2015). Uno de los genes más conocidos y frecuentemente asociado a las MDDGs es *POMT1*. La proteína que codifica este gen es responsable del primer paso en la *O*-manosilación del α -DG, una glicoproteína que une la distrofina del citoesqueleto a la MEC en las células musculares y nerviosas, y que desempeña un papel fundamental en la formación y funcionamiento de la sinapsis en la retina (Endo, 2015; Mercer & Thoreson, 2011; Yoshida-Moriguchi *et al.*, 2010). Los pacientes que sufren MDDGs asociadas a mutaciones en *POMT1*, tales como WWS o MEB, usualmente presentan anomalías oculares graves, que en numerosos casos implican síntomas retinianos como son atrofia corioretinal, displasia retiniana, desprendimiento de retina, disgénesis vítreo-retinal y/o atrofia del nervio óptico (Beltrán-Valero de Bernabé *et al.*, 2002; Cormand *et al.*, 2001; Godfrey *et al.*, 2007; Mercuri *et al.*, 2009), lo cual subraya la importancia del DG y su glicosilación adecuada durante el desarrollo del ojo. En este contexto, se ha demostrado que el gen *Pomt1* se expresa, durante la embriogénesis del ratón, en el sistema nervioso, el músculo y el ojo (Prados *et al.*, 2007), coincidiendo con los tejidos más afectados en pacientes con WWS y otras MDDGs, donde se también se expresan el gen *POMT2* (Lommel *et al.*, 2008) y la proteína β -DG (Anderson *et al.*, 2007). Se ha propuesto, así, que la deficiencia de la proteína *POMT1* está relacionada con las anomalías oculares detectadas en los pacientes que sufren estas enfermedades.

En la retina adulta de mamíferos, el DG se encuentra presente como parte del DGC: i) en la CPE, donde los fotorreceptores forman sinapsis con las células horizontales y bipolares; ii) en la retina interna, donde los pies terminales de las células de Müller se unen para formar la MLI; y iii) en los vasos sanguíneos, responsables de nutrir y mantener la homeostasis de la retina (Daloz *et al.*, 2001; Drenckhahn *et al.*, 1996; Haenggi & Fritschy, 2006; Mercer & Thoreson, 2011; Schmitz & Drenckhahn, 1997). En

la CPE la función del DG es crucial para la formación de la cintilla sináptica y la correcta conexión funcional entre los terminales presinápticos de los fotorreceptores y las dendritas de las células bipolares y horizontales (Haenggi & Fritschy, 2006; Omori *et al.*, 2012; Sato *et al.*, 2008). Su apropiada glicosilación es fundamental para su unión a la pikachurina, la proteína de unión al DG mejor caracterizada en la retina, y exclusiva de este tejido (Hu *et al.*, 2011; Kanagawa *et al.*, 2010; Sato *et al.*, 2008).

La inactivación dirigida de los genes que codifican POMT1 (Willer *et al.*, 2004) o fukutina (Takeda *et al.*, 2003), causa la muerte embrionaria durante el desarrollo temprano en ratones, al igual que ocurre en los ratones con una mutación nula en el gen del DG (Williamson *et al.*, 1997). Esto es atribuible a los efectos de la pérdida de glicosilación del α -DG sobre la formación e integridad de la membrana de Reichert, una estructura específica del desarrollo embrionario de los roedores, responsable de la separación de la circulación materna y fetal (Salamat *et al.*, 1995). Para evitar este inconveniente, nuestro grupo colaborador en la Universidad Autónoma de Madrid ha desarrollado un ratón KO condicional, que experimenta una delección de los exones 3 y 4 del gen *Pomt1* selectivamente en los fotorreceptores (ver introducción de este capítulo; Rubio-Fernández *et al.*, 2016). Esta delección causa la aparición en la retina de un transcrito de ARNm del alelo nulo de *Pomt1*, el cual contiene un codón de parada prematuro. En este ratón modelo *Pomt1* KOc, el α -DG no presenta glicosilado el epítipo reconocido por el anticuerpo VIA4-1 y pierde su capacidad de unión a laminina en la retina (Figura 4.1C), comportándose el animal genética y bioquímicamente como se esperaba. Estos resultados demuestran la importancia de la actividad de POMT1 para la interacción del DG con la laminina en la retina, al igual que ha sido demostrada en el músculo (Akasaka-Manyá *et al.*, 2011; Martin, 2003; Sciandra *et al.*, 2015) y en el cerebro (Prados *et al.*, 2007).

En este trabajo se ha estudiado la retina del ratón *Pomt1* KOc mediante técnicas de microscopía óptica utilizando las tinciones con hematoxilina-eosina y DAPI para los análisis morfométricos, y la técnica microscopía confocal de inmunofluorescencia para el estudio morfológico y estructural de este tejido. En el análisis histológico se apreció una cierta desorganización de las capas celulares de la retina, específicamente, un adelgazamiento en el espesor de la CNE y la CPE en los ratones *Pomt1* KOc, el cual fue

confirmado estadísticamente mediante el análisis morfométrico de secciones transversales de retina teñidas con el colorante DAPI. Los cambios en el espesor de las capas de la retina han sido reportados anteriormente en diferentes modelos animales de DGPs, tales como el ratón *Pomgnt1* KO (Liu *et al.*, 2006) y el ratón KO espontáneo *Large^{myd}* (Lee *et al.*, 2005), los cuales presentaban una reducción en el número de células ganglionares, y una desorganización y adelgazamiento de las capas nucleares externa e interna y de la CPE. Estos cambios en la citoarquitectura de la retina confirman el daño estructural causado por la inactivación de algunos de los genes implicados en la ruta de O-glicosilación del α -DG sobre la correcta formación de los fotorreceptores y otras estructuras de la retina.

La capa de fotorreceptores de la retina de los ratones *Pomt1* KOc mostró alteraciones en su organización, como son la retracción de los SE y el acortamiento axonal de los fotorreceptores. Un comportamiento similar ha sido descrito por otros autores en la retina de mutantes de *Drosophila* en el gen del DG (*Dg*), donde se observa un acortamiento en las células R (fotorreceptores) que es revertido por la sobreexpresión del gen *Dg* (Zhan *et al.*, 2010). Este comportamiento podría estar relacionado con un papel del DG en la mediación de la migración axonal, como se infiere de los defectos en la orientación axonal descritos en el cerebro de ratones mutantes para *Dag1* o en dos de los genes necesarios para la glicosilación del α -DG: *B3gnt1* e *Ispd43* (Constantin, 2014; Wright *et al.*, 2012). Por tanto, dicho papel parece ser dependiente no sólo del propio α -DG, sino también de su adecuada glicosilación, necesaria para su interacción con Slit, una proteína que participa en la guía axonal de neuronas en el cerebro (Wright *et al.*, 2012). Aunque la expresión del DG no afecta el desarrollo neuronal en sí, podría regular la adhesión axónica de los fotorreceptores y la migración de las neuronas durante la diferenciación celular en la retina, (Shcherbata *et al.*, 2007; Zhan *et al.*, 2010). En este contexto, sería posible especular que la O-manosilación del α -DG mediada por POMT1 en la retina juega un papel importante en la orientación y el crecimiento axonal de los fotorreceptores durante el desarrollo de la retina.

En la primera sinapsis, establecida entre fotorreceptores y células bipolares, los ratones *Pomt1* KOc presentaron un crecimiento anormal de las dendritas de las células bipolares de bastón con invasión de la CNE. Este fenómeno, llamado en inglés

“sprouting”, ha sido descrito en ratones de edad avanzada, poniendo de manifiesto la plasticidad de la retina asociada al envejecimiento normal (Liets *et al.*, 2006), así como en ratones KO para Bassoon (Dick *et al.*, 2003), un componente integral de la cintilla sináptica en los fotorreceptores. Este último modelo animal, además de presentar defectos estructurales en la retina, también mostraba una reducción en la amplitud de la onda b del ERG, y un tiempo implícito prolongado, resultados consistentes con los observados en las pruebas fisiológicas del nuestro modelo *Pomt1* KOc, el cual exhibía ambas deficiencias en los ERGs (Figura 4.2A-C,F), tanto en condiciones escotópicas como en condiciones fotópicas (Rubio-Fernández *et al.*, 2016). Estas alteraciones deben interpretarse como derivadas de un defecto en la transmisión de la información visual entre los fotorreceptores (conos y bastones) y sus neuronas postsinápticas (células bipolares) en el ratón *Pomt1* KOc.

Con el fin de analizar posibles alteraciones en los componentes del DGC en la CPE de los ratones *Pomt1* KOc, se realizaron análisis de microscopia confocal de inmunofluorescencia. La proteína de la matriz extracelular que interacciona con el α -DG en la retina, la pikachurina, se encontró totalmente ausente en los ratones *Pomt1* KOc, de forma similar a lo que ocurre en otros modelos de MDDGs (Hu *et al.*, 2011; Kanagawa *et al.*, 2010) y en el ratón DG KOc (Omori *et al.*, 2012). Por otra parte el componente intracelular del complejo, la distrofina, no mostraba alteración en su distribución en los ratones KOc para *Pomt1*, al igual que en los modelos DG KOc y pikachurina KO (Omori *et al.*, 2012), aunque sí en los mutantes *Pomgnt1* KO (Takahashi *et al.*, 2011) y *Large*^{vis} (Lee *et al.*, 2005). Finalmente, la subunidad transmembrana β -DG estaba ausente en la CPE de nuestros ratones KOc, en concordancia con los modelos KO de distrofina (Daloz *et al.*, 2001; Kameya *et al.*, 1997), DG KOc y pikachurina KO (Omori *et al.*, 2012), aunque en desacuerdo con las observaciones en los ratones *Large*^{myd} y *Pomgnt1* KO (Hu *et al.*, 2010; Kanagawa *et al.*, 2010). Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que la O-manosilación del α -DG es necesaria para la acumulación adecuada de pikachurina en la CPE, y que dicha modificación post-traducciona podría ser más relevante que otras glicosilaciones posteriores del α -DG, para la correcta localización del β -DG en los terminales presinápticos de los fotorreceptores.

En la retina de los ratones *Pomt1* KOc se encontró una alineación anómala de los terminales sinápticos de conos y bastones en la CPE en las secciones de la retina inmunomarcadas con anticuerpos frente a la distrofina, CtBP2 o sinaptofisina, o con PNA. Esta anomalía se asoció con un crecimiento invasivo hacia el interior de la CNE, por parte de las dendritas de células bipolares, de forma concomitante con una retracción de las terminales presinápticas de ambos tipos de fotorreceptores. Observaciones mediante microscopia electrónica realizadas en el grupo del Dr. Pedro de la Villa en la Universidad de Alcalá, han permitido concluir que las dendritas de las células bipolares y horizontales no se encontraban correctamente insertadas dentro de la invaginación característica de la sinapsis en cinta. Además, los complejos sinápticos estaban ausentes en aquellas esférulas de los bastones que se encontraban más alejadas de la CPE (Rubio-Fernández *et al.*, 2016). Estos defectos son más similares a los que presenta el modelo KO de la pikachurina (Sato *et al.*, 2008) que a los encontrados en el modelo KOc del DG, donde las terminaciones dendríticas de las células horizontales se insertan con normalidad en las invaginaciones presinápticas de los fotorreceptores (Omori *et al.*, 2012) y subyacen a las anomalías en la onda b del ERG (amplitud y tiempo implícito) que se observaron en el análisis fisiológico de nuestros ratones *Pomt1* KOc (Figura 4.2).

