

Congenital muscular dystrophy with merosin deficiency

FERNANDO M. S. TOMÉ ⁽¹⁾, TERESINHA EVANGELISTA ⁽¹⁾, ANNE LECLERC ⁽¹⁾,
YOSHIHIDE SUNADA ⁽²⁾, EMILIA MANOLE ⁽¹⁾, BRIGITTE ESTOURNET ⁽³⁾, ANNIE BAROIS ⁽³⁾,
KEVIN P. CAMPBELL ⁽²⁾, MICHEL FARDEAU ⁽¹⁾

⁽¹⁾ INSERM U. 153 and CNRS ERS 064, 17, rue du Fer-à-Moulin, 75005 Paris, France.

⁽²⁾ Howard Hughes Medical Institute and Department of Physiology and Biophysics, University of Iowa College of Medicine, Iowa City, Iowa 52242, USA.

⁽³⁾ Pédiatrie - Réanimation Infantile, Hôpital Raymond-Poincaré, Garches, France.

Reprints : F. M. S. Tomé

Dystrophie musculaire congénitale avec déficience en mérosine

ABSTRACT

Congenital muscular dystrophy is one of the most frequent and severe childhood muscular dystrophies. Several forms of this disease have been described. The form associated with marked central nervous system disturbances, frequent in Japan, is known as Fukuyama congenital muscular dystrophy and was recently linked to chromosome 9. The most frequent form observed in occidental countries appears to be clinically characterized by exclusive involvement of skeletal muscle, and has been identified by clinico-pathological features which are often fallacious. A predominant histopathological feature is the marked increase in endomysial collagen tissue. We investigate whether laminin, a major component of the extracellular matrix, which is linked to the subsarcolemmal cytoskeleton by a large oligomeric complex of dystrophin-associated glycoproteins, could be involved in this form. We observed a specific absence of merosin, the laminin M chain, in 13 patients affected by classical non-Japanese form of congenital muscular dystrophy. This result allows the precise identification of a particular form of congenital muscular dystrophy and gives a clue to understanding its molecular pathogenesis. ▲

RÉSUMÉ

La dystrophie musculaire congénitale est une des plus fréquentes et des plus sévères parmi les dystrophies musculaires de l'enfance. Plusieurs formes de cette maladie ont été décrites. La forme associée à des modifications importantes du système nerveux central, fréquente au Japon, est habituellement désignée sous le terme de dystrophie musculaire congénitale type Fukuyama, et le gène a été récemment localisé sur le chromosome 9. La forme la plus fréquemment observée dans les pays occidentaux, touchant cliniquement uniquement le système musculaire, est identifiée sur des traits clinico-pathologiques souvent peu explicites. La formule lésionnelle est remarquable par l'augmentation marquée du collagène endomysial. Nous avons recherché si l'une des chaînes de la laminine, composant majeur de la matrice extracellulaire, reliée au cytosquelette intracellulaire par un complexe oligomérique de glycoprotéines liées à la dystrophine, pouvait être impliquée dans ce mécanisme. De fait, nous avons observé une absence spécifique de la mérosine – chaîne « M » de la laminine – chez 13 patients atteints de la forme classique, non japonaise, de dystrophie musculaire congénitale. Ce résultat permet une identification précise d'une forme particulière de dystrophie musculaire congénitale, et ouvre une voie possible à la compréhension de son mécanisme moléculaire. ▲

Key words : skeletal muscle, myopathy, congenital muscular dystrophy, merosin, laminin, extracellular matrix.

Mots clés : muscle squelettique, myopathie, dystrophie musculaire congénitale, mérosine, laminine, matrice extracellulaire.

VERSION ABRÉGÉE

La dystrophie musculaire congénitale (CMD) est une maladie musculaire très sévère de survenue très précoce ; elle constitue la cause la plus fréquente des hypotonies natales sévères d'origine neuromusculaire [1-3]. Ses manifestations cliniques sont notées à la naissance ou dans les tout premiers mois de la vie et sont faites d'une hypotonie, d'un retard des acquisitions motrices,

Note présentée par Jean Rosa.

Note remise le 28 février 1994, acceptée après révision le 21 mars 1994.

de rétractions sévères et précoces, et souvent de déformations articulaires. La créatine-kinase sérique est élevée (jusqu'à 30 fois la valeur normale) dans les étapes précoces de la maladie et décroît ensuite rapidement. Les modifications histologiques présentes dans les biopsies musculaires sont faites d'une variation importante de la taille des fibres musculaires, de la présence de quelques fibres nécrotiques et régénératives, et d'une augmentation très marquée du tissu collagène endomysial ; il n'y a pas de modification spécifique de la structure des fibres musculaires à l'examen en microscopie

électronique. Le diagnostic de CMD s'appuie ainsi sur des éléments cliniques et sur des changements morphologiques observés dans la biopsie musculaire qui n'ont aucune spécificité; il ne peut donc être fait avec certitude, d'autres désordres musculaires pouvant se présenter sous un tableau clinico-pathologique très voisin.

