

INTRODUCCIÓ

1. Aspectes clínics
2. Aspectes genètics
3. Models animals

1. ASPECTES CLÍNICS

La síndrome de Rett (RTT) va ser inicialment descrita per Andreas Rett el 1966 (Rett, 1966), però no va ser fins l'any 1982, a la Federació Europea de Neuropediatria celebrada a Norwirherhout (Holanda), quan el Dr. Hagberg va presentar una descripció clínica detallada de la malaltia. El 1983 es va descriure l'RTT en una publicació a la literatura mèdica com una síndrome progressiva d'autisme, demència, pèrdua de la capacitat de manipulació i aparició d'estereotípies de rentat de mans en les pacients (Hagberg i col. 1983). L'RTT només afecta a dones i té una prevalença d'1/12.000 a 1/15.000 (Hagberg i col. 1983; Kerr & Stephenson, 1985; Kozinetz i col. 1993).

1.1 Formes clíniques de la malaltia. Criteris diagnòstics

Les característiques clíniques de l'RTT van ser definides per Hagberg i col. (1985). Es diferencien dues formes de la malaltia, la forma clàssica i les formes atípiques o variants. La forma clàssica de l'RTT es caracteritza per un període prenatal i perinatal aparentment normal de les pacients, que presenten un desenvolupament psicomotor normal durant els primers 6-18 mesos de vida i després inicien una regressió en les activitats adquirides. Presenten una disminució de l'activitat voluntària de les mans entre el sis mesos i els dos anys d'edat, associada temporalment a una disfunció de la comunicació i del contacte social. Perden el llenguatge expressiu adquirit i el llenguatge receptiu es deteriora, amb afectació del desenvolupament psicomotor. Una de les característiques d'aquesta síndrome és la presència de les estereotípies típiques de les mans, en forma de rentat de mans, recargolant-les, ensalivant-les, donant cops de mans i automatismes de fricció. Entre el primer i quart any del desenvolupament motor comencen a aparèixer anomalies en la deambulació (marxa apràxica), encara que hi ha pacients que no adquireixen mai la marxa. El perímetre cranial és normal al néixer, però entre els cinc mesos i els quatre anys de vida es manifesta una desacceleració del creixement cefàlic, que en la majoria de les pacients evoluciona cap a una microcefàlia adquirida. Tot aquest conjunt de símptomes que van apareixent durant els primers anys de vida de les pacients constitueixen els **criteris necessaris** de la malaltia (Taula 1) els quals permeten un diagnòstic clínic entre els dos i els cinc anys d'edat (Hagberg i col. 2002).

Existeixen, a més, uns **criteris de suport** diagnòstic (Taula 1) que apareixen en el transcurs de la malaltia. Consisteixen en la presència d'anomalies del ritme respiratori en l'estat de vigília: apnees periòdiques, hiperventilació intermitent, períodes de contenció de la respiració, emissió forçada d'aire i saliva, i la presència de distensió abdominal per deglució de grans quantitats d'aire. Es poden apreciar anomalies del to muscular amb atrofia de les masses musculars i/o distonies. La presència de trastorns vasomotors perifèrics amb peus petits, hipotròfics i freds, i la presència d'atrofies musculars distals es fan evidents al final de la primera dècada (Hagberg i col. 1983; Naidu i col. 1986). Algunes de les pacients poden presentar escoliosi i/o cifosi d'origen neurogen i retard en el creixement de la talla. El 50% de les pacients poden patir alguna mena de crisi epilèptica. Els estudis electroencefalogràfics (EEG) es caracteritzen per un enlentiment de la seva activitat base i patrons intermitents de ritmes lents (3-5Hz), amb aparició de descàrregues paroxístiques amb o sense crisis clíniques (Verma i col. 1986).

Cal afegir que existeixen també uns **criteris d'exclusió** (Taula 1) que permeten el diagnòstic diferencial amb altres malalties neurològiques que, en ocasions, presenten trets clínics comuns amb l'RTT, especialment en la fase de deteriorament.

Taula 1. Criteris diagnòstics per a l'RTT clàssica, establerts pel Consens del grup de recerca reunit a Baden-Baden, 2001 (Hagberg i col. 2002).

Criteris de diagnòstic per l'RTT clàssica.	
Criteris necessaris	<ul style="list-style-type: none"> • Període prenatal i perinatal aparentment normal • Desenvolupament psicomotor aparentment normal durant els primers sis mesos de vida • Perímetre cranial normal al néixer • Desacceleració del perímetre cranial entre els 5 mesos i 4 anys de vida • Disminució de l'activitat voluntària de les mans entre els 6 mesos i 5 anys d'edat, associada a disfunció de comunicació i rebuig social • Llenguatge expressiu i receptiu molt malmès amb afectació del sistema locomotor • Estereotípies manuals, rentat de mans, recargolant-les, ensalivant-les, donant cops de mans i automatismes de fricció • Anomalies en la deambulació o no adquisició de la marxa • Possibilitat d'un diagnòstic clínic entre els 2 i 5 anys d'edat
Criteris de suport	<ul style="list-style-type: none"> • Anomalies del ritme respiratori i apnees periòdiques en vigília, hiper-ventilació intermitent, períodes de contenció de la respiració emissió forçada d'aire i de saliva, distensió abdominal per deglució de grans quantitats d'aire • Anomalies a l'EEG: ritme lent en vigília i patrons intermitents de ritmes lents descàrregues paroxístiques amb o sense crisi clínica • Convulsions • Anomalies del to muscular amb atrofia de les masses musculars i/o distonies • Trastorns vasomotors perifèrics • Escoliosi/cifosi • Retard en el creixement (talla) • Peus petit, hipotròfics i freds • Anomalies en el patró del son del lactant, amb major quantitat de son diürn
Criteris d'exclusió	<ul style="list-style-type: none"> • Evidència d'un retard en el creixement uterí • Organomegàlia o altres trets de malaltia de dipòsit • Retinopatia o atrofia òptica • Presència d'un trastorn metabòlic o neurològic progressiu • Patologies neurològiques secundàries per infeccions greus o traumatismes cranials

La forma clàssica presenta quatre estadis en la seva evolució clínica (Hagberg & Witt-Engerstrom, 1986) (Fig. 1). En el primer, a partir dels sis mesos d'edat, s'aprecia una disminució de l'interès pel joc i l'entorn. Durant el segon estadi, que pot durar setmanes o mesos, es produeix una ràpida regressió amb pèrdua de l'activitat voluntària de les mans associada a una disfunció de la comunicació i un rebuig social amb manifestacions autis-

tes, deteriorament del llenguatge expressiu i receptiu, aparició de les estereotípies manuals, conductes automutilants, trastorns del son i anomalies en la deambulació. El tercer estadi és d'aparent estabilitat. S'evidencia un retard molt greu neurològic amb una millora en el contacte visual, poden presentar-se crisis epilèptiques, i es manifesten els trastorns de la deambulació i les anomalies respiratòries. El quart estadi s'inicia després dels deu anys de vida i pot durar dècades: s'instaura el deteriorament motor amb aparició d'escoliosi i de trastorns tròfics, i es posa de manifest el retard de creixement global (Holm i col. 1986; Haas i col. 1997; Motil i col. 1998). En aquesta última etapa millora el contacte visual i social, i les convulsions són menys greus (Hagberg & Witt-Engerstrom, 1986). Se sap que el 70% de les pacients RTT tenen una esperança de vida de 35 anys d'edat.



Figura 1. Fotografies d'una pacient amb RTT clàssica. D'esquerra a dreta, estadis segon, tercer i quart.

A més de la forma clàssica de l'RTT, existeixen les formes atípiques o variants (22% dels casos). Per definir aquestes variants s'han dissenyat uns criteris de classificació del fenotip, utilitzant uns criteris principals d'inclusió i de suport que ajudaran en el moment del diagnòstic clínic (Hagberg & Skjeldal, 1994). Dins les variants de l'RTT es diferencien les següents formes clíniques, des de les més greus a les més lleus:

- La **forma congènita** o d'inici precoç presenta retard psicomotor des del naixement, sense un període de normalitat. El seu desenvolupament psicomotor és sempre patològic i les poques adquisicions es perden. La gran majoria de pacients no adquireixen mai la deambulació. El diagnòstic sol ser difícil fins que no es defineix el fenotip clàssic de l'RTT.
- La **forma amb epilèpsia precoç** té una evolució molt severa. La seva presentació clínica es dona entre el segon i el vuitè mes de vida amb síndrome de West o bé amb epilèpsia parcial o generalitzada, rebel als fàrmacs antiepilèptics. El patró de l'EKG intercrític sempre és patològic.
- La **forma amb llenguatge conservat** correspon a pacients que utilitzen algunes paraules o frases curtes que poden ser propositives. Poden no arribar a perdre tot el llenguatge adquirit, o bé recuperar-lo al voltant de la pubertat. No arriben mai a desenvolupar un llenguatge oral normal, i la majoria d'elles mostren absència de joc espontani. En aquesta variant són poc freqüents les crisis epilèptiques i poden no presentar microcefàlia adquirida (Zapella i col. 1992). Normalment, el 40% són diagnosticades d'autisme, i un altre 40% de retard mental amb trets autístics.
- La **forma fruste** constitueix el 15% de les formes atípiques. En aquesta variant el període de regressió es produeix entre el primer i el tercer any de vida. Conserven parcial-

ment l'ús de les mans i les estereotípies són atípiques o absents, amb poca o nul·la detenció del creixement del perímetre cranial. El diagnòstic clínic definitiu de la forma fruste es sol realitzar a partir dels 10-13 anys d'edat.

- La **forma amb regressió tardana** inclou pacients amb retard mental inespecífic i amb un coeficient intel·lectual inferior a 50. Inicien la regressió entre els 10-15 anys d'edat i adquireixen el fenotip RTT després de la pubertat, entre els 16 i els 20 anys.

En ocasions és difícil definir la forma atípica de les pacients, especialment entre les últimes formes descrites, ja que els trets clínics es poden solapar i el diagnòstic depèn molt de l'edat de la pacient. En l'última reunió internacional de neuropediatres experts en RTT realitzada a Baden-Baden (Alemanya) el 2001, es van redefinir també els criteris diagnòstics de les variants (Taula 2).

Taula 2. Criteris diagnòstics revisats per a les formes atípiques o variants, establerts pel Consens del grup de recerca reunit a Baden-Baden, 2001 (Hagberg i col. 2002).

Criteris de diagnòstic per a les formes variants.	
Criteris d'inclusió	<ul style="list-style-type: none"> • Almenys tres dels sis criteris principals de la forma clàssica • Almenys sis dels onze criteris de suport de la forma clàssica
Criteris principals	<ul style="list-style-type: none"> • Absència o reducció de les habilitats manuals • Pèrdua del llenguatge/argot • Pèrdua de les habilitats per comunicar-se • Desacceleració del creixement cefàlic • Estereotípies manuals • Trastorn del desenvolupament seguint el fenotip de l'RTT
Criteris de suport	<ul style="list-style-type: none"> • Anomalies del ritme respiratori • Bruxisme • Escoliosi/cifosi • Amiotròfies de les extremitats inferiors • Peus freds i cianòtics • Aerofàgia • Deambulació anormal o absent • Trastorns del son • Gran tolerància al dolor • Crisis de riure o crits

1.2 Neuropatologia del cervell

Des de la descripció de la malaltia, se sap que l'RTT afecta el cervell. Estudis en el camp de la neuroimatge, la neurofisiologia i la neuropatologia han ajudat a definir diferències entre el cervell de les pacients i un cervell normal. Les afectades presenten una desacceleració del creixement cefàlic, i estudis *postmortem* han confirmat que els cervells de les pacients RTT són un 14-34% més petits que els d'individus control, sense que hi hagi evidències de pèrdua cel·lular (Jellinger & Seitelberger, 1986; Naidu i col. 1997) (Fig. 2). Les pacients amb RTT acostumen a

tenir una talla reduïda, però si es comparen els pesos dels seus òrgans amb els d'individus normals de la mateixa talla, el cervell és l'òrgan que amb diferència presenta una reducció més acusada (Armstrong D i col. 1999). El seu pes no supera 1 Kg (Armstrong D, 2001).