Aunque en los análisis mediante ERG no se evidenciaron defectos en la segunda sinapsis, ya que los potenciales oscilatorios de ambos animales no presentaron diferencias estadísticamente significativas (datos no mostrados), se realizó un estudio inmunohistoquímico de la retina interna del ratón *Pomt1* KOc. Las neuronas de tercer orden (células amacrinas y ganglionares) y las células de Müller no se encontraron afectadas en la retina de los ratones *Pomt1* KOc. Por el contrario, la inmunorreactividad de GFAP, una proteína expresada constitutivamente en los astrocitos, se vio drásticamente aumentada en la retina de los ratones mutantes, al igual que se ha descrito en un ratón modelo de retinosis pigmentaria (Huttl, 2005) y en los modelos de DGPs, DG KOc y *Pomgnt1* KO (Satz *et al.*, 2009; Takahashi *et al.*, 2011). Es destacable aquí, que la astrogliosis es una respuesta común a procesos neurodegenerativos en los que se presenta pérdida de comunicación entre células, ruptura de la MEC o aumento en la producción de ATP (Langmann, 2007).

En conclusión, la pérdida de función de la primera enzima que actúa en la glicosilación del α -DG, POMT1, impide la correcta formación de los complejos sinápticos en la CPE durante el desarrollo de la retina, como se ha evidenciado en este trabajo. En consecuencia, la transmisión de las señales visuales de conos y bastones a las células bipolares, se ve gravemente afectada, probablemente debido a una pérdida de interacción entre el α -DG y proteínas de la MEC como la pikachurina y la laminina, para lo cual es crucial la correcta *O*-manosilación del α -DG. Estos resultados indican que POMT1 es una *O*-manosiltransferasa de proteínas clave tanto para la formación y mantenimiento como para la función de las sinapsis entre los fotorreceptores y sus células postsinápticas. La inactivación condicional del gen *Pomt1* en los fotorreceptores mimetiza así, en buena parte los síntomas que exhiben los pacientes con WWS y otras MDDGs asociadas al gen *POMT1*.

Parte de los resultados presentados en este capítulo han sido ya enviados para su publicación:

Rubio-Fernández, M.*, Uribe, M.L.*, Vicente-Tejedor, J.*, Germain, F., Susín-Lara, C., Montoliu, L., de la Villa, P., Martín-Nieto, J., Cruces, J. (2016) Impairments of photoreceptor synapses in a *Pomt1* conditional knockout model of dystroglycanopathy. Nat. Neurosci. (enviado para su publicación)

* Igual contribución al artículo.

Conclusiones

- En este trabajo hemos puesto de manifiesto expresión de los genes asociados a distroglicanopatías *POMT1*, *POMT2*, *POMGNT1*, *FKTN* (fukutina) y *FKRP*, tanto a nivel de ARNm como de proteína, en la retina de todas las especies estudiadas, desde roedores hasta primates. Asimismo, hemos detectado expresión de *LARGE* a nivel de ARNm en la retina de dichas especies.
- Las proteínas *POMGnT1* y *FKRP* se localizan en el aparato de Golgi de los fotorreceptores en la retina de ratón, mientras que la fukutina se localiza parcialmente en las mitocondrias.
- El análisis bioinformático de *POMGnT1* y *POMGnT2* revela que estas proteínas presentan dominios estructurales y funcionales muy conservados entre las distintas especies del filo Cordados, presentando presumiblemente cada una de ellas un ancestro común separado.
- La mutación KO condicional del gen *Pomt1* en la retina origina en el ratón alteraciones estructurales y funcionales, tanto en la retina externa (conectividad sináptica entre los fotorreceptores y sus neuronas posinápticas) como en la retina interna (astrogliosis), que mimetizan los síntomas retinianos de pacientes con distroglicanopatías.

Conclusions

- In this work we have shown expression of dystroglycanopathy-associated genes *POMT1*, *POMT2*, *POMGNT1*, *FKTN* (fukutin) and *FKRP*, at both mRNA and protein levels, in the retina of all species studied, from rodents to primates. We have also detected expression of *LARGE* at mRNA level in these species.
- Proteins *POMGnT1* and *FKRP* are located in the Golgi apparatus of photoreceptors in the mouse retina, while fukutin partially locates in the mitochondria.
- Bioinformatic analyses of *POMGnT1* and *POMGnT2* reveal that these proteins exhibit structural and functional domains highly conserved across species of the phylum Chordata, each presumably having a separate, common ancestor.
- A conditional KO mutation of the *Pomt1* gene in the retina causes in the mouse structural and functional alterations in both the outer retina (synaptic connectivity between photoreceptors and their postsynaptic neurons) and the inner retina (astrogliosis), which mimic retinal symptoms exhibited by dystroglycanopathy patients.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbott, K.L., Matthews, R.T., Pierce, M., 2008. Receptor tyrosine phosphatase β (RPTP β) activity and signaling are attenuated by glycosylation and subsequent cell surface galectin-1 binding. *J. Biol. Chem.* 283, 33026–35. doi:10.1074/jbc.M803646200
- Ackroyd, M.R., Skordis, L., Kaluarachchi, M., Godwin, J., Prior, S., Fidanboyly, M., Piercy, R.J., Muntoni, F., Brown, S.C., 2009. Reduced expression of fukutin related protein in mice results in a model for fukutin related protein associated muscular dystrophies. *Brain* 132, 439–451. doi:10.1093/brain/awn335
- Akasaka-Manyá, K., Manyá, H., Nakajima, A., Kawakita, M., Endo, T., 2006. Physical and functional association of human protein O-mannosyltransferases 1 and 2. *J. Biol. Chem.* 281, 19339–19345. doi:10.1074/jbc.M601091200
- Akasaka-Manyá, K., Manyá, H., Kobayashi, K., Toda, T., Endo, T., 2004. Structure-function analysis of human protein O-linked mannanose β 1,2-N-acetylglucosaminyltransferase 1, POMGnT1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 320, 39–44. doi:10.1016/j.bbrc.2004.05.129
- Akasaka-Manyá, K., Manyá, H., Hayashi, M., Endo, T., 2011. Different roles of the two components of human protein O-mannosyltransferase, POMT1 and POMT2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 411, 721–725. doi:10.1016/j.bbrc.2011.07.012
- Alhamidi, M., Kjeldsen Buvang, E., Fagerheim, T., Brox, V., Lindal, S., van Ghelue, M., Nilssen, Ø., 2011. Fukutin-related protein resides in the Golgi cisternae of skeletal muscle fibres and forms disulfide-linked homodimers via an N-terminal interaction. *PLoS One* 6. doi:10.1371/journal.pone.0022968
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J., 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403–10. doi:10.1016/S0022-2836(05)80360-2
- Anderson, C., Winder, S.J., Borycki, A.-G., 2007. Dystroglycan protein distribution coincides with basement membranes and muscle differentiation during mouse embryogenesis. *Dev. Dyn.* 236, 2627–2635. doi:10.1002/dvdy.21259
- Apweiler, R., Hermjakob, H., Sharon, N., 1999. On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database. *Biochim. Biophys. Acta* 1473, 4–8.
- Athanasiou, D., Aguilà, M., Bevilacqua, D., Novoselov, S.S., Parfitt, D.A., Cheetham, M.E., 2013. The cell stress machinery and retinal degeneration. *FEBS Lett.* 587, 2008–17. doi:10.1016/j.febslet.2013.05.020
- Biasini, M., Bienert, S., Waterhouse, A., Arnold, K., Studer, G., Schmidt, T., Kiefer, F.,

- Gallo Cassarino, T., Bertoni, M., Bordoli, L., Schwede, T., 2014. SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. *Nucleic Acids Res.* 42, W252–8. doi:10.1093/nar/gku340
- Barresi, R., Campbell, K.P., 2006. Dystroglycan: from biosynthesis to pathogenesis of human disease. *J. Cell Sci.* 119, 199–207. doi:10.1242/jcs.02814
- Beedle, A.M., Nienaber, P.M., Campbell, K.P., 2007. Fukutin-related protein associates with the sarcolemmal dystrophin-glycoprotein complex. *J. Biol. Chem.* 282, 16713–16717. doi:10.1074/jbc.C700061200
- Bello, L., Melacini, P., Pezzani, R., D’Amico, A., Piva, L., Leonardi, E., Torella, A., Soraru, G., Palmieri, A., Smaniotto, G., Gavassini, B.F., Vianello, A., Nigro, V., Bertini, E., Angelini, C., Tosatto, S.C.E., Pegoraro, E., 2012. Cardiomyopathy in patients with POMT1-related congenital and limb-girdle muscular dystrophy. *Eur. J. Hum. Genet.* 20, 1234–9. doi:10.1038/ejhg.2012.71
- Bello, V., Moreau, N., Sirour, C., Hidalgo, M., Buisson, N., Darribère, T., 2015. The dystroglycan: Nestled in an adhesome during embryonic development. *Dev. Biol.* 401, 132–142. doi:10.1016/j.ydbio.2014.07.006
- Beltrán-Valero de Bernabé, D., 2004. Mutations in the FKRP gene can cause muscle-eye-brain disease and Walker-Warburg syndrome. *J. Med. Genet.* 41, e61–e61. doi:10.1136/jmg.2003.013870
- Beltrán-Valero de Bernabé, D., 2003. A homozygous nonsense mutation in the Fukutin gene causes a Walker-Warburg syndrome phenotype. *J. Med. Genet.* 40, 845–848. doi:10.1136/jmg.40.11.845
- Beltrán-Valero de Bernabé, D., Currier, S., Steinbrecher, A., Celli, J., van Beusekom, E., van der Zwaag, B., Kayserili, H., Merlini, L., Chitayat, D., Dobyns, W.B., Cormand, B., Lehesjoki, A.-E., Cruces, J., Voit, T., Walsh, C.A., van Bokhoven, H., Brunner, H.G., 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. doi:10.1086/342975
- Berridge, M.J., 1998. Neuronal calcium signaling. *Neuron* 21, 13–26.
- Bertini, E., D’Amico, A., Gualandi, F., Petrini, S., 2011. Congenital muscular dystrophies: a brief review. *Semin. Pediatr. Neurol.* 18, 277–88. doi:10.1016/j.spen.2011.10.010
- Bleckmann, C., Geyer, H., Lieberoth, A., Splittstoesser, F., Liu, Y., Feizi, T., Schachner, M., Kleene, R., Reinhold, V., Geyer, R., 2009. O-glycosylation pattern of CD24 from mouse brain. *Biol. Chem.* 390, 627–45. doi:10.1515/BC.2009.044
- Breloy, I., Pacharra, S., Aust, C., Hanisch, F.G., 2012. A sensitive gel-based global O-glycomics approach reveals high levels of mannosyl glycans in the high mass region of the mouse brain proteome. *Biol. Chem.* 393, 709–717. doi:10.1515/hsz-2012-0214
- Booler, H.S., Williams, J.L., Hopkinson, M., Brown, S.C., 2015. Degree of Cajal-Retzius Cell Mislocalization Correlates with the Severity of Structural Brain Defects in Mouse Models of Dystroglycanopathy. *Brain Pathol.* 1–14. doi:10.1111/bpa.12306