A l'intérieur du groupe de maladies identifié sous le terme CMD, plusieurs formes ont été individualisées [1-3]. Les deux formes les plus communes sont une forme occidentale, classique, et une forme japonaise. Cette dernière s'accompagne habituellement d'une atteinte sévère du système nerveux central et est dénommée « dystrophie musculaire congénitale type Fukuyama » (FCMD) [4, 5]. Il a été récemment montré que cette affection était localisée sur le chromosome 9 [6] et s'accompagnait d'une réduction partielle en mérosine [7]. De rares cas de CMD associés à des retards mentaux ou à des anomalies du système nerveux central ont été également observés dans les pays occidentaux [1, 2, 3, 8], mais on ne sait pas actuellement s'ils appartiennent ou non à la même entité.

L'augmentation marquée du tissu conjonctif observée dans les biopsies musculaires des patients atteints de CMD a depuis longtemps suggéré qu'une anomalie des composants de la matrice extracellulaire pouvait être intéressée dans le mécanisme de la maladie [9]. Jusqu'ici, nos études [10], comme celles d'autres auteurs [11], n'avaient pas réussi à détecter des modifications spécifiques de la matrice extracellulaire. Comme il a été montré récemment qu'un complexe oligomérique de glycoprotéines sarcolemmiques associées à la dystrophine [12-14] forme un lien entre le cytosquelette intracellulaire et la laminine, composant majeur de la matrice extracellulaire, nous nous sommes attachés à rechercher si l'une des sous-unités de la laminine [15, 16] pouvait être impliquée dans la CMD.

Vingt patients ont été étudiés par biopsie musculaire du muscle deltoïde; les âges au moment de la biopsie s'étagaient entre 3 mois et 9 ans. Les biopsies ont été techniques selon les méthodes classiques pour l'histologie conventionnelle et pour les techniques histocytochimiques [17] et immunocytochimiques [13, 14, 18, 19]. L'étude immunocytochimique a été réalisée sur coupes de 7 µm d'épaisseur à l'aide des anticorps antidystrophine, des anticorps contre les sous-unités M [21, 22], A [22], B1 [23] et B2 [23] de la laminine et les anticorps contre les différentes protéines et glycoprotéines du complexe de protéines associées à la dystrophine.

Des immunoblots ont été réalisés à partir d'échantillons contenant 200 µg de protéines, sur gradient SDS-PAGE en présence de 1 % 2-mercapto-éthanol et transférés sur nitrocellulose. La révélation a été faite avec un anticorps dirigé contre un fragment de la mérosine de souris (don du Dr Yamada - NIH).

Avec l'anticorps antimérosine, aucun marquage n'a été observé chez 13 patients (8 de sexe masculin et 5 de sexe féminin, âge au moment de la biopsie compris entre 3 mois et 9 ans [âge moyen :