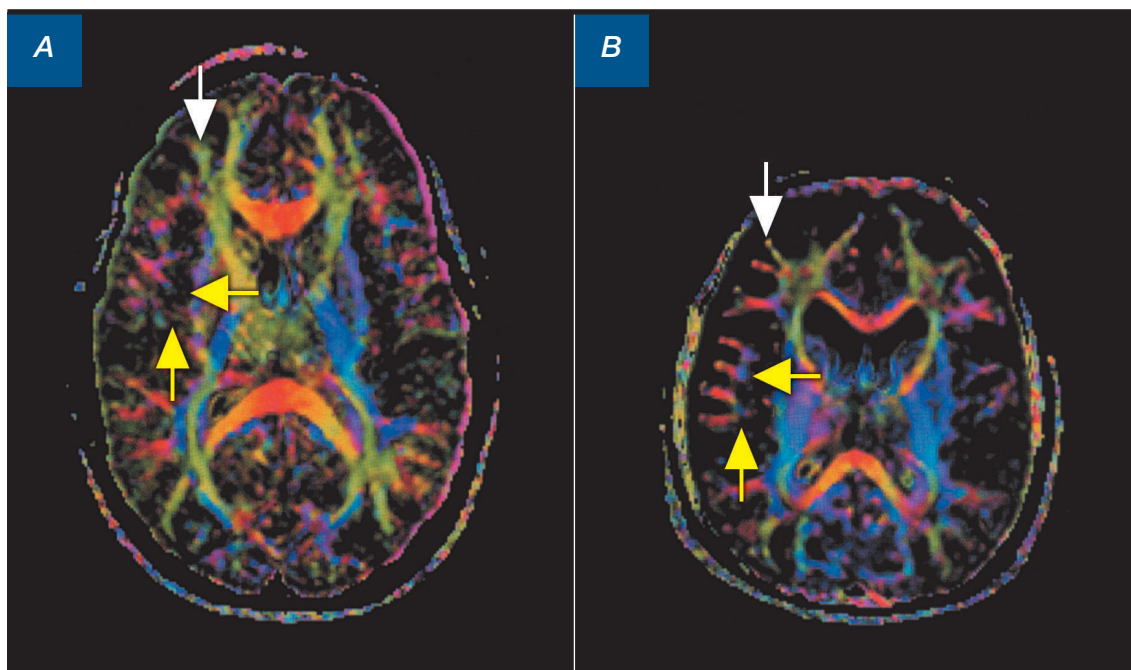


Figura 2: Tècnica DTI (diffusion tensor imaging) de talls axials, a nivell del gangli basal.

A: individu control; B: pacient RTT. Ambdós individus presenten la mateixa edat i sexe. Les fletxes blanques mostren l'orientació longitudinal de les fibres axonals frontals dorso-laterals (en verd). Les fletxes grogues indiquen l'orientació lateral de les fibres axonals frontals insular/posteriors (en vermell). En blau es mostren preferentment les fibres axonals en un pla dorso-ventral. (Naidu i col. 2001).

Els primers estudis neurofisiològics de la malaltia suggerien que l'RTT podia ser una malaltia neurodegenerativa, perquè hi havia una regressió del desenvolupament. No obstant, estudis neuropatològics posteriors van mostrar que no hi havia degeneració, sinó un arrest en el procés de maduració del sistema nerviós central que es produeix durant els primers 2-3 anys de vida. Aquest es tradueix en una falta d'arborització dendrítica i en una alteració profunda de la xarxa sinaptogènica en àrees concretes del cervell, sense afectar el desenvolupament de les cèl·lules glials. Les dendrites de les neurones piramidals del còrtex i de les regions subcorticals de les pacients són reduïdes en longitud i complexitat (Armstrong D, 1992; Armstrong D i col. 1995) i es presenten en menor quantitat (Belinchenko i col. 1994) i més densament empaquetades que en individus control (Bauman i col. 1995). Les regions del cervell particularment afectades són el còrtex motor, el nucli caudat i la substància blanca del còrtex temporal. La integració dels ganglis basals –directament implicats en la regulació de les funcions motores– amb el còrtex està també alterada degut a una falta de desenvolupament axonal (Armstrong D, 2001).

Aquestes alteracions neuropatològiques s'associen a canvis consistents a nivell molecular, com la reducció o absència de la proteïna associada a microtúbuls específica de dendrites MAP-2 (implicada en l'estabilitat del citoesquelet, i en el creixement i desenvolupament neural) i de la prostaglandina endoperoxidasa H sintasa-2 (enzim limitant en la biosíntesi de *prostanoids*, implicats en la neurogènesi, i marcador de neurones madures) (Whitty i col. 1993; Kaufmann i col. 1995; Kaufmann i col. 1996; Kaufmann i col. 1997; Matsuishi i col. 1997; Deguchi i col. 2000).

Les pacients RTT presenten també alteracions selectives en els nivells de neurotransmissors i factors tròfics, responsables del desenvolupament, creixement, estabilització i correcte funcionament dels circuits neurals (Armstrong D, 2001). La dopamina, neurotransmissor implicat en el control i la regulació del moviment, en l'expressió dels estats afectius i en la capacitat propositiva, està altament disminuïda en les neurones dopaminèrgiques de les pacients. S'observen nivells reduïts de serotonina la qual, a més d'intervenir en el control del son, de la ventilació i en la percepció del dolor, és un factor de regulació del desenvolupament cerebral abans d'adquirir la seva funció com a neurotransmissor en el cervell madur. Com a factor regulador, la serotonina regula tant el desenvolupament de les neurones serotoninèrgiques com el desenvolupament dels seus teixits diana (Whitaker-Azmitia, 2001). També la substància P, neuropèptid que estimula l'extensió de la neurita en cultius de neuroblastomes, mostra nivells baixos en líquid cefaloraquídi, cervell i medul·la. La substància P és un neuromodulador en neurones primàries, neurones sensibles i neurones dopaminèrgiques. Intervé en la regulació del sistema nerviós autònom en relació al sistema vasomotor i cardíac. Alteracions en els nivells de substància P en l'RTT s'associen als trastorns de la respiració i del son de les pacients, i es relacionen amb els peus freds, la regressió motora i l'atròfia muscular. La seva relació amb el sistema endocrí podria explicar també el retard de creixement de les afectades.

El que encara es desconeix és si aquestes alteracions moleculars són causa o bé conseqüència del desenvolupament anormal del cervell de les pacients.

Inicialment, l'RTT es va considerar una malaltia neurodegenerativa o una encefalopatia estàtica, ja que la majoria de les pacients passaven per un període de normalitat abans d'entrar en una etapa de regressió cognitiva. En l'actualitat és definida com una malaltia de les sinapsis, ja que el desenvolupament neuronal i l'organització de la xarxa sinaptogènica del cervell queden aturades. Aquest és un camp que està essent molt estudiat des de diverses disciplines. L'estudi dels processos anòmals en l'RTT servirà de model per aprofundir en el coneixement dels processos normals de desenvolupament del SN. ■

2. ASPECTES GENÈTICS

Les bases genètiques i el tipus d'herència de l'RTT han estat discutides durant dècades, des que la patologia va ser descrita per A. Rett (1966) i B. Hagberg (1983). No va ser fins l'octubre de 1999, quan es van identificar mutacions en el gen *MECP2* en pacients, que es va confirmar la hipòtesi que l'RTT és una malaltia dominant lligada al cromosoma X, deguda normalment a mutacions *de novo* (Amir i col. 1999) [RTT (MIM 312750) i MeCP2 (MIM 300005)].

Aquesta tesi es va començar quan el gen causant de l'RTT encara no s'havia identificat, pel que és convenient fer una breu introducció als treballs realitzats per diferents grups durant la cerca del gen responsable de la malaltia.

2.1 Mapatge del locus RTT

2.1.1 Models d'herència per a l'RTT

Es van proposar diferents models per explicar l'herència de l'RTT (Clark, 1996). La hipòtesi més comunament acceptada suposava una herència dominant lligada al cromosoma X, letal en hemizigosi, amb penetració incompleta i expressivitat variable. No obstant, es coneixia l'existència d'uns pocs casos familiars. La presència de portadores obligades sanes en algunes famílies s'explicaria, sota aquest model, per una inactivació totalment esbiaixada del cromosoma X portador de la mutació, mentre que la presència de mosaïcisme germinal en un dels progenitors explicaria altres casos familiars descrits. D'altra banda, estudis realitzats per diversos grups proporcionaven dades contradictòries sobre l'existència de biaix en el patró d'inactivació de l'X (XCI) de les mares portadores asimptomàtiques o de les diferents afectades dins la mateixa família (Miggeon i col. 1995; Camus i col. 1996; Webb i col. 1996; Schanen i col. 1997). És per això que es van proposar altres hipòtesis per poder explicar l'herència de la malaltia:

- Disomia uniparental del cromosoma X. Hipòtesi descrita per Benedetti i col. (1992), i rebutjada per Webb i col. (1993), ja que els estudis realitzats comprovaven l'herència biparental de totes les probands RTT analitzades.
- Interferència metabòlica dels individus heterozigots amb un locus del cromosoma X: segons aquest model, tant les dones homozigotes com els barons hemizigòtics serien no afectats (Johnson, 1980). La malaltia estaria produïda per la interferència metabòlica entre dos productes gènics dels dos cromosomes X. A causa del procés d'XCI, aquests productes estarien produïts en cèl·lules diferents, i aquesta hipòtesi només seria acceptada en cas que: 1) el producte gènic fos extracel·lular ó 2) el locus escapés del procés d'inactivació.
- Interferència metabòlica entre un locus lligat al cromosoma X i un locus supressor autosòmic.
- Interacció entre un locus autosòmic i un o més loci lligats al cromosoma X.
- Herència mitocondrial: s'havien observat patrons d'herència materna en algunes de les famílies RTT estudiades, i anomalies morfològiques i funcionals mitocondrials en algunes de les pacients (Coker & Melnik, 1991; Mak i col. 1993; Dotti i col. 1993), pel que no es descartava trobar una base genètica de la malaltia basada en mutacions en el DNA mitocondrial (mtDNA). Es va realitzar una cerca de mutacions en l'mtDNA en individus RTT i familiars, i el grup de Tang i col. (1997) va trobar mutacions en pacients i en les seves mares en el gen mitocondrial que codifica per 16S rRNA, però no en població control.

- Mutació dinàmica: variació de la hipòtesi d'herència dominant lligada al cromosoma X, on l'expansió patològica seria el resultat d'un procés mutacional en múltiples passos que culmina amb la inestabilitat d'un al·lel premutat de risc (Hofferbert i col. 1997). L'RTT presenta característiques comunes amb altres malalties causades per l'expansió inestable d'un microsatèl·lit: totes són malalties neurològiques o neurodegeneratives (síndrome del cromosoma X fràgil, distròfia miotònica, malaltia de Huntington, atàxia de Friedreich); la gravetat de la malaltia correlacionaria amb el grau d'expansió de la repetició i explicaria la variabilitat fenotípica de les pacients (Oberlé i col. 1991; Harley i col. 1992; The Huntington's Disease Collaborative Research Group, 1993; Monrós i col. 1997); en les malalties causades per repeticions d'un tram curt del triplet CAG que es tradueix en poliglutamines (malaltia de Huntington, atàxies cerebeloses dominants), l'expansió afecta només a àrees anatòmiques concretes del sistema nerviós, encara que el gen tingui una expressió ubíqua. Les malalties causades per mutació dinàmica tenen un o pocs cromosomes fundadors de la repetició inestable. Donant força aquesta hipòtesi, s'havia descrit l'existència d'un possible efecte fundador per a l'RTT en la població sueca (Akesson i col. 1992, 1995, 1996), on es descrivia un ancestre comú per a pacients RTT de diversos punts de Suècia. Tot i els estudis realitzats confirmant aquest suposat ancestre comú, es va replicar que la probabilitat d'un origen comú per a les pacients RTT és gairebé la mateixa que per a la resta d'individus de la població sueca. Després del descobriment del gen *MECP2* com a causant de l'RTT, Xiang i col. (2002) van estudiar l'origen de les mutacions en el gen *MECP2* en pacients RTT a Suècia, confirmant-se, en tots els casos, l'origen *de novo* de la mutació.