- Bouchet, C., Gonzales, M., Vuillaumier-Barrot, S., Devisme, L., Lebizec, C., Alanio, E., Bazin, A., Bessières-Grattagliano, B., Bigi, N., Blanchet, P., Bonneau, D., Bonnières, 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-Nehmé, F., Perez, M.J., Rouleau-Dubois, C., Triau, S., Laquerrière, A., Encha-Razavi, F., Seta, N., 2007. Molecular heterogeneity in fetal forms of type II lissencephaly. *Hum. Mutat.* 28, 1020–7. doi:10.1002/humu.20561
- Bouchet-Séraphin, C., Vuillaumier-Barrot, S., Seta, N., 2015. Dystroglycanopathies: About Numerous Genes Involved in Glycosylation of One Single Glycoprotein. *J. Neuromuscul. Dis.* 2, 27–38. doi:10.3233/JND-140047
- Bozzi, M., Morlacchi, S., Bigotti, M.G., Sciandra, F., Brancaccio, A., 2009. Functional diversity of dystroglycan. *Matrix Biol.* 28, 179–187. doi:10.1016/j.matbio.2009.03.003
- Brockington, M., Torelli, S., Prandini, P., Boito, C., Dolatshad, N.F., Longman, C., Brown, S.C., Muntoni, F., 2005. Localization and functional analysis of the LARGE family of glycosyltransferases: significance for muscular dystrophy. *Hum. Mol. Genet.* 14, 657–65. doi:10.1093/hmg/ddi062
- Brockington, M., Yuva, Y., Prandini, P., Brown, S.C., Torelli, S., Benson, M.A., Herrmann, R., Anderson, L. V., Bashir, R., Burgunder, J.M., Fallet, S., Romero, N., Fardeau, M., Straub, V., Storey, G., Pollitt, C., Richard, I., Sewry, C.A., Bushby, K., Voit, T., Blake, D.J., Muntoni, F., 2001. 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.
- Campbell, C.T., Yarema, K.J., 2005. Large-scale approaches for glycobiology. *Genome Biol.* 6, 236. doi:10.1186/gb-2005-6-11-236
- Campello, L., Esteve-Rudd, J., Bru-Martínez, R., Herrero, M.T., Fernández-Villalba, E., Cuenca, N., Martín-Nieto, J., 2013. Alterations in Energy Metabolism, Neuroprotection and Visual Signal Transduction in the Retina of Parkinsonian, MPTP-Treated Monkeys. *PLoS One* 8, 1–18. doi:10.1371/journal.pone.0074439
- Chader, G.J., Taylor, A., 2013. The aging eye: normal changes, age-related diseases, and sight-saving approaches. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 54, 2–5. doi:10.1167/iovs.13-12993
- Chai, W., Yuen, C.-T., Kogelberg, H., Carruthers, R.A., Margolis, R.U., Feizi, T., Lawson, A.M., 1999. High prevalence of 2-mono- and 2,6-di-substituted Manol-terminating sequences among O-glycans released from brain glycopeptides by reductive alkaline hydrolysis. *Eur. J. Biochem.* 263, 879–888. doi:10.1046/j.1432-1327.1999.00572.x
- 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. doi:10.1074/jbc.272.4.2156
- Clement, E., Mercuri, E., Godfrey, C., Smith, J., Robb, S., Kinali, M., Straub, V., Bushby, K., Manzur, A., Talim, B., Cowan, F., Quinlivan, R., Klein, A., Longman, C., McWilliam, R., Topaloglu, H., Mein, R., Abbs, S., North, K., Barkovich, A.J., Rutherford, M., Muntoni, F., 2008. Brain involvement in muscular dystrophies with defective dystroglycan glycosylation. *Ann. Neurol.* 64, 573–582. doi:10.1002/ana.21482
- Cohn, R.D., Henry, M.D., Michele, D.E., Barresi, R., Saito, F., Moore, S.A., Flanagan, J.D., Skwarchuk, M.W., Robbins, M.E., Mendell, J.R., Williamson, R.A., Campbell, K.P., 2002. Disruption of *Dag1* in differentiated skeletal muscle reveals a role for dystroglycan in muscle regeneration. *Cell* 110, 639–648. doi:10.1016/S0092-8674(02)00907-8
- Constantin, B., 2014. Dystrophin complex functions as a scaffold for signalling proteins. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1838, 635–642. doi:10.1016/j.bbamem.2013.08.023
- Corfield, A.P., Berry, M., 2015. Glycan variation and evolution in the eukaryotes. *Trends Biochem. Sci.* 40, 351–359. doi:10.1016/j.tibs.2015.04.004
- Cormand, B., Pihko, H., Bayés, M., Valanne, L., Santavuori, P., Talim, B., Gershoni-Baruch, R., Ahmad, A., van Bokhoven, H., Brunner, H.G., Voit, T., Topaloglu, H., Dobyns, W.B., Lehesjoki, A.E., 2001. Clinical and genetic distinction between Walker-Warburg syndrome and muscle-eye-brain disease. *Neurology* 56, 1059–1069. doi:10.1212/WNL.56.8.1059
- Cotarelo, R.P., Valero, M.C., Prados, B., Peña, A., Rodríguez, L., Fano, O., Marco, J.J., Martínez-Frías, M.L., 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, 139–145. doi:10.1111/j.1399-0004.2007.00936.x
- Cuenca, N., Fernández-Sánchez, L., Campello, L., Maneu, V., De la Villa, P., Lax, P., Pinilla, I., 2014. Cellular responses following retinal injuries and therapeutic approaches for neurodegenerative diseases. *Prog. Retin. Eye Res.* 43, 17–75. doi:10.1016/j.preteyeres.2014.07.001
- Currier, S.C., Lee, C.K., Chang, B.S., Bodell, A.L., Pai, G.S., Job, L., Lagae, L.G., Al-Gazali, L.I., Eyaid, W.M., Enns, G., Dobyns, W.B., Walsh, C.A., 2005. Mutations in *POMT1* are found in a minority of patients with Walker-Warburg syndrome. *Am. J. Med. Genet. A* 133A, 53–7. doi:10.1002/ajmg.a.30487
- Dalloz, C., Claudepierre, T., Rodius, F., Mornet, D., Sahel, J., Rendon, A., 2001. Differential distribution of the members of the dystrophin glycoprotein complex in mouse retina: effect of the *mdx(3Cv)* mutation. *Mol. Cell. Neurosci.* 17, 908–920. doi:10.1006/mcne.2001.0978
- Dick, O., tom Dieck, S., Altmann, W.D., Ammermüller, J., Weiler, R., Garner, C.C., Gundelfinger, E.D., Brandstätter, J.H., 2003. The presynaptic active zone protein bassoon is essential for photoreceptor ribbon synapse formation in the retina. *Neuron* 37, 775–86.

- Dobson, C.M., Hempel, S.J., Stalnaker, S.H., Stuart, R., Wells, L., 2013. O-Mannosylation and human disease. *Cell. Mol. Life Sci.* 70, 2849–2857. doi:10.1007/s00018-012-1193-0
- Dolatshad, N.F., Brockington, M., Torelli, S., Skordis, L., Wever, U., Wells, D.J., Muntoni, F., Brown, S.C., 2005. Mutated fukutin-related protein (FKRP) localises as wild type in differentiated muscle cells. *Exp. Cell Res.* 309, 370–8. doi:10.1016/j.yexcr.2005.06.017
- Dowling, J.E., 1987. *The retina: an approachable part of the brain.* Harvard University Press.
- Drenckhahn, D., Holbach, M., Ness, W., Schmitz, F., Anderson, L.V.B., 1996. Dystrophin and the dystrophin-associated glycoprotein, β -dystroglycan, co-localize in photoreceptor synaptic complexes of the human retina. *Neuroscience* 73, 605–612. doi:10.1016/0306-4522(96)00069-3
- Durbeej, M., Henry, M.D., Ferletta, M., Campbell, K.P., Ekblom, P., 1998. Distribution of dystroglycan in normal adult mouse tissues. *J. Histochem. Cytochem.* 46, 449–57.
- Dwyer, C.A., Baker, E., Hu, H., Matthews, R.T., 2012. RPTP ζ /phosphacan is abnormally glycosylated in a model of muscle-eye-brain disease lacking functional POMGnT1. *Neuroscience* 220, 47–61. doi:10.1016/j.neuroscience.2012.06.026
- Endo, T., 2015. Glycobiology of α -dystroglycan and muscular dystrophy. *J. Biochem.* 157, 1–12. doi:10.1093/jb/mvu066
- Endo, Y., Dong, M., Noguchi, S., Ogawa, M., Hayashi, Y.K., Kuru, S., Sugiyama, K., Nagai, S., Ozasa, S., Nonaka, I., Nishino, I., 2015. Milder forms of muscular dystrophy associated with POMGNT2 mutations. *Neurol. Genet.* 1, e33. doi:10.1212/NXG.0000000000000033
- Ervasti, J.M., Campbell, K.P., 1993. A role for the dystrophin-glycoprotein complex as a transmembrane linker between laminin and actin. *J. Cell Biol.* 122, 809–823. doi:10.1083/jcb.122.4.809
- Ervasti, J.M., Campbell, K.P., 1991. Membrane organization of the dystrophin-glycoprotein complex. *Cell* 66, 1121–1131. doi:10.1016/0092-8674(91)90035-W
- Esapa, C.T., Benson, M.A., Schröder, J.E., Martin-Rendon, E., Brockington, M., Brown, S.C., Muntoni, F., Kröger, S., Blake, D.J., 2002. Functional requirements for fukutin-related protein in the Golgi apparatus. *Hum. Mol. Genet.* 11, 3319–31. doi:10.1093/hmg/11.26.3319
- Esteve-Rudd, J., Campello, L., Herrero, M.T., Cuenca, N., Martín-Nieto, J., 2010. Expression in the mammalian retina of parkin and UCH-L1, two components of the ubiquitin-proteasome system. *Brain Res.* 1352, 70–82. doi:10.1016/j.brainres.2010.07.019
- Esteve-Rudd, J., Fernández-Sánchez, L., Lax, P., De Juan, E., Martín-Nieto, J., Cuenca, N., 2011. Rotenone induces degeneration of photoreceptors and impairs the dopaminergic system in the rat retina. *Neurobiol. Dis.* 44, 102–115. doi:10.1016/j.nbd.2011.06.009