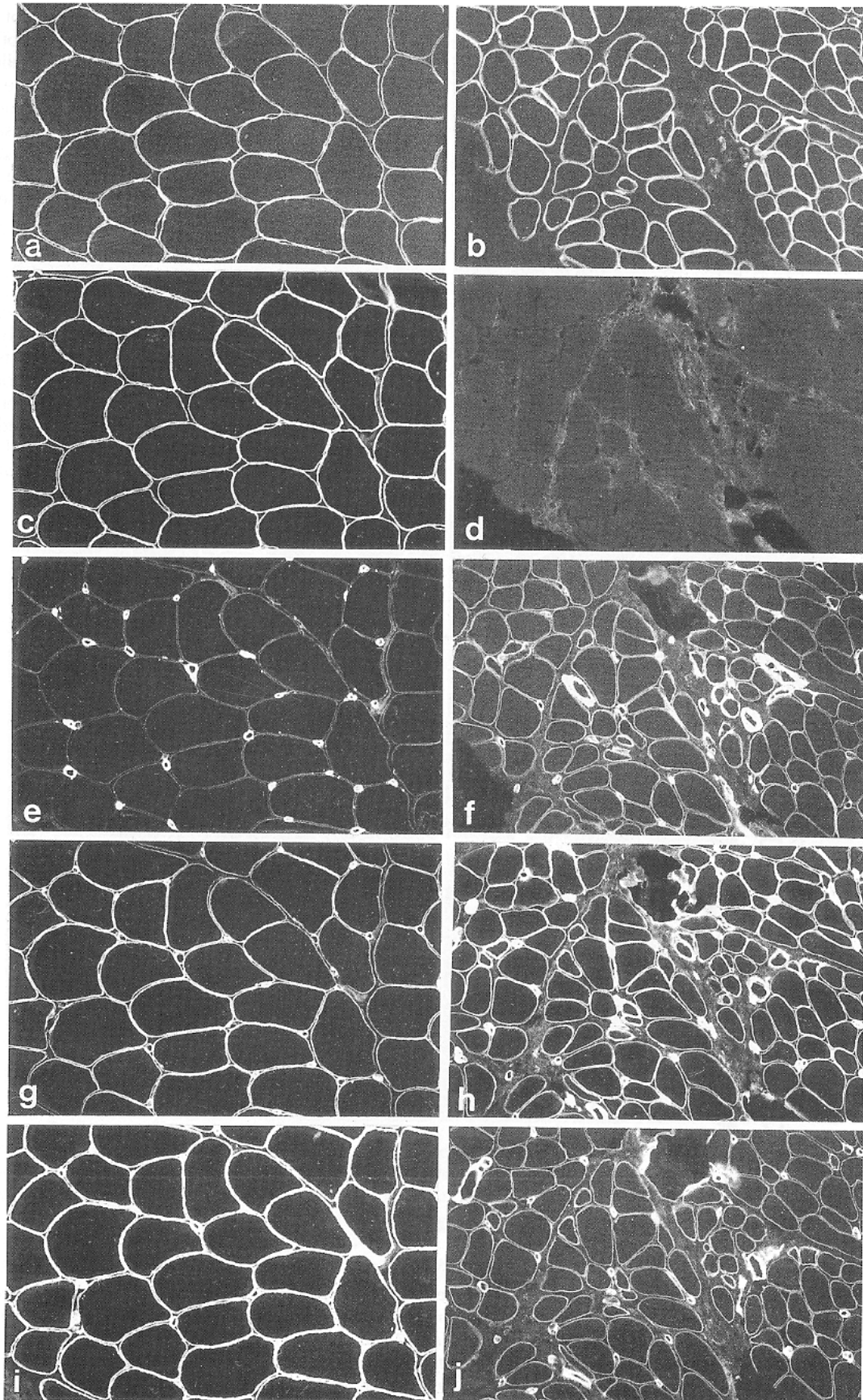
2 ans et demi]) présentant un tableau de dystrophie musculaire congénitale classique (ou occidentale) (Fig. 1). L'absence de mérosine a été confirmée par l'analyse en immunoblots (Fig. 2). Les études immunocytochimiques avec des anticorps contre les sous-unités B1 et B2 de la laminine ont montré un marquage de la lame basale identique aux contrôles normaux. La chaîne A de la laminine, faiblement exprimée dans le muscle squelettique adulte, est apparue comme surexprimée à un degré variable chez les patients présentant une absence en mérosine. Dans les contrôles normaux, comme dans les biopsies provenant de malades atteints d'autres dystrophies musculaires progressives (Duchenne, Becker, dystrophie musculaire sévère autosomique de l'enfant avec phénotype DMD - SCARMD [18, 19], dystrophie des ceintures localisée sur le chromosome 15 [20], dystrophie facio-scapulo-humérale, dystrophie myotonique, dystrophie oculopharyngée et syndrome d'Ullrich), la mérosine ainsi que les autres sous-unités de la laminine étaient normalement exprimées (Fig. 3). Aucune déficience en mérosine, ni par les méthodes immunocytochimiques, ni par immunoblot, n'a été mise en évidence chez 7 enfants (2 de sexe masculin, 5 de sexe féminin, âge au moment de la biopsie compris entre 6 mois et 9 ans [âge moyen : 4 ans et demi]) présentant des troubles musculaires, qui, après exclusion de désordres musculaires bien caractérisés, ont été considérés, sur la base des données histopathologiques, comme appartenant selon toute vraisemblance au groupe CMD. Il doit être noté que, par immunocytochimie, aucune anomalie n'a été vue, ni pour la dystrophine, ni pour les différentes protéines associées à la dystrophine, chez les 13 patients pour lesquels la mérosine était absente, de même que chez les 7 enfants présentant une mérosine normale.

Cette étude montre donc que 13 enfants, présentant un tableau classique de dystrophie musculaire congénitale, présentent une déficience élective en mérosine. Il apparaît également que d'autres patients, non distinguables des précédents sur le plan clinico-pathologique, ne présentent pas cette déficience. L'absence de mérosine permet donc l'identification d'une forme particulière de CMD, et suggère que le défaut en cette protéine puisse être l'anomalie primaire pour cette forme, menant aux lésions du tissu musculaire caractéristiques de cette myopathie. Selon un mécanisme déjà suggéré pour la dystrophie musculaire de Duchenne et pour la dystrophie musculaire sévère autosomique de l'enfant avec phénotype DMD [18, 24], l'absence de mérosine, en rompant le lien entre le cytosquelette sous-sarcolemmique et la matrice extracellulaire, peut entraîner les modifications des fibres musculaires observées dans la CMD (Fig. 4). Nos résultats suggèrent que le gène de la mérosine (localisé sur le génome humain en 6q22-23 [25]) peut être considéré comme un gène candidat pour cette maladie. La découverte récente [26] d'une déficience en mérosine chez un mutant de la souris (*dystrophia muscularis, dy*) fournit enfin un modèle pour l'étude de la maladie humaine. ▲

