

Anàlisi molecular de la mucopolisacaridosi I, la mucopolisacaridosi II i la leucodistròfia metacromàtica en els pacients espanyols. Utilitat diagnòstica i correlació genotip-fenotip

Laura Gort i Mas

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

Universitat de Barcelona

Departament de Genètica

Anàlisi molecular de la mucopolisacaridosi I, la
mucopolisacaridosi II i la leucodistròfia
metacromàtica en els pacients espanyols. Utilitat
diagnòstica i correlació genotip-fenotip

Laura Gort i Mas

2000

Anàlisi molecular de la mucopolisacaridosi I, la
mucopolisacaridosi II i la leucodistròfia
metacromàtica en els pacients espanyols. Utilitat
diagnòstica i correlació genotip-fenotip

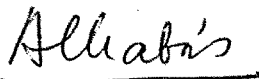
Memòria presentada per

Laura Gort i Mas

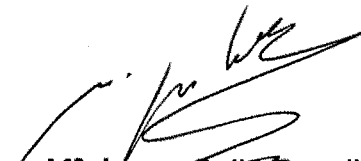
per optar al grau de

Doctor en Ciències Biològiques

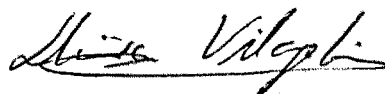
Tesi realitzada sota la direcció de
la Dra. Amparo Chabás i Bergón i la Dra. M^a Josep Coll i Rosell
al Departament d'Errors Congènits del Metabolisme
de l'Institut de Bioquímica Clínica
Corporació Sanitària
Programa de Genètica (Bienni 1995-1997)
Tutora: Dra. Lluïsa Vilageliu i Arqués



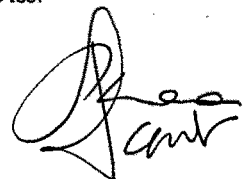
Amparo Chabás i Bergón
Directora de tesi



M^a Josep Coll i Rosell
Directora de tesi



Lluïsa Vilageliu i Arqués
Tutora de tesi



Laura Gort i Mas
La interessada

Barcelona, febrer del 2000

A en Nazari

Als meus pares

ÍNDIX

Pròleg	1
Agraïments	3
Presentació	5
Abreviatures	7
Introducció	9
1. Malalties lisosòmiques	11
1.1. Característiques generals.....	11
1.2. El lisosoma.....	13
1.3. Les hidrolases lisosòmiques.....	14
2. Les Mucopolisacaridosis	17
2.1. Característiques generals.....	17
2.2. Els glucosaminoglicans.....	17
2.3. Clínica.....	18
2.4. Herència.....	18
2.5. Diagnòstic bioquímic.....	18
2.6. Diagnòstic prenatal.....	19
2.7. Diagnòstic de portadors.....	19
2.8. Incidència.....	20
2.9. Teràpia.....	22
2.9.1. Primers intents.....	22
2.9.2. Trasplantament de moll d'os.....	23
2.9.3. Teràpia gènica.....	25
3. La malaltia de Hurler/Scheie	26
3.1. Descripció.....	26
3.2. Clínica.....	26
3.2.1. Forma severa o Hurler.....	27
3.2.2. Forma intermèdia o Hurler-Scheie.....	27
3.2.3. Forma lleu o Scheie.....	28
3.3. L' α -L-iduronidasa.....	28
3.4. El gen de l' α -L-iduronidasa (<i>IDUA</i>).....	32
3.4.1. Localització.....	32
3.4.2. Estructura del gen.....	32
3.5. Variants de seqüència no patogèniques descrites al gen <i>IDUA</i>	33
3.6. Mutacions descrites al gen <i>IDUA</i>	34