- Felsenstein, J., 1985. Confidence Limits on Phylogenies: An Approach Using the Bootstrap. *Evolution* (N. Y). 39, 783. doi:10.2307/2408678
- Finne, J., Krusius, T., Margolis, R.K., Margolis, R.U., 1979. Novel mannitol-containing oligosaccharides obtained by mild alkaline borohydride treatment of a chondroitin sulfate proteoglycan from brain. *J. Biol. Chem.* 254, 10295–300.
- Freeze, H.H., Eklund, E.A., Ng, B.G., Patterson, M.C., 2015. Neurological Aspects of Human Glycosylation Disorders. *Annu. Rev. Neurosci.* 38, 105–125. doi:10.1146/annurev-neuro-071714-034019
- Freeze, H.H., Eklund, E.A., Ng, B.G., Patterson, M.C., 2012. Neurology of inherited glycosylation disorders. *Lancet Neurol.* 11, 453–466. doi:10.1016/S1474-4422(12)70040-6
- Furukawa, A., Koike, C., Lippincott, P., Cepko, C.L., Furukawa, T., 2002. The mouse Crx 5'-upstream transgene sequence directs cell-specific and developmentally regulated expression in retinal photoreceptor cells. *J. Neurosci.* 22, 1640–7.
- Geis, T., Schirmer, S., Walter, M., Rödl, T., Albrecht, B., Schara, U., Hehr, U., Kölbl, H., 2016. Massive Parallel Sequencing with a Multigene Panel (MGPS): Experiences with α -Dystroglycanopathies. *Neuropediatrics* 47. doi:10.1055/s-0036-1583725
- Goddeeris, M.M., Wu, B., Venzke, D., Yoshida-Moriguchi, T., Saito, F., Matsumura, K., Moore, S. a, Campbell, K.P., 2013. LARGE glycans on dystroglycan function as a tunable matrix scaffold to prevent dystrophy. *Nature* 503, 136–40. doi:10.1038/nature12605
- 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, A.Y., Kinali, M., Torelli, S., Brown, S.C., Sewry, C.A., Bushby, K., Topaloglu, H., North, K., Abbs, S., Muntoni, F., 2007. Refining genotype phenotype correlations in muscular dystrophies with defective glycosylation of dystroglycan. *Brain* 130, 2725–35. doi:10.1093/brain/awm212
- Godfrey, C., Foley, A.R., Clement, E., Muntoni, F., 2011. Dystroglycanopathies: coming into focus. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 21, 278–285. doi:10.1016/j.gde.2011.02.001
- Grewal, P.K., McLaughlan, J.M., Moore, C.J., Browning, C.A., Hewitt, J.E., 2005. Characterization of the LARGE family of putative glycosyltransferases associated with dystroglycanopathies. *Glycobiology* 15, 912–23. doi:10.1093/glycob/cwi094
- Haenggi, T., Fritschy, J.-M., 2006. Role of dystrophin and utrophin for assembly and function of the dystrophin glycoprotein complex in non-muscle tissue. *Cell. Mol. Life Sci.* 63, 1614–31. doi:10.1007/s00018-005-5461-0
- Hehr, U., Uyanik, G., Gross, C., Walter, M.C., Bohring, A., Cohen, M., Oehl-Jaschkowitz, B., Bird, L.M., Shamdeen, G.M., Bogdahn, U., Schuierer, G., Topaloglu, H., Aigner, L., Lochmüller, H., Winkler, J., 2007. Novel POMGnT1 mutations define broader phenotypic spectrum of muscle-eye-brain disease. *Neurogenetics* 8, 279–288. doi:10.1007/s10048-007-0096-y
- Hewitt, J.E., 2009. Abnormal glycosylation of dystroglycan in human genetic disease.

- Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis. 1792, 853–861.
doi:10.1016/j.bbadis.2009.06.003
- Hino, N., Kobayashi, M., Shibata, N., Yamamoto, T., Saito, K., Osawa, M., 2001. Clinicopathological study on eyes from cases of Fukuyama type congenital muscular dystrophy. *Brain Dev.* 23, 97–107.
- Hiroi, A., Yamamoto, T., Shibata, N., Osawa, M., Kobayashi, M., 2011. Roles of fukutin, the gene responsible for fukuyama-type congenital muscular dystrophy, in neurons: possible involvement in synaptic function and neuronal migration. *Acta Histochem. Cytochem.* 44, 91–101. doi:10.1267/ahc.10045
- Holzfeind, P.J., Grewal, P.K., Reitsamer, H.A., Kechvar, J., Lassmann, H., Hoeger, H., Hewitt, J.E., Bittner, R.E., 2002. Skeletal, cardiac and tongue muscle pathology, defective retinal transmission, and neuronal migration defects in the Large(myd) mouse defines a natural model for glycosylation-deficient muscle - eye - brain disorders. *Hum. Mol. Genet.* 11, 2673–87.
- Hu, H., Candiello, J., Zhang, P., Ball, S.L., Cameron, D. a, Halfter, W., 2010. Retinal ectopias and mechanically weakened basement membrane in a mouse model of muscle-eye-brain (MEB) disease congenital muscular dystrophy. *Mol. Vis.* 16, 1415–28.
- Hu, H., Li, J., Zhang, Z., Yu, M., 2011. Pikachurin interaction with dystroglycan is diminished by defective O-mannosyl glycosylation in congenital muscular dystrophy models and rescued by LARGE overexpression. *Neurosci. Lett.* 489, 10–5. doi:10.1016/j.neulet.2010.11.056
- Hu, H., Yang, Y., Eade, A., Xiong, Y., Qi, Y., 2007. Breaches of the pial basement membrane and disappearance of the glia limitans during development underlie the cortical lamination defect in the mouse model of muscle-eye-brain disease. *J. Comp. Neurol.* 502, 168–83. doi:DOI 10.1002/cne
- Huttl, S., 2005. Impaired Channel Targeting and Retinal Degeneration in Mice Lacking the Cyclic Nucleotide-Gated Channel Subunit CNGB1. *J. Neurosci.* 25, 130–138. doi:10.1523/JNEUROSCI.3764-04.2005
- Ibraghimov-Beskrovnaya, O., Ervasti, J.M., Leveille, C.J., Slaughter, C.A., Sernett, S.W., Campbell, K.P., 1992. Primary structure of dystrophin-associated glycoproteins linking dystrophin to the extracellular matrix. *Nature* 355, 696–702. doi:10.1038/355696a0
- Ibraghimov-Beskrovnaya, O., Milatovich, A., Ozcelik, T., Yang, B., Koepnick, K., Francke, U., Campbell, K.P., 1993. Human dystroglycan: skeletal muscle cDNA, genomic structure, origin of tissue specific isoforms and chromosomal localization. *Hum. Mol. Genet.* 2, 1651–7.
- Inamori, K., Endo, T., Gu, J., Matsuo, I., Ito, Y., Fujii, S., Iwasaki, H., Narimatsu, H., Miyoshi, E., Honke, K., Taniguchi, N., 2004. N -Acetylglucosaminyltransferase IX Acts on the GlcNAc β 1,2-Man α 1-Ser/Thr Moiety, Forming a 2,6-Branched Structure in Brain O -Mannosyl Glycan. *J. Biol. Chem.* 279, 2337–2340.

doi:10.1074/jbc.C300480200

- Inamori, K., Yoshida-Moriguchi, T., Hara, Y., Anderson, M.E., Yu, L., Campbell, K.P., 2012. Dystroglycan function requires xylosyl- and glucuronyltransferase activities of LARGE. *Science* 335, 93–6. doi:10.1126/science.1214115
- Jiao, H., Many, H., Wang, S., Zhang, Y., Li, X., Xiao, J., Yang, Y., Kobayashi, K., Toda, T., Endo, T., Wu, X., Xiong, H., 2013. Novel POMGnT1 mutations cause muscle-eye-brain disease in Chinese patients. *Mol. Genet. Genomics* 288, 297–308. doi:10.1007/s00438-013-0749-5
- Jimenez-Mallebrera, C., Torelli, S., Feng, L., Kim, J., Godfrey, C., Clement, E., Mein, R., Abbs, S., Brown, S.C., Campbell, K.P., Kröger, S., Talim, B., Topaloglu, H., Quinlivan, R., Roper, H., Childs, A.M., Kinali, M., Sewry, C.A., Muntoni, F., 2009. A comparative study of alpha-dystroglycan glycosylation in dystroglycanopathies suggests that the hypoglycosylation of alpha-dystroglycan does not consistently correlate with clinical severity. *Brain Pathol.* 19, 596–611. doi:10.1111/j.1750-3639.2008.00198.x
- Johansen, P.G., Marshall, R.D., Neuberger, A., 1961. Carbohydrates in protein. 3. The preparation and some of the properties of a glycopeptide from hen's-egg albumin. *Biochem. J.* 78, 518–527. doi:10.1042/bj0780518
- Johnson, J.E., Perkins, G.A., Giddabasappa, A., Chaney, S., Xiao, W., White, A.D., Brown, J.M., Waggoner, J., Ellisman, M.H., Fox, D.A., 2007. Spatiotemporal regulation of ATP and Ca²⁺ dynamics in vertebrate rod and cone ribbon synapses. *Mol. Vis.* 13, 887–919. doi:v13/a97 [pii]
- Jörundsson, E., Lumsden, J.H., Jacobs, R.M., 1999. Rapid Staining Techniques in Cytopathology: A Review and Comparison of Modified Protocols for Hematoxylin and Eosin, Papanicolaou and Romanowsky Stains. *Vet. Clin. Pathol.* 28, 100–108. doi:10.1111/j.1939-165X.1999.tb01057.x
- Jurado, L.A., 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. doi:10.1006/geno.1999.5819
- Kameya, S., Araki, E., Katsuki, M., Mizota, A., Edachi, E., Nakahara, K., Nonaka, I., Sakuragi, S., Takeda, S., Nabeshima, Y., 1997. Dp260 disrupted mice revealed prolonged implicit time of the b-wave in ERG and loss of accumulation of beta-dystroglycan in the outer plexiform layer of the retina. *Hum. Mol. Genet.* 6, 2195–2203. doi:10.1093/hmg/6.13.2195
- Kanagawa, M., Kobayashi, K., Tajiri, M., Many, H., Kuga, A., Yamaguchi, Y., Akasaka-Many, K., Furukawa, J.-I., Mizuno, M., Kawakami, H., Shinohara, Y., Wada, Y., Endo, T., Toda, T., 2016. Identification of a Post-translational Modification with Ribitol-Phosphate and Its Defect in Muscular Dystrophy. *Cell Rep.* 14, 2209–23. doi:10.1016/j.celrep.2016.02.017
- Kanagawa, M., Nishimoto, A., Chiyonobu, T., Takeda, S., Miyagoe-Suzuki, Y., Wang, F., Fujikake, N., Taniguchi, M., Lu, Z., Tachikawa, M., Nagai, Y., Tashiro, F., Miyazaki, J.-

- I., Tajima, Y., Takeda, S., Endo, T., Kobayashi, K., Campbell, K.P., Toda, T., 2009. Residual laminin-binding activity and enhanced dystroglycan glycosylation by LARGE in novel model mice to dystroglycanopathy. *Hum. Mol. Genet.* 18, 621–31. doi:10.1093/hmg/ddn387
- Kanagawa, M., Omori, Y., Sato, S., Kobayashi, K., Miyagoe-Suzuki, Y., Takeda, S., Endo, T., Furukawa, T., Toda, T., 2010. Post-translational maturation of dystroglycan is necessary for pikachurin binding and ribbon synaptic localization. *J. Biol. Chem.* 285, 31208–31216. doi:10.1074/jbc.M110.116343
- Kanekiyo, K., Inamori, K., Kitazume, S., Sato, K., Maeda, J., Higuchi, M., Kizuka, Y., Korekane, H., Matsuo, I., Honke, K., Taniguchi, N., 2013. Loss of branched O-mannosyl glycans in astrocytes accelerates remyelination. *J. Neurosci.* 33, 10037–47. doi:10.1523/JNEUROSCI.3137-12.2013
- Keramaris-Vrantsis, E., Lu, P.J., Doran, T., Zillmer, A., Ashar, J., Esapa, C.T., Benson, M.A., Blake, D.J., Rosenfeld, J., Lu, Q.L., 2007. Fukutin-related protein localizes to the golgi apparatus and mutations lead to mislocalization in muscle in vivo. *Muscle and Nerve* 36, 455–465. doi:10.1002/mus.20833
- Kim, D.S., Hayashi, Y.K., Matsumoto, H., Ogawa, M., Noguchi, S., Murakami, N., Sakuta, R., Mochizuki, M., Michele, D.E., Campbell, K.P., Nonaka, I., Nishino, I., 2004. POMT1 mutation results in defective glycosylation and loss of laminin-binding activity in alpha-DG. *Neurology* 62, 1009–1011. doi:10.1212/01.WNL.0000115386.28769.65
- Kobayashi, K., Nakahori, Y., Miyake, M., Matsumura, K., Kondo-Iida, E., Nomura, Y., Segawa, M., Yoshioka, M., Saito, K., Osawa, M., Hamano, K., Sakakihara, Y., Nonaka, I., Nakagome, Y., Kanazawa, I., Nakamura, Y., Tokunaga, K., Toda, T., 1998. An ancient retrotransposal insertion causes Fukuyama-type congenital muscular dystrophy. *Nature* 394, 388–92. doi:10.1038/28653
- 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, 192–196. doi:10.1016/S0014-5793(01)02088-9
- Kolb, H., Nelson, R., Fernandez, E., Jones, B.W., 2016. Webvision. The Organization of the Retina and Visual System [WWW Document]. URL <http://webvision.med.utah.edu/>
- Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K., 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol. Biol. Evol.* doi:10.1093/molbev/msw054
- Lan, J., Guo, P., Lin, Y., Mao, Q., Guo, L., Ge, J., Li, X., Jiang, J., Lin, X., Qiu, Y., 2015. Role of glycosyltransferase PomGnT1 in glioblastoma progression. *Neuro. Oncol.* 17, 211–222. doi:10.1093/neuonc/nou151
- Lee, J., Lee, B.L., Lee, M., Kim, J.H., Kim, J.-W., Ki, C.-S., 2009. Clinical and genetic analysis of a Korean patient with Fukuyama congenital muscular dystrophy. *J.*