Congenital muscular dystrophy (CMD), a very disabling muscle disease of early clinical onset, is the most frequent cause of severe neonatal hypotonia of neuromuscular origin [1-3]. Its manifestations are noticed at birth or in the first months of life and consist of muscle hypotonia, associated with delayed

motor milestones, severe and early contractures and often joint deformities. Serum creatine kinase is raised, up to 30 times the normal values in the early stages of the disease, and then rapidly decreases. The histological changes in the muscle biopsies consist of large variation in the size of muscle fibers, a few necrotic and regenerating fibres,

Figure 1. **Immunocytochemical analysis of dystrophin (a and b), merosin (c and d), and laminins A (e and f), B1 (g and h) and B2 (i and j) in biopsied skeletal muscle.** Shown is normal staining in a control, on the left (a, c, e, g and i) and the absence of merosin and overexpression of laminin A in a 2-year old female with CMD on the right (b, d, f, h and j). Magnification × 265. ▶



marked increase in endomysial collagen tissue, and no specific ultrastructural features. The diagnosis of CMD has been based on the clinical picture and the morphological changes in the muscle biopsy, but, as these changes lack specificity, it cannot be made with certainty, as other muscle disorders may present with similar clinico-pathological features.

Within the group of diseases classified as CMD, various forms have been individualized [1-3]. The two more common forms are the occidental and the Japanese, the latter being associated with severe mental disturbances, and usually referred to as Fukuyama congenital muscular dystrophy (FCMD) [4, 5] and recently mapped to chromosome 9 [6]. A partial merosin reduction was found in this form [7]. It is unknown whether the rare cases of CMD associated with mental retardation or central nervous system abnormalities observed in occidental countries [1-3, 8] belong or not to the same disease entity.

The marked increase in connective tissue observed in muscle biopsies of patients with CMD has suggested that an abnormality of one of the components of the extracellular

matrix could be involved in the pathogenesis of this disease [9]. However, our first studies [10] and those of others [11] failed to detect specific changes in extracellular matrix proteins. As it was demonstrated that a large oligomeric complex of sarcolemmal glycoproteins associated with dystrophin provides a link between the subsarcolemmal cytoskeleton and laminin [12-14], we investigated whether one of the laminin subunits [15, 16] could be involved in the classical non-Japanese form of this disease.

Materials and methods

Patients and muscle biopsies

Muscle biopsies of deltoid muscles from twenty patients, aged 3 months to 9 years at the time of the biopsy, were investigated in this study. All these patients presented clinico-pathological features of classical type of congenital muscular dystrophy. The biopsy samples were frozen in isopentane cooled in liquid nitrogen and stored at -80°C . Conventional histological and histochemical techniques were performed on $10\ \mu\text{m}$ -thick transverse frozen cryostat sections [17].