2.1.2 Identificació del gen causant de l'RTT

La base sobre la que la majoria de grups es van centrar per mapar el locus RTT va ser que la malaltia es donava gairebé exclusivament en dones. Es suposava que es tractava d'una malaltia dominant lligada a l'X, possiblement letal en hemizigosi (Hagberg i col. 1983; Cummings i col. 1998). El fet que l'RTT es presenta gairebé sempre de forma esporàdica va dificultar en gran manera la localització del locus lligat a la malaltia, ja que no podia aplicar-se anàlisi de lligament. Les úniques eines de que es disposava eren l'existència d'un reduït nombre de casos familiars, i la descripció d'alteracions cromosòmiques en algunes pacients.

Journel i col. (1990) van estudiar una pacient RTT amb una translocació t(X;22)(p11.22;p11), present també en la seva mare asimptomàtica i en la seva germana, aquesta última amb una alteració neurològica compatible amb la forma fruste de l'RTT. Zoghbi i col. (1990) van descriure una pacient amb una translocació balancejada t(X;3)(p22.1;q13.31). Encara que aquestes translocacions entre el cromosoma X i cromosomes autosòmics mapaven el locus RTT en el braç curt del cromosoma X, els punts de trencament del cromosoma X en les pacients no eren coincidents.

El primer progrés en el cartografiat fi del gen va provenir de l'estudi de dues famílies, una amb una mare asimptomàtica i dues filles afectes de diferents pares, i l'altre amb una parella neboda-tieta, afectes d'RTT (Anvret i col. 1990; Archidiacono i col. 1991; Ellison i col. 1992). Sota la hipòtesi que el gen estava lligat al cromosoma X, el locus de la malaltia s'havia de localitzar en una regió de l'X compartida per les pacients emparentades. L'anàlisi de segregació familiar de marcadors al llarg del cromosoma X en aquests i altres casos familiars, va permetre anar definint i acotant progressivament les regions de concordança-discrepança. Finalment, el locus va ser localitzat a Xq27.3-qter, una regió molt rica en gens (Schanen i col.1997; Schanen & Francke 1998; Siriani i col. 1998; Xiang i col. 1998).

Es va procedir a la cerca de mutacions en gens d'aquesta regió en pacients RTT. L'evidència

que l'RTT afecta principalment el desenvolupament del sistema nerviós (SN) (Armstrong D i col. 1998) i el manteniment d'una correcta connectivitat entre les neurones, particularment en el còrtex i els ganglis basals (Schanen & Francke 1998), va focalitzar els estudis mutacionals en gens expressats predominantment o exclusivament en el sistema nerviós central (SNC), en gens receptors de neurotransmissors i en gens que codifiquen per proteïnes neuronals específiques. A la taula 3 es mostren els gens que van ser exclosos per anàlisi mutacional.

Taula 3. Gens exclosos dins la regió candidata, com a causants de l'RTT.

Gens exclosos	Localització dels gens	Bibliografia
GdX (<i>ubiquitin-like protein</i>)	Xq28	Song i col. 1998
HCCS (<i>holocytochrome c-type synthetase</i>)	Xp22.3	Van der Veyver i col. 1998
GABRA3 (<i>g-aminobutyric acid type A receptor a3 subunit</i>) L1CAM (<i>L1 cell adhesion molecule</i>)	Xq28	Webb i col. 1998
GLUD2 (<i>glutaminate dehydrogenase-2</i>) GDI (<i>rab GDP-dissociation inhibitor</i>)	Xq22-q23	Wan i col. 1998
M6b (<i>glycoprotein M6B</i>)	Xp22.2	Narayanan i col. 1998
GRPR (<i>gastrin-releasin peptide receptor</i>)	Xp22.2-p22.13	Heidary i col. 1998
GLRA (<i>glycine receptor alpha 2 subunit</i>)	Xp22.2	Cummings i col. 1998
GABRE (<i>aminobutyric acid type A receptor</i>) GABRA3 (<i>g-aminobutyric acid type A receptor a3 subunit</i>)	Xq28	Xiang i col. 1998
5-HT2C (<i>serotonin receptor 2C</i>)	Xq23	Song i col. 1999
UBE1 (<i>human ubiquitin-activating enzyme E1</i>) UBE2I (<i>ubiquitin conjugating enzyme E2I, homologous to yeast UBC9</i>) GdX (<i>ubiquitin-like protein</i>) SOX3 (<i>SRY-related HMG-box gene 3</i>) GABRA3 (<i>g-aminobutyric acid type A receptor a3 subunit</i>) CDR2 (<i>cerebellar degeneration-related autoantigen 2</i>).	Xq28	Xiang i col. 2000

Finalment, seguint l'estratègia del candidat posicional, Amir i col. (1999) van identificar mutacions en el gen *MECP2* (*Methyl CpG-binding protein 2*) en diverses pacients amb RTT, tant en casos esporàdics com familiars. El gen havia estat prèviament mapat en la regió candidata i se'n coneixia la seqüència genòmica (D'Esposito i col. 1996; Vilain i col. 1996). Les mutacions produïen canvi de sentit en dominis conservats de la proteïna, o pèrdua de sentit. La troballa va ser immediatament corroborada per Wan i col. (1999).

2.2 El gen *MECP2*

El gen *MECP2* s'estén més de 76 Kb de DNA genòmic a Xq28. Es localitza entre el gen del receptor d'interleukina I associat a kinasa (*IRAK*) i el gen de *red opsin (RCP)*, una regió conservada i sintènica amb el cromosoma X de ratolí (D'Esposito i col. 1996; Quaderi i col. 1994; Reichwald i col. 2000). Tal i com es mostra en la figura 3, el gen *MECP2* està format per quatre exons, dels quals els exons 2, 3 i 4 contenen la regió codificant i ocupen 1755pb.

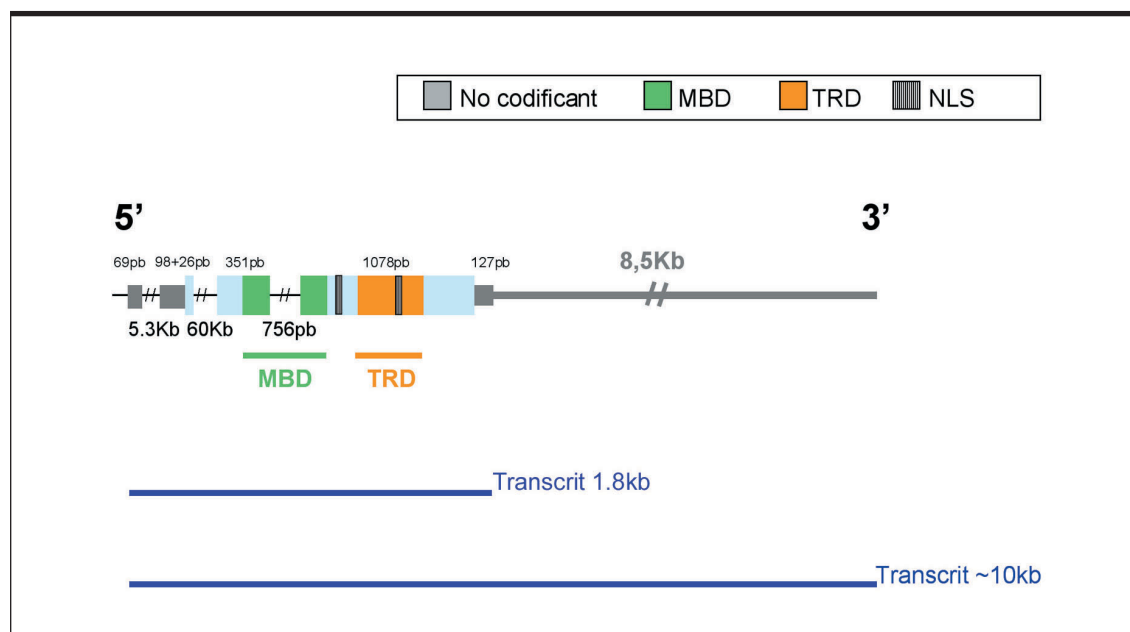


Figura 3. Esquema del gen *MECP2* i dels diferents transcrits produïts pels diferents senyals de poliadenilació a 3'UTR. (Modificat de Dragich i col. 2000).

El primer exó va ser descrit posteriorment a la identificació del gen *MECP2* per Reichwald i col. (2000). És un exó no definit encara que es troba dins la regió 5' no traduïda (5'UTR) del gen. Està immers en un illot CpG i forma part de la regió promotora del gen. Dins la regió promotora del gen *MECP2* hi ha diverses senyals de regulació de l'expressió gènica, llocs potencials d'unió a factors de transcripció (TF), i existeix evidència indirecta que SP1 regula l'expressió de *MECP2* (Kudo i col. 1993; Marin i col. 1997; Kudo, 1998; Reichwald i col. 2000). La regió 3' no traduïda (3'UTR) de l'exó 4 és inusualment llarga (8,5 Kb). Conté regions altament conservades al llarg de l'evolució, i diversos senyals de poliadenilació dels que deriven dos transcrits principals de 1,8 i ~10 Kb amb una vida mitjana molt similar, i un transcrit minoritari de 7,5 Kb. L'expressió de *MECP2* és ubiqua, però els nivells dels diferents transcrits són dependents de teixit i de fase del desenvolupament. (D'Esposito i col. 1996; Coy i col. 1999; Reichwald i col. 2000; Shahbazian i col. 2002a). La presència de tres transcrits que difereixen només en la longitud de l'extrem 3'UTR permet postular que donen lloc a un únic producte proteic, la proteïna MeCP2 (*Methyl CpG-binding protein 2*) (Coy i col. 1999). Estudis per Northern blot en diferents teixits adults humans i murins mostren una expressió més elevada del transcrit llarg en cervell, respecte del curt. No obstant, els dos transcrits s'expressen per igual en ronyó, òrgans del tracte intestinal, i òrgans reproductors, mentre que el transcrit curt és més abundant en múscul cardíac i esquelètic, teixit limfàtic, fetge, pulmó i placenta (Fig. 4a) (D'Esposito i col. 1996; Reichwald i col. 2000; Shahbazian i col. 2002a).

Estudis d'hibridació *in situ* en ratolí mostren nivells baixos d'expressió del transcrit llarg en el SN embrionari, però expressió elevada en neurones postnatsals, especialment en hipocamp i en bulb olfatori (Tate i col. 1996; Coy i col. 1999). Encara que es desconeix la seva funció diferencial, aquestes observacions fan suposar que el transcrit llarg podria jugar un paper important en la formació del SN durant les últimes fases del desenvolupament fetal i els primers mesos de vida postnatal (Tate i col. 1996).