- Neurol. Sci. 281, 122–4. doi:10.1016/j.jns.2009.02.373
- Lee, Y., Kameya, S., Cox, G.A., Hsu, J., Hicks, W., Maddatu, T.P., Smith, R.S., Naggert, J.K., Peachey, N.S., Nishina, P.M., 2005. Ocular abnormalities in *Largemyd* and *Largevls* mice, spontaneous models for muscle, eye, and brain diseases. *Mol. Cell. Neurosci.* 30, 160–172. doi:10.1016/j.mcn.2005.07.009
- Li, W., Cowley, A., Uludag, M., Gur, T., McWilliam, H., Squizzato, S., Park, Y.M., Buso, N., Lopez, R., 2015. The EMBL-EBI bioinformatics web and programmatic tools framework. *Nucleic Acids Res.* 43, W580–4. doi:10.1093/nar/gkv279
- Langmann, T., 2007. Microglia activation in retinal degeneration. *J. Leukoc. Biol.* 81, 1345–1351. doi:10.1189/jlb.0207114
- Liets, L.C., Eliasieh, K., van der List, D.A., Chalupa, L.M., 2006. Dendrites of rod bipolar cells sprout in normal aging retina. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 12156–12160. doi:10.1073/pnas.0605211103
- Liu, J., Ball, S.L., Yang, Y., Mei, P., Zhang, L., Shi, H., Kaminski, H.J., Lemmon, V.P., Hu, H., 2006. A genetic model for muscle-eye-brain disease in mice lacking protein O-mannose 1,2-N-acetylglucosaminyltransferase (POMGnT1). *Mech. Dev.* 123, 228–240. doi:10.1016/j.mod.2005.12.003
- Lommel, M., Cirak, S., Willer, T., 2010. Correlation of enzyme activity and clinical phenotype in Correlation of enzyme activity and clinical phenotype in POMT1-associated dystroglycanopathies. doi:10.1212/WNL.0b013e3181c919d6
- Lommel, M., Strahl, S., 2009. Protein O-mannosylation: Conserved from bacteria to humans. *Glycobiology* 19, 816–828. doi:10.1093/glycob/cwp066
- Lommel, M., Willer, T., Strahl, S., 2008. POMT2, a key enzyme in Walker-Warburg syndrome: Somatic sPOMT2, but not testis-specific tPOMT2, is crucial for mannosyltransferase activity in vivo. *Glycobiology* 18, 615–625. doi:10.1093/glycob/cwn042
- Lommel, M., Winterhalter, P.R., Willer, T., Dahlhoff, M., Schneider, M.R., Bartels, M.F., Renner-Müller, I., Ruppert, T., Wolf, E., Strahl, S., 2013. Protein O-mannosylation is crucial for E-cadherin-mediated cell adhesion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 21024–9. doi:10.1073/pnas.1316753110
- Longman, C., Brockington, M., Torelli, S., Jimenez-Mallebrera, C., Kennedy, C., Khalil, N., Feng, L., Saran, R.K., Voit, T., Merlini, L., Sewry, C.A., Brown, S.C., 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. doi:10.1093/hmg/ddg307
- Lu, P.J., Zillmer, A., Wu, X., Lochmuller, H., Vachris, J., Blake, D., Chan, Y.M., Lu, Q.L., 2010. Mutations alter secretion of fukutin-related protein. *Biochim. Biophys. Acta* 1802, 253–8. doi:10.1016/j.bbadis.2009.10.016
- Manya, H., Chiba, A., Yoshida, A., Wang, X., Chiba, Y., Jigami, Y., Margolis, R.U., 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. doi:10.1073/pnas.0307228101
- Manzini, M.C., Tambunan, D.E., Hill, R.S., Yu, T.W., Maynard, T.M., Heinzen, E.L., Shianna, K. V., Stevens, C.R., Partlow, J.N., Barry, B.J., Rodriguez, J., Gupta, V.A., Al-Qudah, A.K., Eyaid, W.M., Friedman, J.M., Salih, M.A., Clark, R., Moroni, I., Mora, M., Beggs, A.H., Gabriel, S.B., Walsh, C.A., 2012. Exome sequencing and functional validation in zebrafish identify GTDC2 mutations as a cause of walker-warburg syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* 91, 541–547. doi:10.1016/j.ajhg.2012.07.009
- Martin, L.T., Glass, M., Dosunmu, E., Martin, P.T., 2007. Altered expression of natively glycosylated α dystroglycan in pediatric solid tumors. *Hum. Pathol.* 38, 1657–1668. doi:10.1016/j.humpath.2007.03.025
- Martin, P.T., 2003. Dystroglycan glycosylation and its role in matrix binding in skeletal muscle. *Glycobiology* 13, 55R–66R. doi:10.1093/glycob/cwg076
- Martínez-Navarrete, G.C., Martín-Nieto, J., Esteve-Rudd, J., Angulo, A., Cuenca, N., 2007. Alpha synuclein gene expression profile in the retina of vertebrates. *Mol. Vis.* 13, 949–61. doi:v13/a100 [pii]
- Martinez, T., Pace, D., Brady, L., Gerhart, M., Balland, A., 2007. Characterization of a novel modification on IgG2 light chain. Evidence for the presence of O-linked mannosylation. *J. Chromatogr. A* 1156, 183–7. doi:10.1016/j.chroma.2007.04.050
- Matsumoto, H., Noguchi, S., Sugie, K., Ogawa, M., Murayama, K., Hayashi, Y.K., Nishino, I., 2004. Subcellular localization of fukutin and fukutin-related protein in muscle cells. *J. Biochem.* 135, 709–712. doi:10.1093/jb/mvh086
- Matsumura, K., Chiba, A., Yamada, H., Fukuta-Ohi, H., Fujita, S., Endo, T., Kobata, A., Anderson, L. V., Kanazawa, I., Campbell, K.P., Shimizu, T., 1997. A role of dystroglycan in schwannoma cell adhesion to laminin. *J. Biol. Chem.* 272, 13904–10.
- Mendez, A., Lem, J., Simon, M., Chen, J., 2003. Light-dependent translocation of arrestin in the absence of rhodopsin phosphorylation and transducin signaling. *J. Neurosci.* 23, 3124–9.
- Mercer, A.J., Thoreson, W.B., 2011. The dynamic architecture of photoreceptor ribbon synapses: cytoskeletal, extracellular matrix, and intramembrane proteins. *Vis. Neurosci.* 28, 453–71. doi:10.1017/S0952523811000356
- Mercuri, E., Brockington, M., Straub, V., Quijano-Roy, S., Yuva, Y., Herrmann, R., Brown, S.C., Torelli, S., Dubowitz, V., Blake, D.J., Romero, N.B., Estournet, B., Sewry, C.A., Guicheney, P., Voit, T., Muntoni, F., 2003. Phenotypic spectrum associated with mutations in the fukutin-related protein gene. *Ann. Neurol.* 53, 537–542. doi:10.1002/ana.10559
- Mercuri, E., Messina, S., Bruno, C., Mora, M., Pegoraro, E., Comi, G.P., D’Amico, A., Aiello, C., Biancheri, R., Berardinelli, A., Boffi, P., Cassandrini, D., Laverda, A., Moggio, M., Morandi, L., Moroni, I., Pane, M., Pezzani, R., Pichiecchio, A., Pini, A., Minetti, C., Mongini, T., Mottarelli, E., Ricci, E., Ruggieri, A., Saredi, S., Scuderi, C., Tessa, A., Toscano, A., Tortorella, G., Trevisan, C.P., Uggetti, C., Vasco, G., Santorelli,

- F.M., Bertini, E., 2009. Congenital muscular dystrophies with defective glycosylation of dystroglycan: a population study. *Neurology* 72, 1802–9. doi:10.1212/01.wnl.0000346518.68110.60
- Michele, D.E., Barresi, R., Kanagawa, M., Saito, F., Kelley, R.I., Somer, H., Straub, V., Mathews, K.D., Moore, S.A., Campbell, K.P., 2002. Post-translational disruption of dystroglycan – ligand interactions in congenital muscular dystrophies. *Nature* 418, 417–422. doi:10.1038/nature00892.1.
- Mitsuhashi, S., Kang, P.B., 2012. Update on the genetics of limb girdle muscular dystrophy. *Semin. Pediatr. Neurol.* 19, 211–8. doi:10.1016/j.spen.2012.09.008
- Miyagoe-Suzuki, Y., Masubuchi, N., Miyamoto, K., Wada, M.R., Yuasa, S., Saito, F., Matsumura, K., Kanasaki, H., Kudo, A., Manya, H., Endo, T., Takeda, S., 2009. Reduced proliferative activity of primary POMGnT1-null myoblasts in vitro. *Mech. Dev.* 126, 107–116. doi:10.1016/j.mod.2008.12.001
- Montanaro, F., Carbonetto, S., Campbell, K.P., Lindenbaum, M., 1995. Dystroglycan expression in the wild type and mdx mouse neural retina: Synaptic colocalization with dystrophin, dystrophin-related protein but not laminin. *J. Neurosci. Res.* 42, 528–538. doi:10.1002/jnr.490420411
- Moore, S. a, Saito, F., Chen, J., Michele, D.E., Henry, M.D., Messing, A., Cohn, R.D., Ross-Barta, S.E., Westra, S., Williamson, R. a, Hoshi, T., Campbell, K.P., 2002. Deletion of brain dystroglycan recapitulates aspects of congenital muscular dystrophy. *Nature* 418, 422–425. doi:10.1038/nature00838
- Moremen, K.W., Tiemeyer, M., Nairn, A. V, 2012. Vertebrate protein glycosylation: diversity, synthesis and function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13, 448–462. doi:10.1038/nrm3383
- Moukhes, H., Roque, R., Carbonetto, S., 2000. alpha-dystroglycan isoforms are differentially distributed in adult rat retina. *J. Comp. Neurol.* 420, 182–94. doi:10.1002/(SICI)1096-9861(20000501)420:2<182::AID-CNE3>3.0.CO;2-2
- Muntoni, F., Brockington, M., Godfrey, C., Ackroyd, M., Robb, S., Manzur, A., Kinali, M., Mercuri, E., Kaluarachchi, M., Feng, L., Jimenez-Mallebrera, C., Clement, E., Torelli, S., Sewry, C.A., Brown, S.C., 2007. Muscular dystrophies due to defective glycosylation of dystroglycan. *Acta Myol.* 26, 129–35.
- Muntoni, F., Torelli, S., Wells, D.J., Brown, S.C., 2011. Muscular dystrophies due to glycosylation defects: diagnosis and therapeutic strategies. *Curr. Opin. Neurol.* 24, 437–42. doi:10.1097/WCO.0b013e32834a95e3
- Muntoni, F., Voit, T., 2004. The congenital muscular dystrophies in 2004: A century of exciting progress. *Neuromuscul. Disord.* 14, 635–649. doi:10.1016/j.nmd.2004.06.009
- Nakamura, N., Lyalin, D., Panin, V.M., 2010. Protein O-mannosylation in animal development and physiology: From human disorders to Drosophila phenotypes. *Semin. Cell Dev. Biol.* 21, 622–630. doi:10.1016/j.semcd.2010.03.010
- Nei, M., Kumar, S., 2000. Molecular Evolution and Phylogenetics, *Archives of virology*.