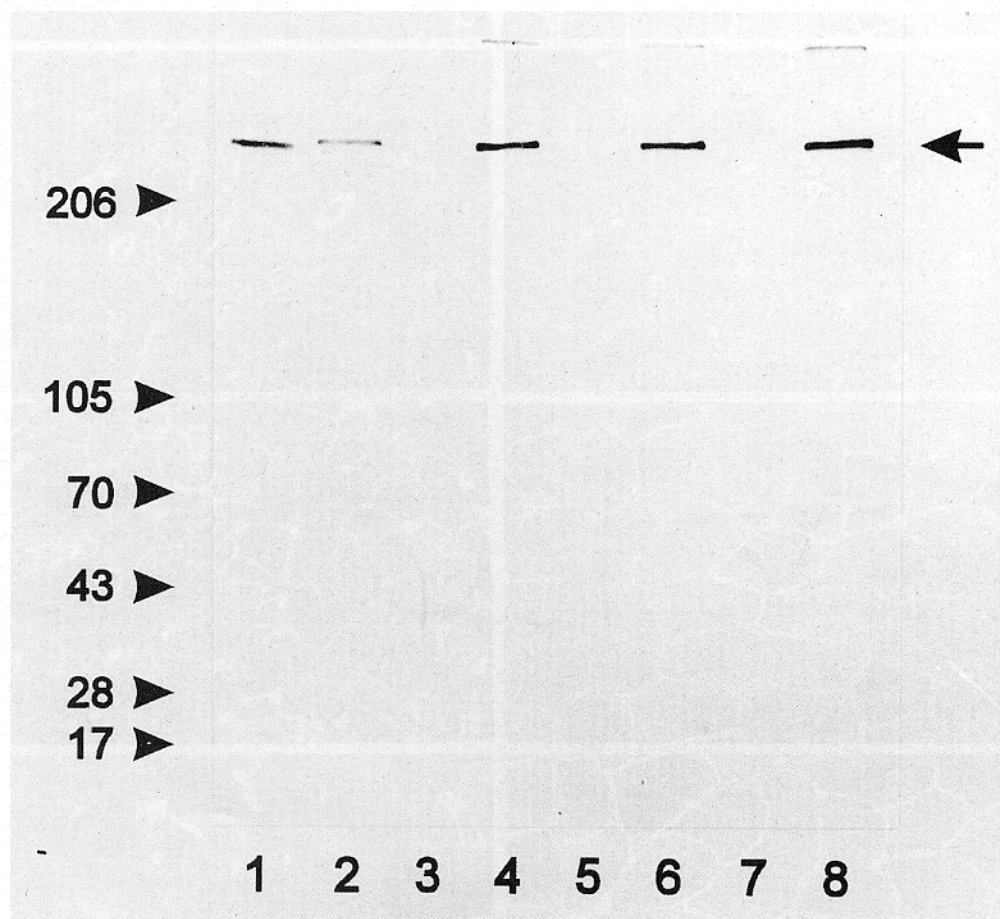


Figure 2. **Immunoblot analysis of EDTA-extracts from biopsied skeletal muscle specimens using a polyclonal antibody against merosin M chain.** Lane 1 : normal control; lanes 2, 4 and 6 : children clinicopathologically diagnosed as CMD (lane 2 : 16-month-old female, lane 4 : 4.5-year-old male; lane 6 : 9-year-old female); lanes 3, 5 and 7 : children with classical CMD and merosin-deficiency (lane 3 : 10-month-old female, lane 5 : 3-year-old male, lane 7 : 9-year-old female); lane 8 : 6-year-old male with Duchenne muscular dystrophy. Molecular weight standards ($\times 10^{-3}$) are shown on the left. Immunoblot analysis of normal and diseased controls demonstrated the presence of a 300 kDa fragment of merosin M (arrow). In patients with classical CMD proved to be merosin-deficient by immunofluorescence, a 300 kDa fragment was undetectable by immunoblotting.