3.6.1. La mutació W402X.....	34
3.6.2. Les mutacions Q70X i P533R.....	35
3.6.3. Les mutacions R89Q i IVS5-7g→a.....	37
3.6.4. Altres mutacions.....	39
3.6.5. Freqüència de les mutacions en diferents poblacions: Existència d'una genoclina?...	39
3.7. Pseudo-deficiència de l'α-L-iduronidasa.....	40
3.8. Correlació genotip-fenotip.....	41
3.9. Efecte dels polimorfismes sobre el fenotip.....	42
3.10. Teràpia.....	43
3.10.1. Trasplantament de moll d'os.....	43
3.10.2. Teràpia gènica.....	44
3.10.3. Teràpia de substitució enzimàtica.....	45
3.11. Models animals.....	45
4. La malaltia de Hunter.....	47
4.1. Descripció.....	47
4.2. Clínica.....	47
4.2.1. Forma severa.....	47
4.2.2. Forma lleu.....	48
4.2.3. Heterogeneïtat clínica.....	48
4.3. La iduronat-2-sulfatasa.....	49
4.4. El gen de la iduronat-2-sulfatasa (<i>IDS</i>).....	50
4.4.1. Localització.....	50
4.4.2. Estructura del gen.....	50
4.4.3. Llocs catalítics de la proteïna.....	51
4.5. Mutacions descrites al gen <i>IDS</i>	51
4.5.1. Grans delecions o reordenaments.....	51
4.5.2. Mutacions puntuals.....	52
4.5.2.1. Mutacions de canvi de sentit (<i>missense</i>).....	52
4.5.2.2. Mutacions sense sentit (<i>nonsense</i>).....	55
4.5.2.3. Petites insercions i delecions.....	56
4.5.2.4. Mutacions d' <i>splicing</i>	58
4.6. Distribució de les mutacions puntuals en la zona codificant de l' <i>IDS</i>	59
4.7. Polimorfismes descrits en zona codificant del gen <i>IDS</i>	60
4.8. El pseudogèn de la iduronat-2-sulfatasa (<i>IDS-2</i>).....	60
4.9. Mutacions relacionades amb el pseudogèn.....	60
4.10. Heterogeneïtat genètica.....	63
4.11. Correlació genotip-fenotip.....	63
4.12. Origen familiar de les mutacions.....	64
4.13. Diagnòstic de portadores i diagnòstic prenatal.....	64
4.14. Dones amb la malaltia de Hunter.....	64

4.15. Selecció positiva per l'al·lel mutat?.....	65
4.16. Teràpia.....	66
4.16.1. Trasplantament de moll d'os.....	66
4.16.2. Teràpia gènica.....	66
4.17. Models animals.....	67
5. La Leucodistròfia metacromàtica.....	68
5.1. Descripció.....	68
5.2. Els sulfolípidis o sulfàtids.....	68
5.3. Clínica.....	69
5.3.1. Forma infantil.....	69
5.3.2. Forma juvenil.....	70
5.3.3. Forma adulta.....	70
5.4. Diagnòstic bioquímic.....	71
5.5. Herència.....	71
5.6. Incidència.....	71
5.7. L'arilsulfatasa A.....	72
5.8. L'activador natural: saposina B.....	73
5.9. El gen de l'arilsulfatasa A (ARSA).....	74
5.9.1. Localització.....	74
5.9.2. Estructura del gen.....	74
5.10. Mutacions descrites al gen ARSA.....	75
5.10.1. Mutacions de canvi de sentit (<i>missense</i>).....	75
5.10.2. Mutacions sense sentit (<i>nonsense</i>).....	77
5.10.3. Petites insercions i delecions.....	77
5.10.4. Mutacions d' <i>splicing</i>	78
5.11. Polimorfismes descrits al gen ARSA.....	79
5.12. La pseudo-deficiència de l'arilsulfatasa A.....	80
5.12.1. Característiques.....	80
5.12.2. Incidència.....	81
5.12.3. L'al·lel ARSApd i el seu efecte sobre la clínica.....	82
5.13. Estudi d'haplotips.....	82
5.14. Correlació genotip-fenotip.....	83
5.15. Teràpia.....	84
5.15.1. Trasplantament de moll d'os.....	84
5.15.2. Teràpia gènica.....	85
5.15.3. Teràpia de substitució enzimàtica.....	85

Objectius	87
Material i mètodes	91
1. Material	93
1.1. Pacients i famílies estudiades.....	93
1.2. Mostres.....	93
1.3. Obtenció del DNA.....	93
1.4. Obtenció de l'RNA.....	94
1.5. Síntesi de cDNA.....	95
2. Mètodes	95
2.1. Tècniques generals.....	95
2.1.1. Reacció en cadena de la polimerasa (PCR).....	95
2.1.2. Mètodes per la detecció de mutacions noves.....	97
2.1.2.1. SSCP (<i>Single Strand Conformation Polymorphism</i>).....	97
2.1.2.1.1. Amplificació per PCR i electroforesi.....	97
2.1.2.1.2. Tinció en plata.....	98
2.1.2.2. Anàlisi d'heterodúplexs.....	98
2.1.2.2.1. Amplificació per PCR i electroforesi.....	99
2.1.2.2.2. Tinció	99
2.1.3. Mètodes per la detecció de mutacions ja descrites prèviament.....	99
2.1.3.1. Digestió amb enzims de restricció.....	99
2.1.3.2. SSCP.....	100
2.1.4. Seqüenciació.....	100
2.1.4.1. Preparació del producte per seqüenciar.....	100
2.1.4.1.1. Aïllament de l'al·lel mutat	100
2.1.4.1.2. PCR de l'al·lel mutat i comprovació.....	101
2.1.4.1.3. Purificació del producte de PCR.....	101
2.1.4.2. Seqüenciació utilitzant [α - ³⁵ S]dATP.....	102
2.1.4.2.1. Reacció de seqüència	102
2.1.4.2.2. Preparació del gel de seqüència i electroforesi.....	103
2.1.4.2.3. Assecament del gel i exposició.....	103
2.1.4.2.4. Revelat.....	104
2.1.4.3. Seqüenciació utilitzant dNTPs marcats amb fluorocroms.....	104
2.1.4.3.1. Reacció de seqüència.....	104
2.1.4.3.2. Electroforesi.....	105
2.1.5. Solucions generals.....	105
2.2. La malaltia de Hurler/Scheie.....	106
2.2.1. Encebadors i condicions per amplificar els exons del gen <i>IDUA</i>	106
2.2.2. Detecció de les mutacions: Digestió amb enzims de restricció.....	107
2.2.3. Estudi de polimorfismes del gen <i>IDUA</i>	108