- Nilsson, J., Nilsson, J., Larson, G., Grahn, A., 2010. Characterization of site-specific O-glycan structures within the mucin-like domain of alpha-dystroglycan from human skeletal muscle. *Glycobiology* 20, 1160–9. doi:10.1093/glycob/cwq082
- Ogawa, M., Nakamura, N., Nakayama, Y., Kurosaka, A., Manya, H., Kanagawa, M., Endo, T., Furukawa, K., Okajima, T., 2013. GTDC2 modifies O-mannosylated α -dystroglycan in the endoplasmic reticulum to generate N-acetyl glucosamine epitopes reactive with CTD110.6 antibody. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 440, 88–93. doi:10.1016/j.bbrc.2013.09.022
- Oliveira, J., Soares-Silva, I., Fokkema, I., Gonçalves, A., Cabral, A., Diogo, L., Galán, L., Guimarães, A., Fineza, I., Dunnen, J.T., Santos, R., 2008. Novel synonymous substitution in POMGNT1 promotes exon skipping in a patient with congenital muscular dystrophy. *J. Hum. Genet.* 53, 565–572. doi:10.1007/s10038-008-0263-5
- Omori, Y., Araki, F., Chaya, T., Kajimura, N., Irie, S., Terada, K., Muranishi, Y., Tsujii, T., Ueno, S., Koyasu, T., Tamaki, Y., Kondo, M., Amano, S., Furukawa, T., 2012. Presynaptic Dystroglycan-Pikachurin Complex Regulates the Proper Synaptic Connection between Retinal Photoreceptor and Bipolar Cells. *J. Neurosci.* 32, 6126–6137. doi:10.1523/JNEUROSCI.0322-12.2012
- Oo, H.Z., Sentani, K., Mukai, S., Hattori, T., Shinmei, S., Goto, K., Sakamoto, N., Naito, Y., Anami, K., Trang, P.T.B., Yanagihara, K., Oue, N., Yasui, W., 2016. Fukutin, identified by the Escherichia coli ampicillin secretion trap (CAST) method, participates in tumor progression in gastric cancer. *Gastric Cancer* 19, 443–52. doi:10.1007/s10120-015-0511-2
- Pacharra, S., Hanisch, F.G., Breloy, I., 2012. Neurofascin 186 is O-mannosylated within and outside of the mucin domain. *J. Proteome Res.* 11, 3955–3964. doi:10.1021/pr200996y
- Pacharra, S., Hanisch, F.-G., Mühlhoff, M., Faissner, A., Rauch, U., Breloy, I., 2013. The lecticans of mammalian brain perineural net are O-mannosylated. *J. Proteome Res.* 12, 1764–71. doi:10.1021/pr3011028
- Pereira, N.A., Pu, H.X., Goh, H., Song, Z., 2014. Golgi phosphoprotein 3 mediates the Golgi localization and function of protein O-linked mannose ?? -1,2-N-acetylglucosaminyltransferase 1. *J. Biol. Chem.* 289, 14762–14770. doi:10.1074/jbc.M114.548305
- Peter-Katalinić, J., 2006. Methods in enzymology: O-glycosylation of proteins. *Methods Enzymol.* 405, 139–171. doi:10.1016/S0076-6879(05)05007-X
- Peyrard, M., Seroussi, E., Sandberg-Nordqvist, A.C., Xie, Y.G., Han, F.Y., Fransson, I., Collins, J., Dunham, I., Kost-Alimova, M., Imreh, S., Dumanski, J.P., 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., Peña, A., Cotarelo, R.P., Valero, M.C., 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,

- 1659–1668. doi:10.2353/ajpath.2007.061264
- Praissman, J.L., Live, D.H., Wang, S., Ramiah, A., Chinoy, Z.S., Boons, G., Moremen, K.W., Wells, L., 2014. B4GAT1 is the priming enzyme for the LARGE-dependent functional glycosylation of α -dystroglycan. *Elife* 3, 1–18. doi:10.7554/eLife.03943
- Praissman, J.L., Wells, L., 2014. Mammalian O-mannosylation pathway: Glycan structures, enzymes, and protein Substrates. *Biochemistry* 53, 3066–3078. doi:10.1021/bi500153y
- Praissman, J.L., Willer, T., Sheikh, M.O., Toi, A., Chitayat, D., Lin, Y.-Y., Lee, H., Stalnakker, S.H., Wang, S., Prabhakar, P.K., Nelson, S.F., Stemple, D.L., Moore, S.A., Moremen, K.W., Campbell, K.P., Wells, L., 2016. The functional O-mannose glycan on α -dystroglycan contains a phospho-ribitol primed for matriglycan addition. *Elife* 5. doi:10.7554/eLife.14473
- Raducu, M., Baets, J., Fano, O., Van Coster, R., Cruces, J., 2012. Promoter alteration causes transcriptional repression of the POMGNT1 gene in limb-girdle muscular dystrophy type 2O. *Eur. J. Hum. Genet.* 20, 945–952. doi:10.1038/ejhg.2012.40
- Raducu, M., Cotarelo, R.P., Simón, R., Camacho, A., Rubio-Fernández, M., Hernández-Laín, A., Cruces, J., 2014. Clinical features and molecular characterization of a patient with muscle-eye-brain disease: a novel mutation in the POMGNT1 gene. *J. Child Neurol.* 29, 289–94. doi:10.1177/0883073813509119
- Raitta, C., Lamminen, M., Santavuori, P., Leisti, J., 1978. Ophthalmological findings in a new syndrome with muscle, eye and brain involvement. *Acta Ophthalmol.* 56, 465–72.
- Ramón y Cajal, S., 1892. *The Structure of the Retina*. 1972. Charles C Thomas Publisher., Springfield, IL (EEUU).
- Riemersma, M., Froese, D.S., van Tol, W., Engelke, U.F., Kopec, J., van Scherpenzeel, M., Ashikov, A., Krojer, T., von Delft, F., Tessari, M., Buczkowska, A., Swiezewska, E., Jae, L.T., Brummelkamp, T.R., Manya, H., Endo, T., van Bokhoven, H., Yue, W.W., Lefeber, D.J., 2015. Human ISPD Is a Cytidyltransferase Required for Dystroglycan O-Mannosylation. *Chem. Biol.* 22, 1643–52. doi:10.1016/j.chembiol.2015.10.014
- Rubio-Fernández, M., Uribe, M.L., Vicente-Tejedor, J., Germain, F., Susín-Lara, C., Montoliu, L., de la Villa, P., Martín-Nieto, J., Cruces, J., 2016. Impairments of photoreceptor synapses in a *Pomt1* conditional knockout model of dystroglycanopathy. *Nat. Neurosci.* (enviado para publicación)
- Salamat, M., Miosge, N., Herken, R., 1995. Development of Reichert's membrane in the early mouse embryo. *Anat. Embryol. (Berl)*. 192, 275–81.
- 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.* 101, 1712–1722. doi:10.1111/j.1471-4159.2007.04462.x
- Saito, Y., Mizuguchi, M., Oka, A., Takashima, S., 2000. Fukutin protein is expressed in neurons of the normal developing human brain but is reduced in Fukuyama-type

- congenital muscular dystrophy brain. *Ann. Neurol.* 47, 756–64.
- Saitou, N., Nei, M., 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4, 406–25.
- Sciandra, F., Bigotti, M.G., Giardina, B., Bozzi, M., Brancaccio, A., 2015. Genetic Engineering of Dystroglycan in Animal Models of Muscular Dystrophy. *Biomed Res. Int.* 2015, 635792. doi:10.1155/2015/635792
- Samwald, M., Samwald, M., 2007. Review: Dystroglycan in the Nervous System. *Nat. Preced.* 1–27. doi:10.1038/npre.2007.196.1
- Santavuori, P., Somer, H., Sainio, K., Rapola, J., Kruus, S., Nikitin, T., Ketonen, L., Leisti, J., 1989. Muscle-eye-brain disease (MEB). *Brain Dev.* 11, 147–53.
- Saredi, S., Ardisson, A., Ruggieri, A., Mottarelli, E., Farina, L., Rinaldi, R., Silvestri, E., Gandioli, C., D'Arrigo, S., Salerno, F., Morandi, L., Grammatico, P., Pantaleoni, C., Moroni, I., Mora, M., 2012. Novel POMGNT1 point mutations and intragenic rearrangements associated with muscle-eye-brain disease. *J. Neurol. Sci.* 318, 45–50. doi:10.1016/j.jns.2012.04.008
- 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.
- 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.
- Sato, S., Omori, Y., Katoh, K., Kondo, M., Kanagawa, M., Miyata, K., Funabiki, K., Koyasu, T., Kajimura, N., Miyoshi, T., Sawai, H., Kobayashi, K., Tani, A., Toda, T., Usukura, J., Tano, Y., Fujikado, T., Furukawa, T., 2008. Pikachurin, a dystroglycan ligand, is essential for photoreceptor ribbon synapse formation. *Nat. Neurosci.* 11, 923–931. doi:10.1038/nn.2160
- Satz, J.S., Philp, A.R., Nguyen, H., Kusano, H., Lee, J., Turk, R., Riker, M.J., Hernández, J., Weiss, R.M., Anderson, M.G., Mullins, R.F., Moore, S. a, Stone, E.M., Campbell, K.P., 2009. Visual impairment in the absence of dystroglycan. *J. Neurosci.* 29, 13136–46. doi:10.1523/JNEUROSCI.0474-09.2009
- Shcherbata, H.R., Yatsenko, A.S., Patterson, L., Sood, V.D., Nudel, U., Yaffe, D., Baker, D., Ruohola-Baker, H., 2007. Dissecting muscle and neuronal disorders in a *Drosophila* model of muscular dystrophy. *EMBO J.* 26, 481–493. doi:10.1038/sj.emboj.7601503
- Schedin-Weiss, S., Winblad, B., Tjernberg, L.O., 2014. The role of protein glycosylation in Alzheimer disease. *FEBS J.* 281, 46–62. doi:10.1111/febs.12590
- Schmitz, F., Drenckhahn, D., 1997a. Localization of dystrophin and β -dystroglycan in bovine retinal photoreceptor processes extending into the postsynaptic dendritic complex. *Histochem. Cell Biol.* 108, 249–255. doi:10.1007/s004180050165
- Schmitz, F., Drenckhahn, D., 1997b. Dystrophin in the retina. *Prog. Neurobiol.* 53, 547–560. doi:10.1016/S0301-0082(97)00047-6