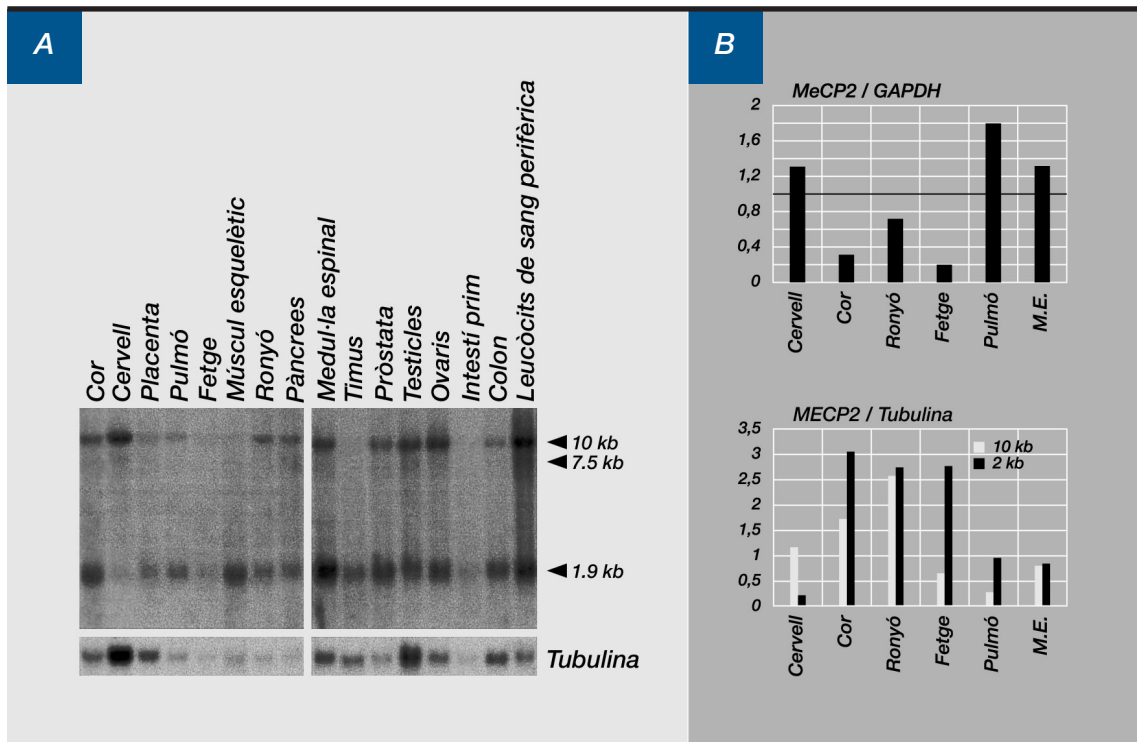


Figura 4. Expressió diferencial de MECP2. A. Northern blot de teixits humans hibridat amb la sonda MECP2, en el que s'observa que els dos transcrits estan diferentment expressats. B. Correlació entre els nivells de proteïna i RNA en els diferents teixits: l'histograma de l'esquerra mostra la ratio MeCP2/GAPDH; l'histograma de la dreta mostra la ratio MECP2/ α -tubulina (Shahbazian i col. 2002a).

Recentment, s'ha descrit que no hi ha correlació entre els nivells d'mRNA i els nivells de proteïna MeCP2 (Fig. 4b). Aquesta observació suggereix que la traducció podria estar regulada post-transcripcionalment per factors específics de teixit (Shahbazian i col. 2002a). La quantitat de proteïna MeCP2 és més elevada en cervell que en la resta de teixits i, en cervell, aquests nivells elevats es localitzen en neurones però no en cèl·lules glials (Akbarian i col. 2001; LaSalle i col. 2001; Shahbazian i col. 2002a). Els estudis realitzats per Shahbazian i col. (2002a) en humans mostren que l'expressió de MeCP2 augmenta amb la maduració neuronal i correlaciona amb l'ontogènia del SNC (Fig. 5). MeCP2 apareix abans en la medul·la espinal i el tronc cerebral que en aquelles estructures de formació posterior, com l'hipocamp i el còrtex cerebral. Dins el còrtex, l'expressió de MeCP2 segueix l'ordre de maduració neuronal: s'inicia en les neurones de Cajal-Reitzius, progressant posteriorment de les capes corticals profundes a les més superficials. Així, el nombre de neurones MeCP2-positives augmenta dramàticament al llarg de la gestació, i aquest augment en el còrtex continua des del naixement fins els 10 anys d'edat. Paral·lelament, s'ha observat una correlació negativa entre l'augment de l'edat i l'ús del transcrit llarg, per tècniques de RNA-FISH i RT-PCR en cervell humà (Balmer i col. 2002). Els autors postulen que el transcrit curt podria tenir una major eficiència traduccional, explicant l'augment dels nivells de proteïna observats per Shahbazian i col. (2002a).

Aquests estudis suggereixen que, tot i que el gen *MECP2* és un gen *housekeeping* que s'expressa de forma ubíqua, la proteïna MeCP2 podria tenir una funció específica o crítica en SNC.

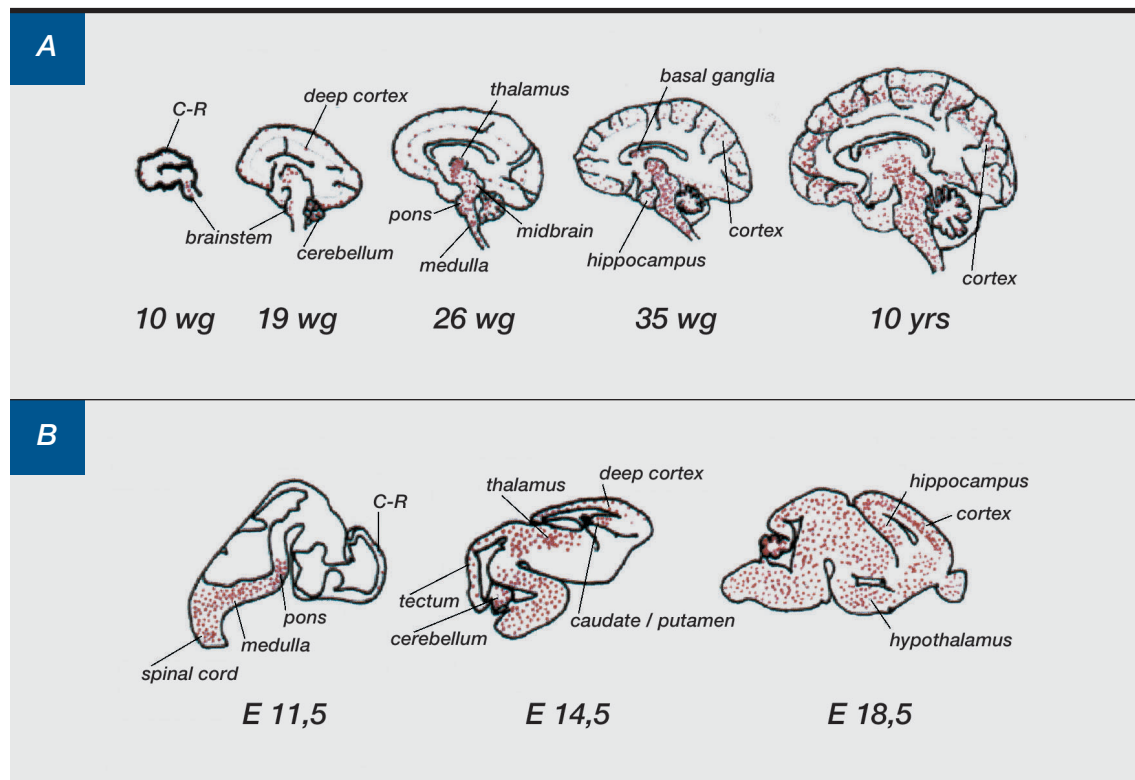


Figura 5. Representació esquemàtica de la distribució espacial i temporal de MeCP2 durant el desenvolupament en humans i ratolí. S'observa la distribució de MeCP2 en diferents rangs d'edat durant el desenvolupament del SNC (A) en humans i (B) en ratolí. La presència de MeCP2 està representada per punts vermells (Shahbazian i col. 2002a). wg: week gestation; yrs: years; E: embryonic day.

2.3 La proteïna MeCP2

MECP2 codifica per la proteïna *Methyl CpG-binding protein 2* (MeCP2) (Lewis i col. 1992). La proteïna té 486 aminoàcids i pertany a la família *Methyl CpG-Binding Proteins* (MBD) (Cross i col. 1997; Hendrich & Bird, 1998; Ballestar & Wolffe, 2001) (Fig. 6). MeCP2 conté un domini d'unió a DNA metilat (*Methyl Binding Domain*, MBD) (Nan i col. 1993), un domini de repressió transcripcional (*Transcription Repression Domain*, TRD) (Nan i col. 1998; Jones i col. 1998), dos senyals putatius de localització nuclear (*Nuclear Localization Signal*, NLS) (Nan i col. 1996; Kudo, 1998) i una regió localitzada vers l'extrem C-terminal a la que s'atribueixen funcions d'estabilització de la proteïna (Yusufzai & Wolffe, 2000) i d'associació al nucleosoma (Chandler i col. 1999). La proteïna MeCP2 és doncs un repressor de l'activitat transcripcional via metilació del DNA (Ng i col. 1999; Boeke i col. 2000; Ng i col. 2000; Prokhortchouk i col. 2001).

L'MBD consisteix en un tram de 85 aminoàcids en la porció N-terminal de la proteïna, amb capacitat d'unió a dinucleòtids CpG metilats (Nan i col. 1993). L'estructura en dissolució de l'MBD s'ha resolt per ressonància magnètica nuclear, i consisteix en quatre làmines β antiparal·leles i una volta amb una regió hidrofòbica que és el lloc on se suposa que el domini s'uneix a dinucleòtids metilats CpG, al solc major del DNA (Ohki i col. 1999; Wakefield i col. 1999) (Fig. 7).

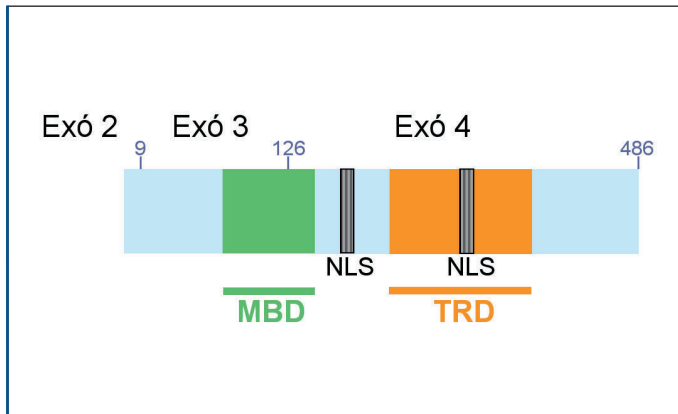


Figura 6. Diagrama de la proteïna MeCP2. Les caixes carbassa i verda indiquen els dominis d'unió a DNA (MBD) i repressor de la transcripció (TRD), respectivament. Les caixes ratllades indiquen els senyals de localització nuclear (NLS). En la part superior de la figura estan ubicats els exons que formen la proteïna i la numeració dels aminoàcids de MeCP2.

El TRD va ser identificat i caracteritzat per Nan i col (1997). El domini catalític va ser mapat entre els aminoàcids 207 i 310. Un cop unida a la regió promotora d'un gen, MeCP2 és capaç de silenciar la transcripció gènica per mitjà del domini TRD, que forma un complex co-repressor quan s'uneix a Sin3A i a les desacetilases d'histones 1 i 2 (HDAC1 i HDAC2) modificant l'estructura de la cromatina (Jones i col. 1998; Nan i col. 1998). A la figura 8 es mostra un esquema hipotètic de l'actuació de MeCP2, la seva unió a DNA i la via d'inactivació.

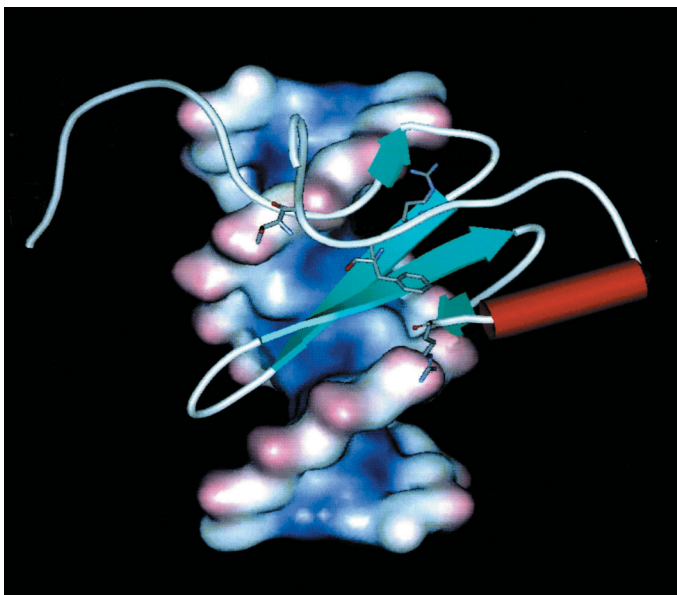


Figura 7. Model d'interacció entre el domini MBD de MeCP2 i el DNA. (Ballestar i col. 2001).