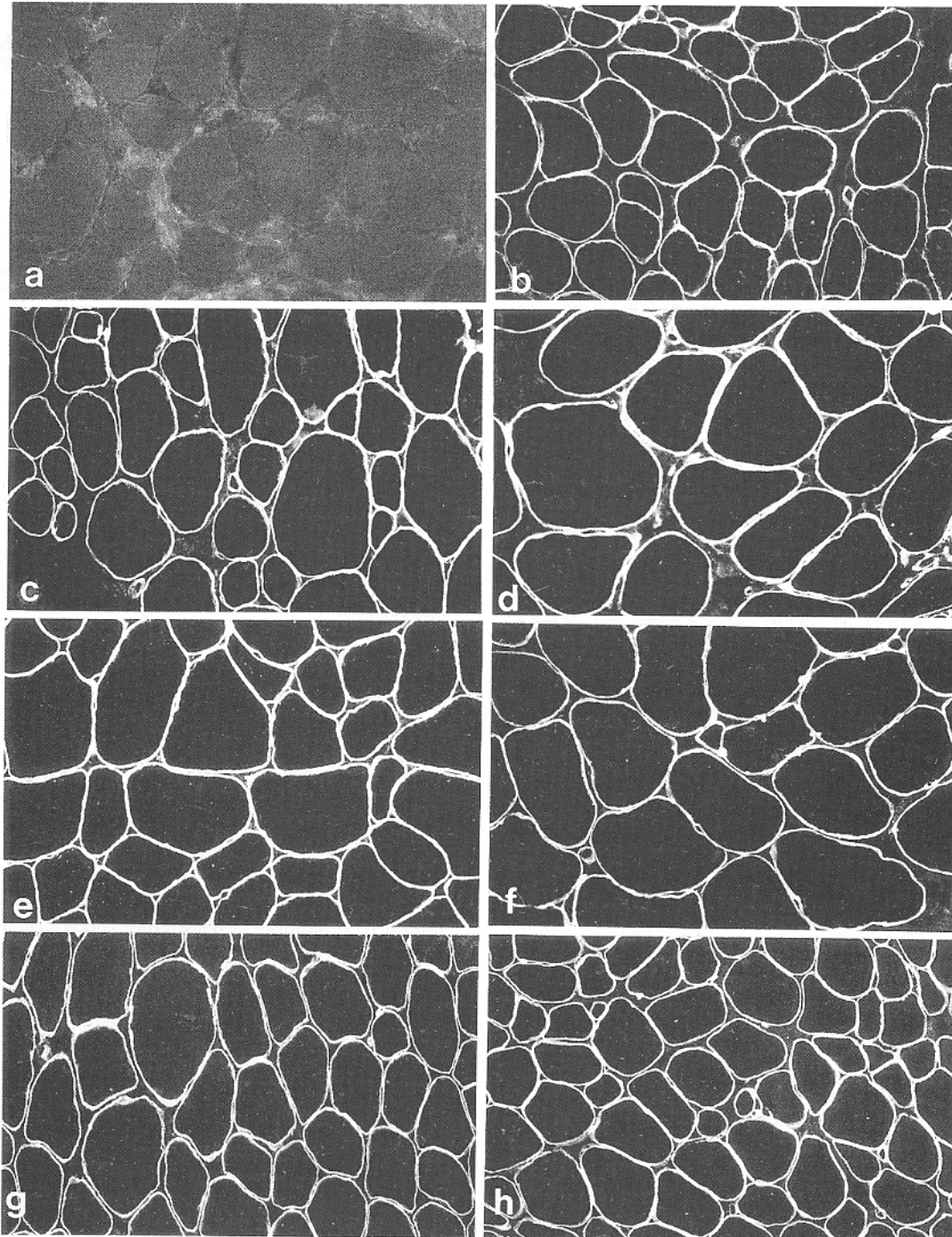


Figure 3. **Immunocytochemical analysis of merosin in biopsied skeletal muscle.** Merosin is absent in a 9-year-old male with CMD (a) and present in patients affected by other muscular dystrophies. Shown are a 6-year-old male with Duchenne (b), a 31-year-old female with limb girdle linked to chromosome 15 (c), a 15-year-old female with severe childhood autosomal recessive with adhalin (50 kDa dystrophin associated glycoprotein) deficiency (d), a 34-year-old male with myotonic (e), and a 75-year-old female with oculopharyngeal (f) muscular dystrophies, a 9-year-old male with Ullrich syndrome (g); and a 6-year-old male clinicopathologically diagnosed as CMD (h). Magnification $\times 265$.

Immunocytochemistry

Indirect immunofluorescence microscopy of $7\ \mu\text{m}$ -thick cryosections from skeletal muscle biopsy specimens of the patients was performed as described previously

[13, 14, 18, 19]. Incubation with all antibodies was performed at room temperature. The sections were examined under a Zeiss Axioplan fluorescence microscope. Photographs were taken under identical conditions with the same exposure time.

For comparison, cryosections from normal controls and patients with other muscle diseases (Duchenne, Becker, severe childhood autosomal recessive with adhalin deficiency [18, 19], limb girdle linked to chromosome 15 [20], facioscapulohumeral, myotonic and oculopharyngeal muscular dystrophies, and Ullrich syndrome) were also processed identically.

Immunoblotting

For immunoblotting we used cryosections (20 µm) from biopsied skeletal muscle. They were homogenized with 80 vols of EDTA-extraction buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM PMSF, 0.75 mM benzamide, 1 µg/ml aprotinin, 1 µg/ml leupeptin, 1 µg/ml pepstatin A) and incubated in ice for 2 h. After centrifugation, the protein concentration of each sample was determined by Lowry's method. Samples containing 200 µg of protein were separated on 3-12 % gradient SDS-PAGE in the presence of 1 % 2-mercaptoethanol and transferred to nitrocellulose. The nitrocellulose transfer was stained with a rabbit polyclonal antibody against a recombinant mouse merosin M chain fragment (gift from Dr Y. Yamada, NIH).

Antibodies

Monoclonal anti-merosin (Mchain) [21, 22] (Chemicon), anti-laminin subunits A(4C7) [22], B1(4E10) [23] and B2(2E80) [23] (Gibco BRL), rabbit polyclonal antibody against a recombinant mouse merosin M chain fragment (gift from Dr Y. Yamada, NIH), monoclonal anti-dystrophin antibodies (NLC DYS 2 and NLC DYS 3, Novocastra), and monoclonal and polyclonal specific antibodies against 156 kDa (α-dystroglycan), 50 kDa (adhalin), 43 kDa (β-dystroglycan) and 35 kDa dystrophin-associated protein, previously characterized [13, 14, 17, 18], were used in this study.

Results and discussion

In normal human skeletal muscle, immunocytochemical studies using an antibody against merosin (laminin M chain) [21, 22] show uniform labeling around each muscle fiber (*Fig. 1c*), and labeling of neuromuscular junctions and intramuscular nerves, when present. In contrast, there was no such labeling with this antibody in 13 patients (8 males and 5 females; ages at muscle biopsy between 3 months and 9 years [mean age : 2 1/2 years]) with CMD of classical or occidental type (*Fig. 1d*). The merosin deficiency in these patients was confirmed by immunoblot analysis (*Fig. 2*). Immunocytochemical studies with antibodies against B1 and B2 laminin subunits showed labeling of the basal lamina similar to that seen in normal controls (*Fig. 1g-j*). The laminin A chain, which is weakly expressed in adult skeletal muscle (*Fig. 1e*), was overexpressed, at variable degree, in patients with merosin absence (*Fig. 1f*). In normal controls and patients with other muscular dystrophies (Duchenne, Becker, severe childhood autosomal recessive with adhalin deficiency, limb girdle linked to chromosome 15, facioscapulohumeral, myotonic and oculopharyngeal muscular dystrophies, and Ullrich syndrome) the merosin (*Fig. 3*) as well as the other laminin subunits (results not shown) were normally expressed. No deficiency in