- Sgambato, A., Brancaccio, A., 2005. The dystroglycan complex: From biology to cancer. *J. Cell. Physiol.* 205, 163–169. doi:10.1002/jcp.20411
- Shroff, A., 2011. An eye on numbers: A ready reckoner in ophthalmology. Postscript Media Pvt Ltd.
- 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. doi:10.1002/ana.10491
- Smalheiser, N.R., Haslam, S.M., Sutton-Smith, M., Morris, H.R., Dell, A., 1998. Structural analysis of sequences O-linked to mannose reveals a novel Lewis X structure in cranin (dystroglycan) purified from sheep brain. *J. Biol. Chem.* 273, 23698–703.
- Sparks, S., Quijano-Roy, S., Harper, A., Rutkowski, A., Gordon, E., Hoffman, E.P., Pegoraro, E., 1993. Congenital Muscular Dystrophy Overview, GeneReviews®.
- Spiro, R.G., 2002. Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds. *Glycobiology* 12, 43R–56R.
- Stalnaker, S.H., Aoki, K., Lim, J.-M., Porterfield, M., Liu, M., Satz, J.S., Buskirk, S., Xiong, Y., Zhang, P., Campbell, K.P., Hu, H., Live, D., Tiemeyer, M., Wells, L., 2011a. Glycomic analyses of mouse models of congenital muscular dystrophy. *J. Biol. Chem.* 286, 21180–90. doi:10.1074/jbc.M110.203281
- Stalnaker, S.H., Hashmi, S., Lim, J.M., Aoki, K., Porterfield, M., Gutierrez-Sanchez, G., Wheeler, J., Ervasti, J.M., Bergmann, C., Tiemeyer, M., Wells, L., 2010. Site mapping and characterization of O-glycan structures on α -dystroglycan isolated from rabbit skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 285, 24882–24891. doi:10.1074/jbc.M110.126474
- Stalnaker, S.H., Stuart, R., Wells, L., 2011b. Mammalian O-mannosylation: unsolved questions of structure/function. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 21, 603–609. doi:10.1016/j.sbi.2011.09.001
- Stanley, P., 2016. What have we learned from glycosyltransferase knockouts in mice? *J. Mol. Biol.* doi:10.1016/j.jmb.2016.03.025
- Stanley, P., 2011. Golgi glycosylation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3, 1–13. doi:10.1101/cshperspect.a005199
- Stanley, P., Schachter, H., Taniguchi, N., 2009. N-Glycans, in: Varki, A., Cummings, R.D., Esko, J.D., Freeze, H.H., Stanley, P., Bertozzi, C.R., Hart, G.W., Etzler, M.E. (Eds.), *Essential of Glycobiology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Stevens, E., Torelli, S., Feng, L., Phadke, R., Walter, M.C., Schneiderat, P., Eddaoudi, A., Sewry, C.A., Muntoni, F., 2013. Flow Cytometry for the Analysis of α -Dystroglycan Glycosylation in Fibroblasts from Patients with Dystroglycanopathies. *PLoS One* 8, e68958. doi:10.1371/journal.pone.0068958
- Stone, J., van Driel, D., Valter, K., Rees, S., Provis, J., 2008. The locations of mitochondria in mammalian photoreceptors: relation to retinal vasculature. *Brain Res.* 1189, 58–69. doi:10.1016/j.brainres.2007.10.083

- Sugita, S., Saito, F., Tang, J., Satz, J., Campbell, K., Südhof, T.C., 2001. A stoichiometric complex of neurexins and dystroglycan in brain. *J. Cell Biol.* 154, 435–445. doi:10.1083/jcb.200105003
- Sugiyama, J., Bowen, D.C., Hall, Z.W., 1994. Dystroglycan binds nerve and muscle agrin. *Neuron* 13, 103–115.
- Sung, C.-H., Chuang, J.-Z., 2010. The cell biology of vision. *J. Cell Biol.* 190, 953–63. doi:10.1083/jcb.201006020
- Tachikawa, M., Kanagawa, M., Yu, C.-C.C.C., Kobayashi, K., Toda, T., 2012. Mislocalization of Fukutin Protein by Disease-causing Missense Mutations Can Be Rescued with Treatments Directed at Folding Amelioration. *J. Biol. Chem.* 287, 8398–8406. doi:10.1074/jbc.M111.300905
- Talts, J.F., Andac, Z., Göhring, W., Brancaccio, A., Timpl, R., 1999. Binding of the G domains of laminin α 1 and α 2 chains and perlecan to heparin, sulfatides, α -dystroglycan and several extracellular matrix proteins. *EMBO J.* 18, 863–870. doi:10.1093/emboj/18.4.863
- Takahashi, H., Kanesaki, H., Igarashi, T., Kameya, S., Yamaki, K., Mizota, A., Kudo, A., Miyagoe-Suzuki, Y., Takeda, S., Takahashi, H., 2011. Reactive gliosis of astrocytes and Müller glial cells in retina of POMGnT1-deficient mice. *Mol. Cell. Neurosci.* 47, 119–130. doi:10.1016/j.mcn.2011.03.006
- Takahashi, S., Sasaki, T., Manya, H., Chiba, Y., Yoshida, a, Mizuno, M., Ishida, H., Ito, F., Inazu, T., Kotani, N., Takasaki, S., Takeuchi, M., Endo, T., 2001. A new beta-1,2-N-acetylglucosaminyltransferase that may play a role in the biosynthesis of mammalian O-mannosyl glycans. *Glycobiology* 11, 37–45. doi:10.1093/glycob/11.1.37
- Takeda, S., Kondo, M., Sasaki, J., Kurahashi, H., Kano, H., Arai, K., Misaki, K., Fukui, T., Kobayashi, K., Tachikawa, M., Imamura, M., Nakamura, Y., Shimizu, T., Murakami, T., Sunada, Y., Fujikado, T., Matsumura, K., Terashima, T., Toda, T., 2003. Fukutin is required for maintenance of muscle integrity, cortical histiogenesis and normal eye development. *Hum. Mol. Genet.* 12, 1449–1459. doi:10.1093/hmg/ddg153
- Tamaru, Y., 2014. Molecular Characterization of Protein O-linked Mannose β -1,2-N-acetylglucosaminyltransferase 1 in Zebrafish. *J. Glycomics Lipidomics* 04, 1–7. doi:10.4172/2153-0637.1000111
- Taniguchi-Ikeda, M., Kobayashi, K., Kanagawa, M., Yu, C.C., Mori, K., Oda, T., Kuga, A., Kurahashi, H., Akman, H.O., DiMauro, S., Kaji, R., Yokota, T., Takeda, S., Toda, T., 2011. Pathogenic exon-trapping by SVA retrotransposon and rescue in Fukuyama muscular dystrophy. *Nature* 478, 127–131. doi:10.1038/nature10456
- Tasca, G., Moro, F., Aiello, C., Cassandrini, D., Fiorillo, C., Bertini, E., Bruno, C., Santorelli, F.M., Ricci, E., 2013. Limb-girdle muscular dystrophy with α -dystroglycan deficiency and mutations in the ISPD gene. *Neurology* 80, 963–5. doi:10.1212/WNL.0b013e3182840cbc
- Tom Dieck, S., Brandstätter, J.H., 2006. Ribbon synapses of the retina. *Cell Tissue Res.*

- 326, 339–346. doi:10.1007/s00441-006-0234-0
- Torelli, S., Brown, S.C., Brockington, M., Dolatshad, N.F., Jimenez, C., Skordis, L., Feng, L.H., Merlini, L., Jones, D.H., Romero, N., Wewer, U., Voit, T., Sewry, C.A., Noguchi, S., Nishino, I., Muntoni, F., 2005. Sub-cellular localisation of fukutin related protein in different cell lines and in the muscle of patients with MDC1C and LGMD2I. *Neuromuscul. Disord.* 15, 836–43. doi:10.1016/j.nmd.2005.09.004
- Ueda, H., Gohdo, T., Ohno, S., 1998. Beta-dystroglycan localization in the photoreceptor and Muller cells in the rat retina revealed by immunoelectron microscopy. *J. Histochem. Cytochem.* 46, 185–191. doi:10.1177/002215549804600207
- Unligil, U.M., Zhou, S., Yuwaraj, S., Sarkar, M., Schachter, H., Rini, J.M., 2000. X-ray crystal structure of rabbit N-acetylglucosaminyltransferase I: catalytic mechanism and a new protein superfamily. *EMBO J.* 19, 5269–80. doi:10.1093/emboj/19.20.5269
- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B.C., Remm, M., Rozen, S.G., 2012. Primer3-new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res.* 40, 1–12. doi:10.1093/nar/gks596
- van Reeuwijk, J., 2005. POMT2 mutations cause α -dystroglycan hypoglycosylation and Walker-Warburg syndrome. *J. Med. Genet.* 42, 907–912. doi:10.1136/jmg.2005.031963
- van Reeuwijk, J., Grewal, P.K., Salih, M.A.M., Beltrán-Valero de Bernabé, D., McLaughlan, J.M., Michielse, C.B., Herrmann, R., Hewitt, J.E., Steinbrecher, A., Seidahmed, M.Z., Shaheed, M.M., Abomelha, A., Brunner, H.G., van Bokhoven, H., Voit, T., 2007. Intragenic deletion in the LARGE gene causes Walker-Warburg syndrome. *Hum. Genet.* 121, 685–690. doi:10.1007/s00439-007-0362-y
- van Reeuwijk, J., Maugenre, S., van den Elzen, C., Verrips, A., Bertini, E., Muntoni, F., Merlini, L., Scheffer, H., Brunner, H.G., 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. doi:10.1002/humu.20313
- Voglmeir, J., Kaloo, S., Laurent, N., Meloni, M.M., Bohlmann, L., Wilson, I.B.H., Flitsch, S.L., 2011. Biochemical correlation of activity of the α -dystroglycan-modifying glycosyltransferase POMGnT1 with mutations in muscle-eye-brain disease. *Biochem. J.* 436, 447–455. doi:10.1042/BJ20101059
- Vester-Christensen, M.B., Halim, A., Joshi, H.J., Steentoft, C., Bennett, E.P., Lavery, S.B., Vakhrushev, S.Y., Clausen, H., 2013. Mining the O-mannose glycoproteome reveals cadherins as major O-mannosylated glycoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 21018–23. doi:10.1073/pnas.1313446110
- Wang, N.H.-H., Chen, S.-J., Yang, C.-F., Chen, H.-W., Chuang, H.-P., Lu, Y.-H., Chen, C.-H., Wu, J.-Y., Niu, D.-M., Chen, Y.-T., 2016. Homozygosity Mapping and Whole-Genome Sequencing Links a Missense Mutation in POMGNT1 to Autosomal