Més recentment s'ha observat que MeCP2 també s'uneix a altres co-repressors: la proto-oncoproteïna del virus Sloan-Kettering, c-Ski (*Sloan-Kettering Institute*) i el co-repressor del receptor nuclear, N-CoR (Kokura i col, 2001). Tant c-Ski com N-CoR són components del complex que formen les HDAC, però no sempre actuen conjuntament (Heinzel i col. 1997; Nomura i col. 1999). Si s'inhibeixen les HDAC mitjançant tricostatina A (TSA), MeCp2 no perd la seva activitat repressora, suggerint que la proteïna podria també inhibir la transcripció gènica independentment d'aquestes (Jones i col. 1998; Yu i col. 2000). Donant suport a aquests estudis, MeCP2 interactua directament amb la maquinària transcripcional basal mitjançant el Factor de Transcripció IIB (TFIIB), recolzant la hipòtesi que pot actuar sense la presència de les HDAC (Kaludov & Wolffe, 2000).

En resum, MeCP2 pot inhibir la transcripció gènica utilitzant almenys dues vies: una via dependent HDAC, on MeCP2 per mitjà la seva interacció amb el co-repressor Sin3A i amb les HDAC trasllada la cromatina a un estat inactiu, i una segona via independent d'HDAC on MeCP2 interaccionaria directament amb elements de la maquinària transcripcional basal, com el factor TFIIB, que competarien així amb el repressor Sin3A per unir-se al TRD (Hassig i col. 1997; Nagy i col. 1997).

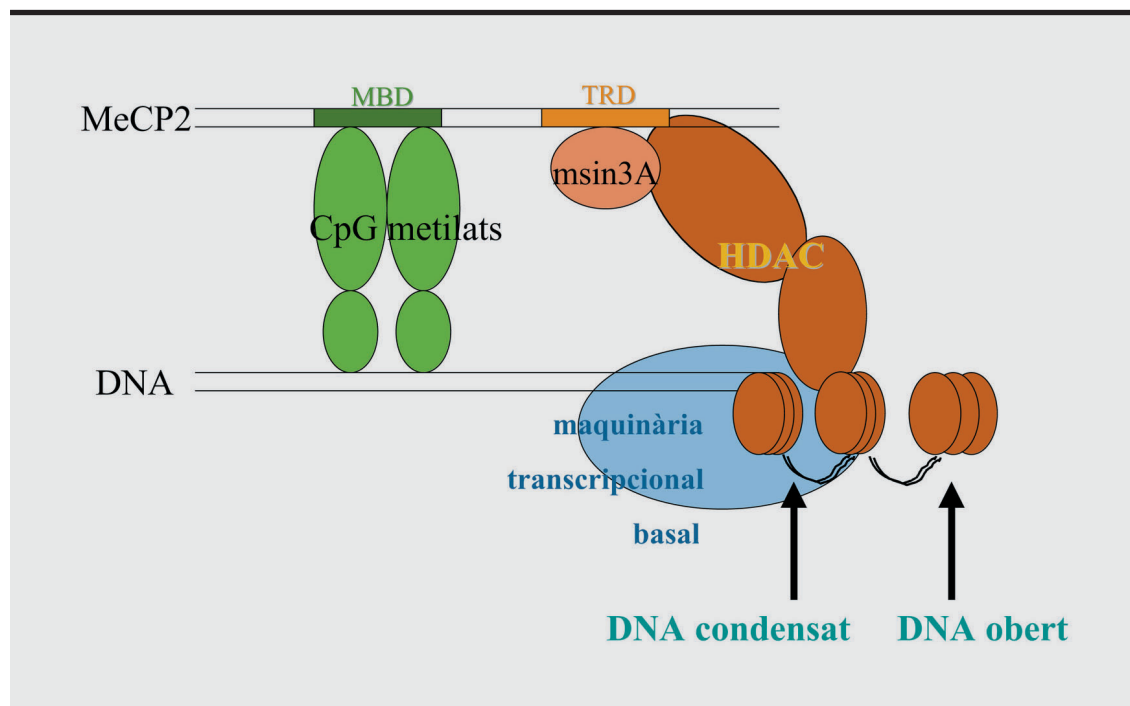


Figura 8. Esquema hipotètic de l'actuació de MeCP2.

Els dos senyals de localització nuclear (NLS) es troben situats entre els dominis MBD i TRD de la proteïna (entre els residus 173 i 193), i dins el domini catalític, entre els aminoàcids 255-271. Són necessaris per transportar la proteïna al nucli (Nan i col. 1996) (Fig. 6).

Existeix una quarta regió funcional, sense una funció definida, que es troba localitzat en els últims 63 aminoàcids de la proteïna. Chandler i col. (1999) proposen que facilita la unió de MeCP2 al nucli del nucleosoma, però altres estudis (Yusufzai & Wolffe, 2000) apunten a que aquest domini no augmentaria la unió al DNA metilat sinó que estaria implicat en l'estabilitat de la proteïna.

2.4 Família de proteïnes MBD i MeCP2

La proteïna MeCP2 és el membre arquetípic de la família de proteïnes MBD, d'unió a DNA metilat. A banda de MeCP2, han estat caracteritzades les proteïnes MBD1, MBD2, MBD3 i MBD4. Excepte MBD4, aquestes proteïnes acoblen la metilació del DNA a la repressió transcripcional. Les proteïnes MBD, MeCP2, MBD1, MBD2, MBD3 i MBD4 constitueixen una família de proteïnes de vertebrats que comparteixen el domini MBD. L'MBD actua en forma de monòmer i està format per uns 70 aminoàcids. La seqüència d'aminoàcids de l'MBD no té homologia amb cap de les seqüències que codifiquen per altres dominis d'unió a DNA descrits, suggerint que l'MBD constitueix un tipus específic de domini d'unió al DNA. L'estructura d'aquest domini, determinada per estudis de ressonància magnètica nuclear, consisteix en un únic motiu de sandvitx α/β amb voltes característiques: quatre làmines antiparal·leles β seguides d'una α -hèlix formen una falca, on dues de les làmines β més grans són les que interaccionen amb el solc major del DNA, on el grup metil es troba localitzat (Ballestar i col. 2001). Els residus conservats en tots els membres de la família MBD són els que corresponen a aquesta regió d'unió al DNA, i es troben representats en la figura 9.

L'alineament de les regions MBD de les proteïnes de la família MBD de ratolí mostra que es pot establir una divisió en dos subgrups: els MBD de les proteïnes MBD4 i MeCP2 són

més similars entre si que amb el grup de les proteïnes MBD1, MBD2 i MBD3 (Fig. 10). En totes les proteïnes, el domini MBD està localitzat en dos exons diferents. La permanència de l'intró que separa aquests dos exons suggereix un origen comú de les proteïnes MBD (Hendrich i col. 1999). La similitud de seqüència entre aquestes cinc proteïnes està limitada a l'MBD, ja que difereixen en la regió C-terminal.

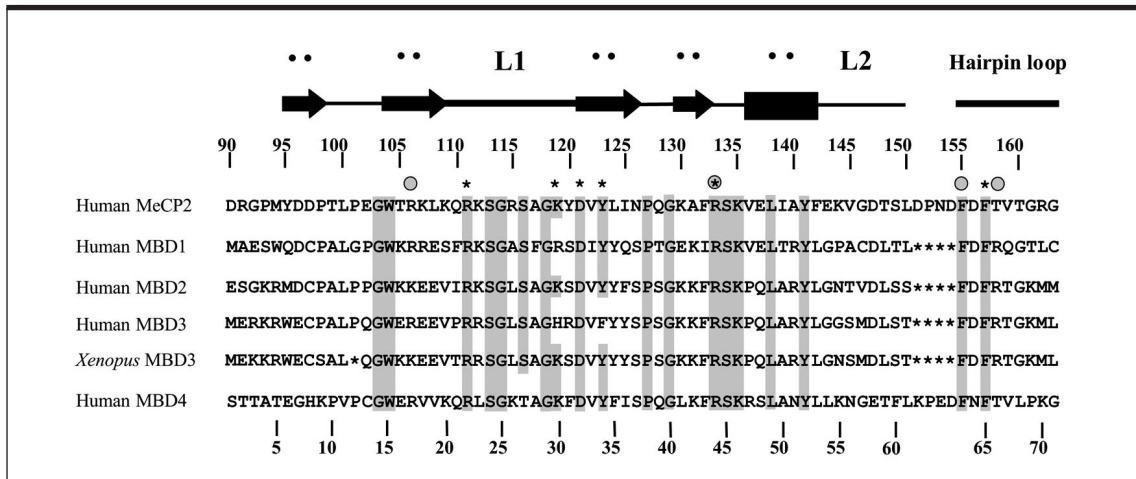


Figura 9. Alineament de les MBDs humanes per MeCP2, MBD1, MBD2, MBD3, de *Xenopus* sp per MBD3 i d'humà per MBD4. Les fletxes representen les làmines β , el rectangle representa l' α -hèlix. La numeració dels residus de MeCP2 està localitzada a la part superior de l'alineament, i la numeració de les MBDs a la part inferior. Els residus conservats estan ombrejats en gris i els residus més importants per a la unió al DNA estan marcats amb un asterisc. (Modificat de Ballestar i col. 2001).

Tot i així, el mecanisme repressor de la transcripció de les proteïnes MBD és similar: les MBDs formen part de complexos multiproteics amb activitat HDAC. Les MBDs dirigeixen aquests complexos cap a les regions enriquides en CpG metilats del genoma per reprimir la transcripció gènica. Totes les proteïnes MBD formen complexos amb HDAC excepte la MBD4, que forma complex amb la proteïna MLH1 i repara errors d'aparellament en el DNA (Hendrich i col. 1999). La proteïna MBD3 de mamífers sembla haver perdut la capa-

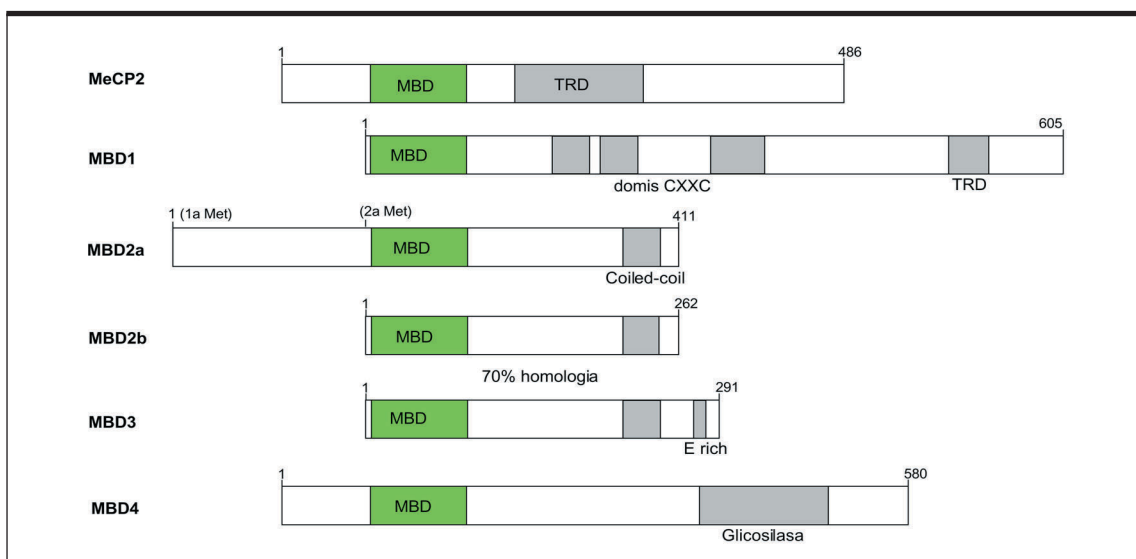


Figura 10. Comparació del membres de la família d'MBDs en humans. El domini MBD està representat en verd i en gris els dominis catalítics. (Modificat de Tatematsu i col. 2000).

citat de reconèixer DNA metilat, si es compara amb la seva homòloga de *Xenopus* (Wade, 2001). Tanmateix, el complex del qual forma part MBD3, NURD, és capaç de ser dirigit cap a DNA metilat mitjançant la interacció d'aquest complex amb la proteïna MBD2.