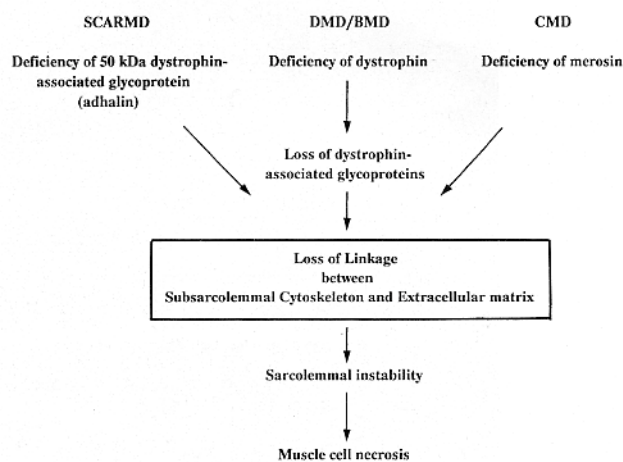


Figure 4. *Hypothetical mechanism of muscle fiber necrosis in three childhood muscular dystrophies : severe childhood autosomal recessive muscular dystrophy (SCARMMD), Duchenne and Becker muscular dystrophy (DMD/BMD) and congenital muscular dystrophy (CMD), characterized by deficiency of three different proteins, adhalin, dystrophin and merosin, respectively.*

merosin either by immunocytochemical (*Fig. 3h*) or by immunoblot analysis (*Fig. 2*) was found in 7 children (2 males and 5 females ages at muscle biopsy between 6 months and 9 years [mean age : 4 1/2 years]) with muscle disturbances and who, after exclusion of well-characterized muscle disorders, were considered, by the histopathological features of their muscle biopsies, as possibly belonging to the CMD group. It should be noted that, by immunocytochemistry, no abnormalities were seen either in dystrophin or the dystrophin-associated proteins in the thirteen patients in whom merosin was absent (*Fig. 1b*) as well as in the 7 children with normal merosin (results not shown).

This study shows that 13 patients presenting with a classical picture of CMD have a specific deficiency in merosin. Other patients, who have indistinguishable clinico-pathological features of classical CMD, do not present this deficiency. The lack of merosin allows, therefore, the precise identification of a particular form of CMD and suggests that defects in this protein may be the primary abnormality leading to the lesions of the muscle tissue in this myopathy. Patients with diagnosis of CMD but having normal merosin must have a different form of CMD or other congenital muscle disorder. According to a mechanism common to Duchenne muscular dystrophy (DMD) and to severe childhood autosomal recessive muscular dystrophy with DMD-like phenotype (SCARMMD) [18, 24], an absence of merosin could disrupt the link between the subsarcolemmal cytoskeleton and the extracellular matrix and lead to muscle fiber changes in CMD (*Fig. 4*). Furthermore, our results suggest that the merosin M chain gene, localized to chromosome 6q22-23 [25] should be considered as a candidate for causing this disease. The recently discovery [26] of merosin deficiency in the mutant mouse *dy* (dystrophia muscularis) provides a model for study of the human disease. ▼

Acknowledgements : we thank S. Roberds (University of Iowa) for his helpful comments. This work was supported by the Association Française contre les Myopathies (France) and the Muscular Dystrophy Association (USA). K.P.C. is an Investigator of the Howard Hughes Medical Institute.

Note added in proofs. After submission of the manuscript we have learned that merosin deficiency in *dy* mouse was independently found Arahata *et al.* (*Proc Japan Acad*, 1993, 69 Ser B, 259-64).