- Recessive Retinitis Pigmentosa. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 57, 3601–9. doi:10.1167/iovs.16-19463
- Waterhouse, A.M., Procter, J.B., Martin, D.M.A., Clamp, M., Barton, G.J., 2009. Jalview Version 2--a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics* 25, 1189–91. doi:10.1093/bioinformatics/btp033
- Wells, L., 2013. The O-Mannosylation Pathway: Glycosyltransferases and Proteins Implicated in Congenital Muscular Dystrophy. *J. Biol. Chem.* 288, 6930–6935. doi:10.1074/jbc.R112.438978
- 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., Inamori, K.-I., Venzke, D., Harvey, C., Morgensen, G., Hara, Y., Beltrán Valero de Bernabé, D., Yu, L., Wright, K.M., Campbell, K.P., 2014. The glucuronyltransferase B4GAT1 is required for initiation of LARGE-mediated α -dystroglycan functional glycosylation. *Elife* 3, 1–24. doi:10.7554/eLife.03941
- Willer, T., Prados, B., Falcón-Pérez, J.M., Renner-Müller, I., Przemeck, G.K.H., Lommel, M., Coloma, A., Valero, M.C., de Angelis, M.H., 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, 14126–14131. doi:10.1073/pnas.0405899101
- Williamson, R.A., Henry, M.D., Daniels, K.J., Hrstka, R.F., Lee, J.C., Sunada, Y., Ibraghimov-Beskrovnya, O., Campbell, K.P., 1997. Dystroglycan is essential for early embryonic development: disruption of Reichert's membrane in *Dag1*-null mice. *Hum. Mol. Genet.* 6, 831–41.
- Winder, S.J., 2001. The complexities of dystroglycan. *Trends Biochem. Sci.* 26, 118–124. doi:10.1016/S0968-0004(00)01731-X
- Wong, C.H., 2005. Protein glycosylation: new challenges and opportunities. *J. Org. Chem.* 70, 4219–4225.
- Wright, K.M., Lyon, K.A., Leung, H., Leahy, D.J., Ma, L., Ginty, D.D., 2012. Dystroglycan Organizes Axon Guidance Cue Localization and Axonal Pathfinding. *Neuron* 76, 931–944. doi:10.1016/j.neuron.2012.10.009
- Xin, X., Akasaka-Manyá, K., Manyá, H., Furukawa, J., Kuwahara, N., Okada, K., Tsumoto, H., Higashi, N., Kato, R., Shinohara, Y., Irimura, T., Endo, T., 2015. POMGNT1 Is Glycosylated by Mucin-Type O-Glycans. *Biol. Pharm. Bull.* 38, 1389–94. doi:10.1248/bpb.b15-00415
- Xiong, H., Kobayashi, K., Tachikawa, M., Manyá, H., Takeda, S., Chiyonobu, T., Fujikake, N., Wang, F., Nishimoto, A., Morris, G.E., Nagai, Y., Kanagawa, M., Endo, T., Toda, T., 2006. Molecular interaction between fukutin and POMGNT1 in the glycosylation pathway of α -dystroglycan. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 350, 935–941. doi:10.1016/j.bbrc.2006.09.129

- Xu, L., Lu, P.J., Wang, C.-H., Keramaris, E., Qiao, C., Xiao, B., Blake, D.J., Xiao, X., Lu, Q.L., 2013. Adeno-associated virus 9 mediated FKR gene therapy restores functional glycosylation of α -dystroglycan and improves muscle functions. *Mol. Ther.* 21, 1832–40. doi:10.1038/mt.2013.156
- Xu, M., Yamada, T., Sun, Z., Eblimit, A., Lopez, I., Wang, F., Many, H., Xu, S., Zhao, L., Li, Y., Kimchi, A., Sharon, D., Sui, R., Endo, T., Koenekoop, R.K., Chen, R., 2016. Mutations in POMGNT1 cause non-syndromic retinitis pigmentosa. *Hum. Mol. Genet.* 25, 1479–88. doi:10.1093/hmg/ddw022
- Xu, C., Ng, D.T.W., 2015. O-mannosylation: The other glycan player of ER quality control. *Semin. Cell Dev. Biol.* 41, 129–134. doi:10.1016/j.semcdb.2015.01.014
- Yagi, H., Nakagawa, N., Saito, T., Kiyonari, H., Abe, T., Toda, T., Wu, S.-W., Khoo, K.-H., Oka, S., Kato, K., 2013. AGO61-dependent GlcNAc modification primes the formation of functional glycans on α -dystroglycan. *Sci. Rep.* 3, 1–9. doi:10.1038/srep03288
- Yamamoto, T., Kato, Y., Hiroi, A., Shibata, N., Osawa, M., Kobayashi, M., 2012. Post-transcriptional regulation of fukutin in an astrocytoma cell line. *Int. J. Exp. Pathol.* 93, 46–55. doi:10.1111/j.1365-2613.2011.00799.x
- Yamamoto, T., Kato, Y., Karita, M., Kawaguchi, M., Shibata, N., Kobayashi, M., 2004. Expression of genes related to muscular dystrophy with lissencephaly. *Pediatr. Neurol.* 31, 183–190. doi:10.1016/j.pediatrneurol.2004.03.020
- Yamamoto, T., Kato, Y., Karita, M., Takeiri, H., Muramatsu, F., Kobayashi, M., Saito, K., Osawa, M., 2002. Fukutin expression in glial cells and neurons: implication in the brain lesions of Fukuyama congenital muscular dystrophy. *Acta Neuropathol.* 104, 217–224. doi:10.1007/s00401-002-0542-8
- Yamamoto, T., Kato, Y., Shibata, N., Sawada, T., Osawa, M., Kobayashi, M., 2008. A role of fukutin, a gene responsible for Fukuyama type congenital muscular dystrophy, in cancer cells: A possible role to suppress cell proliferation. *Int. J. Exp. Pathol.* 89, 332–341. doi:10.1111/j.1365-2613.2008.00599.x
- Yamamoto, T., Kato, Y., Kawaguchi, M., Shibata, N., Kobayashi, M., 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, 200–207. doi:10.1007/s00795-004-0260-5
- Yang, Y., Zhang, P., Xiong, Y., Li, X., Qi, Y., Hu, H., 2007. Ectopia of meningeal fibroblasts and reactive gliosis in the cerebral cortex of the mouse model of muscle-eye-brain disease. *J. Comp. Neurol.* 505, 459–477. doi:10.1002/cne.21474
- Yiş, U., Uyanik, G., Rosendahl, D.M., Carman, K.B., Bayram, E., Heise, M., Cömertpay, G., Kurul, S.H., 2014. Clinical, radiological, and genetic survey of patients with muscle-eye-brain disease caused by mutations in POMGNT1. *Pediatr. Neurol.* 50, 491–7. doi:10.1016/j.pediatrneurol.2014.01.008
- Yiş, U., Uyanik, G., Heck, P.B., Smitka, M., Nobel, H., Ebinger, F., Dirik, E., Feng, L.,

- Kurul, S.H., Brocke, K., Unalp, A., Özer, E., Cakmakci, H., Sewry, C., Cirak, S., Muntoni, F., Hehr, U., Morris-Rosendahl, D.J., 2011. Fukutin mutations in non-Japanese patients with congenital muscular dystrophy: less severe mutations predominate in patients with a non-Walker-Warburg phenotype. *Neuromuscul. Disord.* 21, 20–30. doi:10.1016/j.nmd.2010.08.007
- Yoshida, A., Kobayashi, K., Manya, H., Taniguchi, K., Kano, H., Mizuno, M., Inazu, T., Mitsuhashi, H., Takahashi, S., Takeuchi, M., Herrmann, R., Straub, V., Talim, B., Voit, T., Topaloglu, H., Toda, T., Endo, T., 2001. Muscular dystrophy and neuronal migration disorder caused by mutations in a glycosyltransferase, POMGnT1. *Dev. Cell* 1, 717–24. doi:10.1016/S1534-5807(01)00070-3
- Yoshida-Moriguchi, T., Campbell, K.P., 2015. Matriglycan: a novel polysaccharide that links dystroglycan to the basement membrane. *Glycobiology* 25, 702–713. doi:10.1093/glycob/cwv021
- Yoshida-Moriguchi, T., Willer, T., Anderson, M.E., Venzke, D., Whyte, T., Muntoni, F., Lee, H., Nelson, S.F., Yu, L., Campbell, K.P., 2013. SGK196 Is a Glycosylation-Specific O-Mannose Kinase Required for Dystroglycan Function. *Science* (80-.). 341, 896–899. doi:10.1126/science.1239951
- Yoshida-Moriguchi, T., Yu, L., Stalnakier, S.H., Davis, S., Kunz, S., Madson, M., Oldstone, M.B.A., Schachter, H., Wells, L., Campbell, K.P., 2010. O-mannosyl phosphorylation of alpha-dystroglycan is required for laminin binding. *Science* 327, 88–92. doi:10.1126/science.1180512
- Young, R.W., 1976. Visual cells and the concept of renewal. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 15, 700–725.
- Zhan, Y., Melian, N.Y., Pantoja, M., Haines, N., Ruohola-Baker, H., Bourque, C.W., Rao, Y., Carbonetto, S., 2010. Dystroglycan and mitochondrial ribosomal protein L34 regulate differentiation in the drosophila eye. *PLoS One* 5. doi:10.1371/journal.pone.0010488
- Zhang, P., Yang, Y., Candiello, J., Thorn, T.L., Gray, N., Halfter, W.M., Hu, H., 2013. Biochemical and biophysical changes underlie the mechanisms of basement membrane disruptions in a mouse model of dystroglycanopathy. *Matrix Biol.* 32, 196–207. doi:10.1016/j.matbio.2013.02.002
- Zhong, X., Somers, W., 2012. Recent Advances in Glycosylation Modifications in the Context of Therapeutic Glycoproteins. *Integr. Proteomics* 187–188. doi:10.5772/29708



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

Tabla S2.1 Anticuerpos empleados para microscopía de inmunofluorescencia.

Antígeno	Región del antígeno, especie	Origen	Casa comercial, nº de catálogo
POMT1	Región C-terminal (670-719), humano	policlonal de conejo	Sigma, SAB2101845
	Región interna (286-596), humano	policlonal de conejo	Dr. Jesús Cruces, Universidad Autónoma de Madrid, C1
	Región interna (286-317; 382-391; 514-596), humano	policlonal de conejo	Dr. Jesús Cruces, Universidad Autónoma de Madrid, C2
	Región interna (510-524), humano	policlonal de conejo	Eurogentec, SP26
	Región interna (409-426), humano	monoclonal de ratón	Santa Cruz Biotechnology, clon G-10, sc-390451
	Región interna (285-595), humano	policlonal de conejo	Proteintech 15382-1-ap
POMT2	Región interna (311-447), humano	policlonal de conejo	Sigma, HPA003663
	Región interna, humano	policlonal de cabra	Santa Cruz Biotechnology, sc-48919
	Región N-terminal (1-52), humano	monoclonal de ratón	Santa Cruz Biotechnology, clon G-3, sc-393487
	Región interna (483-581), humano	monoclonal de ratón	Sigma, clon 1D9, WH0029954M1
LARGE	Región interna (137-300), humano	policlonal de conejo	Santa Cruz Biotechnology, sc-99164
	Región C-terminal, humano	policlonal de cabra	Santa Cruz Biotechnology, sc-33435
	Región interna (421-463), humano	policlonal de cabra	Sigma, SAB2501652

En la 1ª columna se indica la proteína antigénica, en la 2ª la región del antígeno contra el que fue diseñado (los aminoácidos si hay información de ellos) y la especie de origen, en la 3ª la especie en que fue desarrollado, en la 4ª la casa comercial de la que se obtuvo y su número de catálogo (y también el nº del clon para los anticuerpos monoclonales).

Universidad de Alicante

Tabla S3.1 Proteínas homólogas a POMGnT1 y POMGnT2 humana, resultados obtenidos en la búsqueda con BLASTp

Figura S3.1 Múltiple alineamiento de proteínas homólogas a POMGnT1 humana

Figura S3.2 Múltiple alineamiento de proteínas homólogas a POMGnT2 humana

Las tablas y figuras complementarias pueden ser consultadas en el siguiente vínculo:

https://www.dropbox.com/sh/e2d81w5vj4hy42m/AABYORso0zpNFJkG_xuFINca?dl=0