2.5 Espectre de mutacions del gen *MECP2* en l'RTT

Degut a la gran longitud de les regions no codificants, l'anàlisi de mutacions realitzat pels grups que treballen en l'RTT s'ha restringit a la seqüenciació de la regió codificant del gen *MECP2* (exons 2, 3 i 4) (Amir i col. 1999; Wan i col. 1999; Huppke i col. 2000; Cheadle i col. 2000; Bienvenu i col. 2000; Xiang i col. 2000; Amir i col. 2000; Hoffbuhr i col. 2001; Shahbazian i col. 2001). Els resultats obtinguts pels diferents grups mostren que aproximadament un 80% de les pacients amb RTT clàssica presenten mutacions en la regió codificant del gen *MECP2*. Les mutacions es produeixen *de novo* en més del 99% dels casos, i s'ha observat un origen patern de les mutacions en el 90% dels casos (Trappe i col. 2001). Les mutacions es troben preferentment localitzades en els dominis funcionals de la proteïna. Aproximadament el 40% de les mutacions trobades en el gen *MECP2* són recurrents i explicarien el 85% de pacients amb mutació. En el domini MBD es troben majoritàriament mutacions de canvi de sentit. En el domini TRD es localitzen preferentment mutacions de pèrdua de sentit i de canvi de la pauta de lectura, que causen PTC (*Premature Termination Codon*) (Fig. 11). En la regió 3' de l'exó 4 hi ha un punt calent de reordenaments, principalment delecions. Flanquejant aquesta regió es troben una sèrie de repeticions de pentanucleòtids directes o invertits que probablement són les responsables d'aquests reordenaments.

El percentatge de detecció de mutacions varia segons la forma clínica. Els resultats indiquen que les pacients amb la variant de llenguatge conservat presenten mutació en el gen *MECP2* en un 70% dels casos (De Bona i col. 2000; Yamashita i col. 2001; Zappella i col. 2001). Les variants amb forma congènita i forma fruste tenen un percentatge de pacients amb mutació del 50% (Buyse i col. 2000; Cheadle i col. 2000; Huppke i col. 2000; Bourdon i col. 2001; Inui i col. 2001; Nielsen i col. 2001).

Les tècniques emprades en la cerca de mutacions han estat diverses en els diferents grups

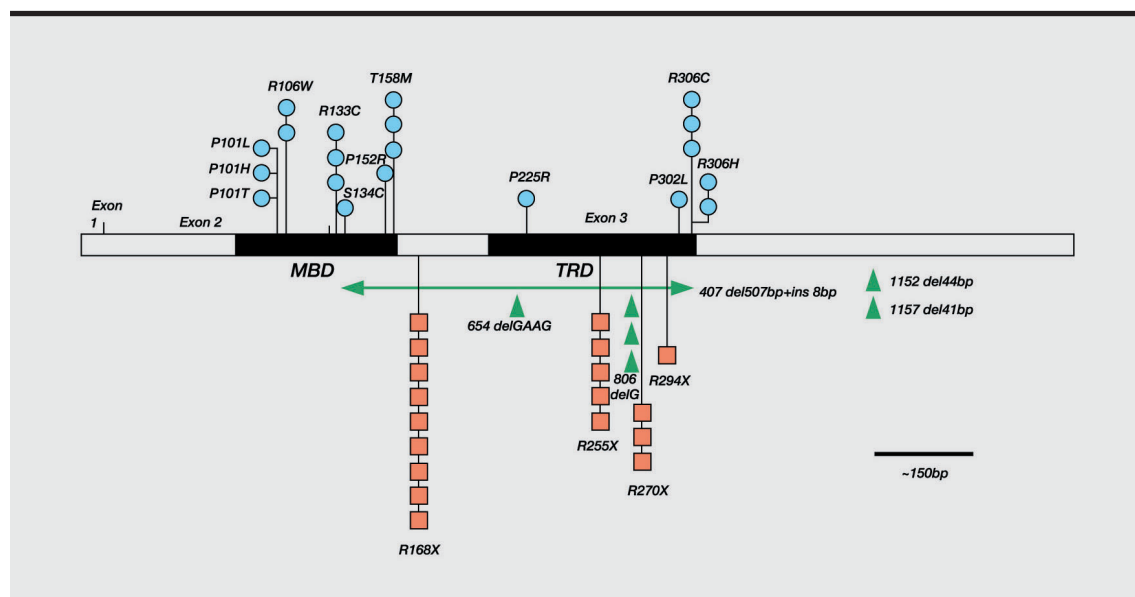


Figura 11. Espectre de mutacions de les pacients RTT en el gen *MECP2* (modificat de Cheadle i col. 2000).

[SSCP/HD, seqüenciació, DHPLC, Southern blot, PCRs llargues i FISH (amb sondes específiques per *MECP2*)], amb una eficiència de detecció similar: hi ha un 20% de pacients amb RTT clàssica, un 50% de pacients amb RTT atípica i un 70% de casos familiars sense mutació identificada en el gen *MECP2*.

2.6 Casos familiars a l'RTT

Els casos familiars en l'RTT són excepcionals, doncs representen menys de l'1% de tots els casos. En les famílies *MECP2* positives, són deguts a mares assintomàtiques portadores de la mutació –presumiblement a causa d'un patró d'inactivació de l'X absolutament esbiaixat– o bé a mosaïcisme germinal en un dels progenitors. No obstant, fins al moment s'han estudiat 30 famílies RTT i només el 30% (7/30) presenten mutacions en la regió codificant del gen *MECP2*. Tan sols en quatre famílies s'ha detectat la mateixa mutació en més d'un pacient RTT, (Fig. 12c), i en tres famílies s'ha identificat la mutació en el gen *MECP2* en una pacient però no en els seus familiars també afectes (Fig. 12, a).

Villard i col. (2001) proposa un nou model d'herència per als casos familiars d'RTT que seria vàlid també per als casos esporàdics sense mutació a *MECP2*, basat en l'estudi de quatre casos familiars sense mutació identificada. Les quatre mares presentaven un XCI totalment esbiaixat i sis de les vuit filles afectes també, essent sempre el cromosoma X actiu el d'origen patern, tot i que en almenys un cas, la mare era portadora obligada de la mutació causant de l'RTT (Fig. 12b). L'anàlisi de lligament de marcadors del cromosoma X mostrava una regió de concordança a Xp, entre els marcadors DXS1068 i DXS1024. Davant d'aquests resultats, el grup francès postula que la transmissió dels casos familiars d'RTT podria ser deguda a l'herència conjunta de

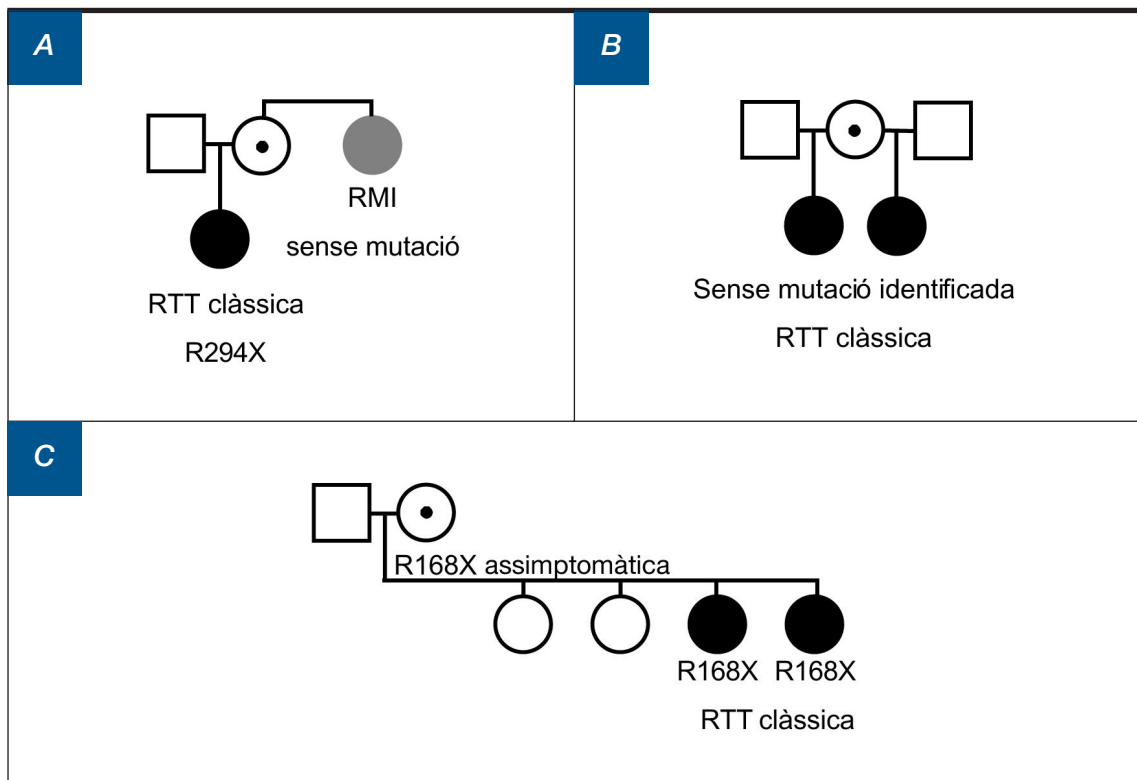


Figura 12. Casos familiars d'RTT descrits per Wan i col. 1999 (a), Villard i col. 2001 (b), i Cheadle i col. 2000 (c). RMI: Retard Mental Inespecífic.

dos trets: un segon locus RTT-2 que per mutació escapa a la inactivació, i un patró totalment esbiaixat d'XCI. El fenotip, fenocòpia de l'RTT lligat a *MECP2*, es produiria només quan el locus mutat que escapa a la inactivació es localitzés en el cromosoma X inactiu i en dones amb XCI a l'atzar (50:50), donant lloc a un excés de dosi del(s) producte(s) gènec(s) corresponent(s) i a l'expressió de la malaltia (Fig. 13). L'excés de dosi mimetitzaria la sobreexpressió gènica causada per les mutacions a *MECP2*. Els barons no podrien ser mai afectats i el model seria també aplicable a pacients esporàdics.

Aquesta hipòtesi seria compatible amb la hipòtesi de Thomas (1996), comprovada posteriorment per Trappe i col. (2001) per al gen *MECP2*, que postula que les mutacions en l'RTT s'originen preferentment via paterna. Una mutació de la línia germinal masculina, que permetés que el(s) gen(s) lligat(s) al cromosoma X escapés a l'XCI, podria estar relacionada tant amb casos esporàdics (si la mutació prové del pare) com amb casos familiars (si la mutació prové de l'avi), provocant la malaltia sense que *MECP2* estigui mutat. El grup de L. Villard està estudiant l'expressió de gens en la regió definida per les anàlisis de lligament, per detectar un altre locus RTT que els permetés comprovar la seva hipòtesi. Fins a la data no s'ha trobat cap altre gen relacionat amb l'RTT.