REFERENCES

1. Dubowitz V. 1978. *Muscle disorders in childhood*. London, Philadelphia and Toronto : Saunders.
2. Banker B. Q. 1986. Congenital muscular dystrophy. In : Engel A. G., Banker B. Q., eds. *Myology*, vol. 2. New York : McGraw-Hill Book Company, 1367-82.
3. Fardeau M. 1992. Congenital myopathies. In : Mastaglia F. L. Lord Walton of Detchant, eds. *Skeletal Muscle Pathology*, 2nd ed. Edinburgh : Churchill Livingstone, 237-81.
4. Fukuyama Y., Kawazura M., Haruna H. 1960. A peculiar form of congenital progressive muscular dystrophy. *Pediatr. Univ. Tokyo* 4: 5-8.
5. Fukuyama Y., Osawa M., Suzuki H. 1981. Congenital progressive muscular dystrophy of the Fukuyama type : clinical, genetic and pathologic considerations. *Brain Dev.* 13: 1-9.
6. Toda T., Segawa M., Nomura Y., Nonaka I., Masuda K., Ishihara T., Suzuki M., Tomita I., Origuchi Y., Ohno K., Misugi N., Sasaki Y., Takada K., Kawai M., Otani K., Murakami T., Saito K., Fukuyama Y., Shimizu T., Kanazawa I., Nakamura Y. 1993. Localization of a gene for Fukuyama type congenital muscular dystrophy to chromosome 9q31-33. *Nature Genet.* 5: 283-6.
7. Hayashi Y. K., Engvall E., Arikawa-Hirasawa E., Goto K., Koga R., Nonaka I., Sugita H., Arahata K. 1993. Abnormal localization of laminin subunits in muscular dystrophies. *J. Neurol. Sci.* 119: 53-64.
8. Nonaka I., Chou S. M. 1979. Congenital muscular dystrophy. In : Vinken P. J., Bruyn G.W., eds. *Handbook of Clinical Neurology*, vol. 41. Amsterdam : North-Holland Publishing Company, 27-50.
9. Duance V. C., Stephens H. R., Dunn M., Bailey A. J., Dubowitz V. 1980. A role for collagen in the pathogenesis of muscular dystrophy. *Nature* 284: 470-2.
10. Hantai D., Labat-Robert J., Grimaud J. A., Fardeau M. 1985. Fibronectin, laminin, type I, III and IV collagens in Duchenne's muscular dystrophy, congenital muscular dystrophies and congenital myopathies : an immunocytochemical study. *Connect. Tissue Res.* 13: 273-81.
11. Stephens H. R., Duance V. C., Dunn M. J., Bailey A. J., Dubowitz V. 1982. Collagen types in neuromuscular diseases. *J. Neurol. Sci.* 53: 45-62.
12. Campbell K. P., Kahl S. D. 1989. Association of dystrophin and integral membrane glycoprotein. *Nature* 338: 259-62.
13. Ervasti J. M., Campbell K. P. 1991. Membrane organization of the dystrophin-glycoprotein complex. *Cell* 66: 1121-31.
14. 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 extracellular matrix. *Nature* 355: 696-702.
15. Engvall E. 1993. Laminin variants : why, where and when? *Kidney Int.* 43: 2-6.
16. Tryggvason K. 1993. The laminin family. *Curr. Op. Cell Biol.* 5: 877-82.
17. Fardeau M. 1973. Caractéristiques cytochimiques et ultrastructurales des différents types de fibres musculaires squelettiques extrafusales (chez l'homme et quelques mammifères). *Ann. Anat. Pathol.* 18: 7-34.
18. Matsumura K., Tomé F. M. S., Collin H., Azibi K., Chaouch M., Kaplan J. C., Fardeau M., Campbell K. P. 1992. Deficiency of the 50 K dystrophin-associated glycoprotein in severe childhood autosomal recessive muscular dystrophy. *Nature* 359: 320-2.
19. Fardeau M., Matsumura K., Tomé F. M. S., Collin H., Leturcq F., Kaplan J. C., Campbell K. P. 1993. Deficiency of the 50 kDa dystrophin-associated glycoprotein (adhelin) in severe childhood autosomal recessive muscular dystrophies in children native from European countries. *C. R. Acad. Sci. Paris* 316: 799-804.
20. Beckmann J. S., Richard I., Hillaire D., Broux O., Antignac C., Bois E., Cann H., Cottingham Jr R. W., Feingold N., Feingold J., Kalil J., Lathorp G., Marcadet A., Masset M., Mignard C., Passos-Bueno M. R., Pellerain N., Zatz M., Dausset J., Fardeau M., Cohen D. 1991. A gene for limb-girdle muscular dystrophy maps to chromosome 15 by linkage. *C. R. Acad. Sci. Paris* 312: 141-8.
21. Leivo I., Engvall E. 1988. Merosin, a protein specific for basement membrane of Schwann cells, striated muscle, and trophoblast, is expressed late in nerve and muscle development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 1544-8.
22. Engvall E., Earwicker D., Haaparanta T., Ruoslahti E., Sanes J. R. 1990. Distribution and isolation of four laminin variants : tissue restricted distribution of heterotrimers assembled from five different subunits. *Cell Regul.* 1: 731-40.
23. Engvall E., Davies G. E., Dickerson K., Ruoslahti E., Varon S., Manthorpe M. 1986. Mapping of domains in human laminin using monoclonal antibodies : localization of the neurite-promoting site. *J. Cell Biol.* 103: 2457-65.
24. Matsumura K., Campbell K. P. 1993. Dystrophin-glycoprotein complex : its role in the molecular pathogenesis of muscular dystrophies. *Neuromus. Disord.* 3: 109-18.
25. Vuolteenaho R., Nissinen M., Sainio K., Byers M., Eddy R., Hirvonen H., Shows T. S., Sariola H., Engvall E., Tryggvason K. 1994. Human laminin M chain (merosin) : complete primary structure, chromosomal assignment, and expression of the M and A chain in human fetal tissues. *J. Cell Biol.* 124: 381-94.
26. Sunada Y., Bernier S. M., Kosak C. A., Yamada Y., Campbell K. P. 1994. Deficiency of merosin in dystrophic *dy* mice and genetic linkage of laminin M chain gene to *dy* locus. *J. Biol. Chem.* 269: 13729-32.