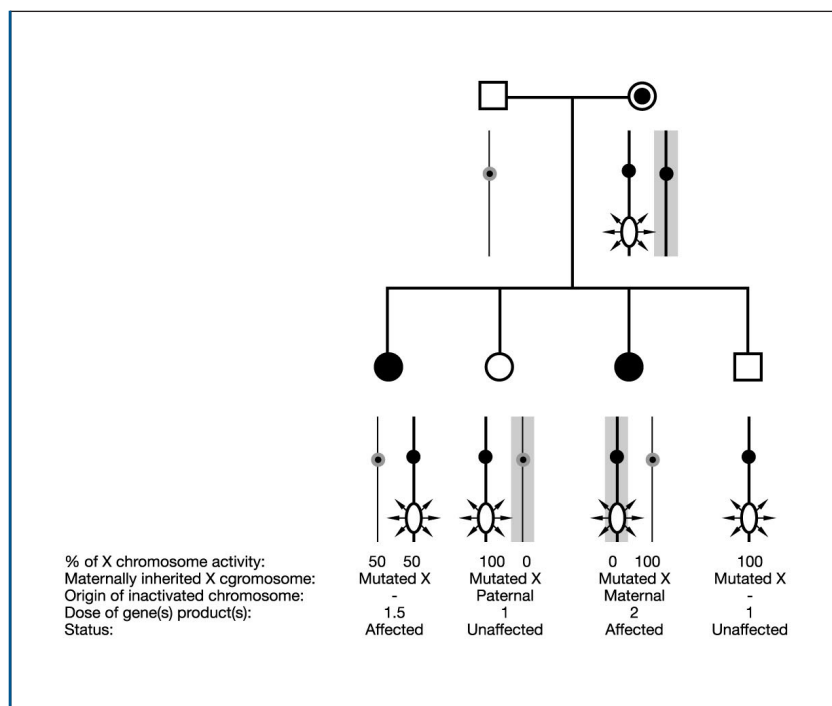


Figura 13.

Model proposat per a la transmissió familiar en l'RTT. Es presenta un pedigree hipotètic format pels progenitors i quatre fills que han rebut el cromosoma RTT-2. El locus RTT-2 que escapa a l'XCI està representat per un cercle amb fletxes. Els cromosomes amb un XCI totalment esbiaixat estan ombrejats en gris. A sota del pedigree, i per a cada fill, estan indicats el percentatge d'activitat de cada cromosoma, l'estat

del cromosoma heretat via materna, l'origen del cromosoma actiu, el número de dosis del producte gènec causant de la malaltia, i el fenotip de cada individu (Villard i col. 2001).

2.7 Inactivació del cromosoma X

El 1961, M. Lyon va proposar per primera vegada la hipòtesi que en cada cèl·lula de femella de mamífer, un dels dos cromosomes X era inactiu. El fenomen de lyonització o inactivació de l'X (XCI, *X Chromosome Inactivation*) es produeix a l'atzar i de forma independent en cada cèl·lula (Lyon, 1961; Lyon, 2002). Un cop establert, totes les cèl·lules filles derivades de la cèl·lula original amb un cromosoma X inactiu determinat, hereten el mateix patró d'inactivació (Gartler & Riggs, 1983).

El gen *MECP2* està sotmès al fenomen de lyonització (Adler i col. 1995; Gioto & Monk, 1998). El patró d'XCI podria explicar les diferents formes clíniques de pacients portadores de la mateixa mutació. Però en la majoria dels estudis realitzats en pacients RTT s'observa un patró d'XCI a l'atzar en limfòcits (es considera a l'atzar un XCI des de 50:50 a 20:80) en més del 80% de les pacients analitzades (Noumova i col. 1996). Aquestes dades són les esperades en població control, i no permeten explicar les diferències en el fenotip (Zoghi i col. 1990; Anvret & Wahlstrom, 1994; Camus i col. 1996; Schanen i col. 1997; Krepischi i col. 1998; Siranni i col. 1998; Amir i col. 2000; Kim & Cook, 2000; Lam i col. 2000; Auranen i col. 2001; Hoffbuhr i col. 2001; Nielsen i col. 2001). En canvi, en casos familiars la mare portadora asimptomàtica de la mateixa mutació que la filla afecta d'RTT presenta un patró d'XCI totalment esbiaixat (90% - 100%). L'absència de clínica s'explica sota la hipòtesi que el cromosoma actiu és el que no duu la mutació (Wan i col. 1999; Amir i col. 2000; Bienvenu i col. 2000; Hoffbuhr i col. 2001).

La manca de correlació observada entre la gravetat clínica de les pacients i l'XCI podria ser deguda a que els patrons d'XCI varien en els diferents tipus cel·lulars i també dins el mateix teixit. Gale i col. (1994) van estudiar el patró d'XCI en diferents teixits, i van observar que el patró d'XCI obtingut a partir de DNA de limfòcits no es corresponia amb el patró d'altres teixits. Shahbazian i col. (2002b) en canvi, van demostrar que tant en teixit sanguini com en mostres *postmortem* de cervell de les mateixes pacients RTT, el patró d'XCI era a l'atzar en els 10 casos informatius analitzats. Els autors hipotetitzen que les neurones podrien ser més sensibles a patrons d'XCI lleugerament esbiaixats, els quals es considerarien a l'atzar en qualsevol altre teixit.

Actualment, continua existint discrepància sobre la conveniència d'estudiar el patró d'XCI en limfòcits de sang perifèrica per analitzar el seu efecte modulador sobre el fenotip de les pacients. Així que l'estudi del patró d'XCI en teixit sanguini pot tenir només una utilitat orientativa en relació a la clínica.

2.8 Correlacions genotip-fenotip

La majoria dels estudis realitzats classifiquen les pacients segons el tipus de mutació trobada en el gen *MECP2* (mutacions de canvi de sentit o que causen proteïna truncada, PTC) o segons la localització de la mutació en el gen en relació als dominis funcionals, per a cada variable clínica a la que s'ha assignat una puntuació, on una puntuació més elevada indica major gravetat de la malaltia. Les freqüències de cada puntuació per cada variable clínica són comparades entre els dos tipus de mutació i/o entre les localitzacions de les mutacions. La gravetat de cada pacient s'obté mitjançant la suma de les puntuacions individuals assignades a cada variable, i es realitza un test estadístic per valorar la significació de les diferències clíniques observades entre les mutacions i/o entre la seva localització. Els estudis realitzats difereixen en els resultats obtinguts: alguns grups han trobat que existeix correlació entre les mutacions que causen un canvi de sentit i PTC, ja que les mutacions de canvi de sentit s'associen amb un fenotip més lleu d'RTT que les PTC (Cheadle i col. 2000; Huppke i col. 2002); però altres grups no han trobat cap correlació significativa (Wan i col. 1999; Vacca i col. 2001; Nielsen i col. 2001). Aquesta discordança de resultats pot ser deguda a la influència d'altres factors genètics com el patró d'XCI (Shahbazian & Zoghbi, 2002), variacions en els gens diana de *MECP2*, i a que cada grup d'estudi ha utilitzat un *check-list* clínic diferent, pel que no es poden obtenir resultats comparables.

2.9 RTT en barons

L'existència d'RTT en barons ha estat àmpliament discutida durant molt de temps. Després d'una àmplia revisió de publicacions dels últims 10 anys de nens amb fenotip compatible amb l'RTT, Jan i col. (1999) van discutir la possibilitat que criteris clínics menys restrictius permetrien incloure pacients barons dins l'espectre clínic de l'RTT. Aquests casos rettoïdes revisats per Jan i col (1999) van ser descrits abans de la identificació del gen causant de la malaltia, i fins a la data no hi ha publicacions al respecte que permetin extreure'n conclusions.

Els primers casos de barons amb mutació en el gen *MECP2* van ser descrits en famílies amb dones afectes d'RTT clàssica. Aquests casos familiars van permetre observar que la mateixa mutació causava diferent clínica segons el sexe: RTT clàssica en dones i encefalopatia congènita greu en barons, letal durant el primer any de vida (Wan i col. 1999; Villard i col. 2000; Hoffbuhr i col. 2001; Schanen, 2001; Geerdink i col. 2002; Zeev i col. 2002). Els afectats presenten encefalopatia associada a un retard profund en el desenvolupament, hipotonia, crisis epilèptiques no controlades, microcefàlia, atàxia, moviments repetitius de rentat de mans (semblants als observats en pacients RTT dones) i irregularitats respiratòries, principalment apnees, que els produeixen la mort prematura. Es va concloure, per tant, que les mutacions en *MECP2* que causen RTT en dones són letals en hemizigosi. No obstant, s'han descrit casos de nens amb fenotip RTT, amb mutació en el gen *MECP2* associada a altres modificacions, com mosaïcisme somàtic per a la mutació o bé una síndrome de Klinefelter (47,XXY) (Clayton-Smith i col. 2000; Villard i col. 2000; Hoffbuhr i col. 2001; Leonard i col. 2001; Schwartzman i col. 2001; Vorsanova i col. 2001; Topçu i col. 2002). Ambdues situacions mimetitzen el que succeeix en dones, on una còpia normal del gen en una fracció de cèl·lules permet la supervivència. Clayton-Smith (2000) van descriure un baró de sis anys d'edat, amb capacitat de parla fins als dos anys, marxa apràxica, hipotonia, episodis d'epilèpsia a l'edat de tres anys, que presentava una mutació somàtica. Un altre cas de mosaïcisme somàtic en un baró RTT va ser descrit per Topçu i col. (2002). El pacient presentava una clínica RTT clàssica. Els pacients descrits amb síndrome de Klinefelter i mutació en *MECP2* presenten esterotípies manuals, hipotonia, pèrdua d'habilitats adquirides, atàxia, apnees, després d'un període de normalitat (Leonard i col. 2001; Schwartzman i col. 2001; Vorsanova i col. 2001).

2.10 Heterogeneïtat fenotípica de les mutacions en *MECP2*

Les mutacions en el gen *MECP2* no només causen l'RTT. S'han descrit mutacions *de novo* en el gen en pacients d'ambdós sexes amb encefalopatia congènita progressiva o no progressiva, en pacients amb trastorns del desenvolupament diversos (Watson i col. 2001; Imaessaoudene i col. 2001; Turner i col. 2003; Moog i col. 2003) així com en casos esporàdics i familiars de retard mental inespecífic lligat al cromosoma X (RMX), associat o no a altres manifestacions clíniques (Meloni i col. 2000; Orrico i col. 2000; Couvert i col. 2001; Auranen i col. 2001; Yntema i col. 2002a; Yntema i col. 2002b; Moncla i col. 2002; Dotti i col. 2002; Klauck i col. 2002; Moog i col. 2003; Winnepenninckx i col. 2003). La relació entre el gen *MECP2* i aquest grup heterogeni de trastorns neurològics sembla mostrar que l'hemizigotitat per mutacions en el gen *MECP2* no es necessàriament letal.

La prevalença de l'RMX en barons està estimada en 1/300-1/600 (Herbest & Miller, 1980; Glass, 1991). Les mutacions trobades en pacients amb RMX són diferents a les descrites en pacients RTT, tal i com mostra la taula 4.

Taula 4. Mutacions en el gen MECP2 identificades en RMX.

Referència	N. de casos	Esporàdic / familiar	Retard mental	Mutació
Meloni i col. 2000	4	Familiar	Sever, amb espasticitat	Q406X
Orrico i col. 2000	6	Familiar	Moderat	A140V
Couvert i col. 2001	7	Familiar	Moderat a sever	E137G
Couvert i col. 2001	4	Familiar	Moderat	R167W
Couvert i col. 2001	1	Esporàdic	Moderat a sever	A140V
Couvert i col. 2001	1	Esporàdic	Moderat a sever	A140V
Couvert i col. 2001	1	Esporàdic	Moderat a sever	P399L
Couvert i col. 2001	1	Esporàdic	Moderat a sever	R453Q
Auranen i col. 2001	1	Esporàdic	Sever	1364-1365insC
Yntema i col. 2002a	4	Familiar	Moderat	1161del240 (en pauta)
Moncla i col. 2002	6	Familiar	Moderat	S359P
Dotti i col. 2002	4	Familiar	Sever	A140V
Yntema i col. 2002b	2	Familiar	Moderat	T196S
Yntema i col. 2002b	3	Familiar	Moderat	T196S
Yntema i col. 2002b	1	Familiar?	Borderline	T196S
Yntema i col. 2002b	2	Familiar	Moderat	E294K
Yntema i col. 2002b	1	Esporàdic	Moderat	1415delA
Yntema i col. 2002b	2	Familiar	Moderat a sever	P480S
Klauck i col. 2002	6	Familiar	Moderat a sever, sindròmic amb psicosi	A140V
Moog i col. 2003	1	Esporàdic	Sever	P225L
Winnepeninckx i col. 2003	5	Familiar	Moderat a sever, sindròmic	A140V

El canvi més recurrent trobat en casos d'RMX és A140V, i és la mutació més freqüent en barons en el gen *MECP2*. L'elevat percentatge de mutacions trobat en pacients amb retard mental va suggerir en un principi que *MECP2* podria ser responsable de l'RMX amb una freqüència similar a la trobada per a la síndrome del cromosoma X fràgil (Couvert i col. 2001; Dotti i col. 2002), encara que estudis posteriors han descrit freqüències molt més baixes (Yntema 2002*b*). No obstant, la majoria són mutacions de canvi de sentit en residus no conservats del gen. D'altres causen petites delecions en l'extrem C-terminal. Per aquest motiu la discriminació entre mutació causant de la malaltia i polimorfisme de baixa freqüència no és òbvia si no es realitzen estudis funcionals. La mutació A140V n'és un clar exemple: s'ha trobat en barons amb diferents graus de RM, associat o no a altres característiques clíniques com psicosi, trets autístics, retard en el desenvolupament motor, tremolors, dismorfies, ginecomàstia, hipogonadisme, macroorquidisme, obesitat, etc. Les dones portadores en el casos familiars descrits poden estar afectades de RM lleuger, o bé ser asimptomàtiques. Donada la seva elevada freqüència, Kudo i cols. (2002) van realitzar estudis funcionals del canvi A140V. La proteïna mutada mostra la mateixa capacitat d'unió al DNA metilat que la *wt* i mantén la seva activitat repressora en promotors metilats. No obstant, la mutació augmenta de forma considerable l'afinitat d'unió de la proteïna al DNA no metilat. Els autors conclouen que, encara que els seus resultats no permeten discernir entre mutació i polimorfisme, l'efecte repressor del canvi sobre gens no metilats podria provocar un perfil anòmal d'expressió gènica i resultar patogènica.

D'altra banda, donada la similitud clínica entre l'RTT i la síndrome d'Angelman (AS), s'han realitzat estudis del gen *MECP2* en pacients diagnosticats clínicament d'AS però sense alteracions en el patró de metilació a 15q11-q13. S'han detectat mutacions *de novo* a *MECP2* en un percentatge relativament elevat de pacients AS en diferents sèries analitzades: 5/47 dels pacients de l'estudi de Watson i col. (2001), 6/78 dels pacients analitzats per Imassaoudene i col. (2001), i 3/38 dels pacients estudiats per Turner i col. (2003) presenten mutacions en el gen *MECP2*. En els tres estudis, el 8% dels pacients referits com a AS presenten mutacions típiques de l'RTT, il·lustrant la dificultat del diagnòstic diferencial entre ambdues patologies, especialment en les primeres fases de la malaltia i/o en els casos clínicament atípics (Laan & Vein, 2002). No obstant, les pacients amb fenotip AS i mutació en el gen *MECP2* dels estudis realitzats per Watson i col. (2001) i Turner i col. (2003), no presenten una clínica compatible amb RTT, pel que es planteja si s'hauria d'analitzar de forma rutinària el gen *MECP2* en pacients AS amb estudi molecular realitzat en la regió 15q11-q13 negatiu.

2.11 MeCP2 en SNC

Des de la descripció del gen *MECP2* com a causant de l'RTT, s'ha plantejat la qüestió de com un repressor transcripcional d'expressió ubiqua pot donar lloc a una patologia quasi exclusivament neurològica.

L'observació que existeixen nivells d'expressió de MeCP2 més elevats en SNC que en altres teixits, tant en humans com en ratolí (LaSalle i col. 2001; Shahbazian i col. 2002*a*) permet suposar que en teixits fora del SNC la funció de MeCP2 podria ser suplida per altres represors transcripcionals amb funció redundat, de manera que MeCP2 seria prescindible (Guy i col. 2001). En neurones, en canvi, hi hauria un mecanisme repressor de la transcripció que faria aquest teixit més vulnerable a la disfunció de MeCP2. Seguint aquesta hipòtesi, es van realitzar estudis per intentar identificar el suposat repressor transcripcional, sense obtenir resultats concloents (veure més endavant, Models animals, pàg. 29). Un estudi

recent de Roloff i col. (2003), no obstant, mostra noves vies de repressió transcripcional en proteïnes amb MBD que no tenen necessitat d'unir-se a DNA, com MBD3 i SETDB1. Actuen mitjançant la interacció proteïna-proteïna a través del domini MBD. L'estudi d'aquestes proteïnes resulta de gran interès en l'RTT, ja que podrien realitzar una tasca de compensació de funció de MeCP2 sense requerir la propietat d'unió al DNA.

En l'apartat 1.2 (pàg. 8) de la Introducció s'ha comentat que actualment l'RTT es considera una malaltia de sinapsi. La recent publicació d'Aber i col. (2003) sembla donar suport a aquesta hipòtesi. L'estudi de la compartimentalització cel·lular i subcel·lular de MeCP2 en cervell mostra que la proteïna es localitza en el nucli neuronal, però també en la regió postsinàptica, on no hi ha traces dels altres components que formen el complex repressor, Sin3A i HDCA. Hi ha altres TFs descrits, també relacionats amb la regulació neuronal, localitzats a nivell de sinapsi. Un exemple és c-Fos (Paratcha i col. 2000).

Altres estudis suggereixen, a més, que la proteïna MeCP2 pot estar implicada en la regulació de gens amb *imprinting*, unint-se selectivament a l'al·lel metil·lat (Gregory i col. 2001). La participació de MeCP2 en la regulació de gens amb *imprinting* resulta de gran interès, donat que molts d'ells estan implicats en el desenvolupament neurològic i del comportament. Un exemple és el gen *UBE3A*, la inactivació del qual causa l'AS, malaltia molt relacionada amb l'RTT. ■

3. MODELS ANIMALS

El gen *Mecp2* de ratolí va ser mapat entre els gens *L1cam* i *Rsvp* en la regió central del Cromosoma X murí per Quaderi i col. (1996), una regió sintènica conservada i que correspon a la regió Xq28 humana. Tant el gen *MECP2* humà com el murí estan sotmesos al fenomen d'XCI (Adler i col. 1995; D'Esposito i col. 1996). Tate i col. (1996) van demostrar que MeCP2 és dispensable en cèl·lules mare embrionàries (ES) de ratolí, ja que la deleció del gen (*Mecp2-null*) no tenia efectes notables en la supervivència i proliferació d'aquestes cèl·lules in vitro. Aquest fet va permetre la construcció de ratolins quimèrics com a model per l'RTT, ja que les pacients amb RTT són també un mosaic somàtic de cèl·lules deficientes en MeCP2, degut a la inactivació del cromosoma X. Es va observar que, encara que les cèl·lules en cultiu eren viables, els embrions quimeres amb un alt nivell de contribució de cèl·lules ES mutades no eren capaços de formar gàstrula i morien entre els 8,5 i 12 dies de gestació. D'aquests resultats es va deduir que MeCP2 és essencial a partir del moment en que s'inicia la diferenciació cel·lular. Aquests ratolins quimera no proporcionaven informació sobre la funció de MeCP2 *in vivo* al llarg del desenvolupament de l'individu. El gener de 2001 van sortir publicats dos treballs realitzats en paral·lel per Chen i col. i Guy i col. Ambdós grups van obtenir ratolins transgènics viables utilitzant el sistema de recombinació *Cre-loxP*, ens els que la mutació s'expressava de forma específica en l'espai i en el temps. El primer grup va introduir una còpia de *Mecp2* amb l'exó 3 deletionat, i el segon grup una còpia de *Mecp2* sense els exons 3 i 4. Tots dos grups van obtenir ratolins (tant femelles homozigòtiques *Mecp2-/-*, com mascles hemizigòtics *Mecp2-/-y*) amb una clínica molt semblant a la de l'RTT: tremolors, cos molt petit, decreixement cefàlic, hipoactivitat, amb les extremitats agafades, respiració irregular i la mort entre les setmanes 6-10 (taula 5). La deleció específica de la còpia de *Mecp2* realitzada només en el cervell (utilitzant l'al·lel condicional *Nestin-Cre; Mecp2lox*) mimetitzava la pèrdua de *Mecp2* en línia germinal, donant el mateix fenotip que el ratolí *Mecp2-null* (Chen i col. 2001; Guy i col. 2001). Aquests resultats indicarien que *Mecp2* és necessària per a la correcta funció del SNC (Guy i col. 2001) mentre que en la resta de teixits la seva funció podria ser compensada per una altra proteïna repressora, possiblement alguna MBD. *Mbd2* va ser descartada per mitjà de la construcció d'un doble mutant *Mecp2-Mbd2* (Guy i col. 2001). Chen i col. (2001) van demostrar que MeCP2 no només és important per al desenvolupament neuronal sinó també en neurones postmitòtiques, ja que el fenotip murí obtingut quan es deletiona *Mecp2* només en neurones postmitòtiques és menys sever que en els transgènics *Mecp2-null* i té una presentació més tardana.

Degut a la seva mort prematura, els ratolins mascles *Mecp2-null* podrien representar la forma més severa de la malaltia, trobada en els barons descrits en els casos familiars d'RTT causats per mutacions en el gen *MECP2*. El 2002, el grup dirigit per H. Zoghbi va construir un ratolí transgènic (*Mecp2+/-*) amb un fenotip que s'assembla molt a la forma clàssica de l'RTT. El ratolí transgènic tenia deletionat l'extrem C-terminal de *MECP2* a partir del residu 308, de manera que els dominis funcionals de la proteïna (MBD, TRD i NLS) restaven intactes. El ratolí transgènic presenta un fenotip menys sever que els transgènics *Mecp2-null*, tal i com indica la taula 5. Aquests ratolins tenen un nivells d'histona acetilada H3 en cervell més elevats del que prèviament s'esperava, suggerint que *Mecp2* pot utilitzar H3 com a substrat d'unió al complex co-repressor (Shahbazian i col. 2002c).

Taula 5. Trets fenotípics dels ratolins transgènics deficients per *Mecp2* (Shahbazian i col. 2002c).

Característiques	Al·lel nul (sense els exons 3-4)	Al·lel hipomòrfic (sense regió C-ter)
Edat inici simptomatologia	5 setmanes	6 setmanes
Talla corporal i cefàlica	Disminuïda	
Moviments involuntaris	Tremolors	Tremolors
Epilèpsia		Present
Funció motora		Disminuïda
Control motor	Extremitats agafades	Estereotípies de les extremitat davanteres
Locomoció	Hipoactivitat	Hipoactivitat
Respiració	Irregular	
Curvatura espinal		Cifosi
Temps de vida	6-10 setmanes	
Interacció social		Ansietat i interacció social anòmala

3.1 Teràpia

De tots els resultats presentats es conclou que és encara molt aviat per pensar en una teràpia per a l'RTT. Encara es desconeixen els gens diana de *MECP2*, la desregulació dels quals causa la patogènesi de l'RTT. No obstant, és un camp d'intensa investigació actual. El coneixement molecular dels events de cadascuna de les etapes de la malaltia permetrà identificar els gens involucrats en el desenvolupament del SNC, la regulació de la funció motora, la dels moviments involuntaris, l'epilèpsia i l'ansietat. ■