2.3. La malaltia de Hunter.....	110
2.3.1. Encebadors i condicions per amplificar el gen de l'IDS.....	110
2.3.2. Encebadors i condicions per amplificar el cDNA del gen <i>IDS</i>	111
2.3.3. Anàlisi de marcadors polimòrfics.....	112
2.3.4. Transferència i hibridació del DNA.....	113
2.3.4.1. Digestió del DNA genòmic i electroforesi en gel d'agarosa.....	113
2.3.4.2. Transferència del DNA (<i>Southern blot</i>).....	113
2.3.4.3. Marcatge de la sonda amb digoxigenina.....	114
2.3.4.4. Prehibridació i hibridació del filtre.....	114
2.3.4.5. Detecció (Mètode quimioluminiscent).....	115
2.4. La leucodistròfia metacromàtica.....	116
2.4.1. Encebadors i condicions per amplificar el gen de l'ARSA.....	116
2.4.2. Detecció de la mutació <i>IVS2+1G→A</i>	117
2.4.3. Detecció de l'al·lel <i>ARSApd</i>	118
2.4.4. Estudi de polimorfismes del gen <i>ARSA</i>	119
2.4.5. Estudi d'haplotips.....	120
Resultats i Discussió.....	121
Capítol I: La malaltia de Hurler/Scheie.....	123
1. Resultats.....	125
1.1. Estudi de les mutacions detectades en la població espanyola.....	125
1.1.1. "Analysis of five mutations in 20 Mucopolysaccharidosis type I patients: High prevalence of the W402X mutation" (1998) Hum Mutat 11: 332-333.....	125
1.1.2. Addendum.....	127
1.2. Estudi de polimorfismes en pacients i familiars.....	127
1.3. Estudi de les mutacions freqüents en pacients procedents del nord d'Àfrica.....	129
1.4. Diagnòstic de portadors i diagnòstic prenatal.....	129
2. Discussió.....	132
2.1. Mutacions i polimorfismes freqüents en el gen <i>IDUA</i> en malalts espanyols. Comparació amb altres poblacions i geografia de les mutacions.....	132
2.2. Utilitat de l'anàlisi molecular pel diagnòstic.....	136
2.3. Correlació genotip-fenotip.....	137
Capítol II: La malaltia de Hunter.....	139
1. Resultats.....	141
1.1. Mutacions en el gen <i>IDS</i>	141
1.1.1. "Mutations in the iduronate-2-sulfatase gene in 12 Spanish patients	

<i>with Hunter disease</i> " (1998) Hum Mutat suppl 1: S66-S68.....	141
1.1.2. " <i>Hunter disease in Spanish population. Molecular analysis in 31 families</i> " (1998) J Inher Metab Dis 21(6): 655-661.....	141
1.1.3. Addendum.....	143
1.2. Estudi de polimorfismes.....	144
1.2.1. El cas de la família H121	144
" <i>A new polymorphism in the iduronate-2-sulphatase gene. Implications for the diagnosis of Hunter disease</i> (1999) J Inher Metab Dis 22:844	
1.2.2. Anàlisi indirecte per estudi de marcadors polimòrfics.....	145
1.3. Diagnòstic de portadors i diagnòstic prenatal.....	147
1.3.1. Estudi de familiars.....	147
1.3.2. El diagnòstic prenatal quan la mutació és una deleció total o parcial.....	149
" <i>Anàlisis molecular en vellosidades de corion directas en el diagnóstico prenatal de la enfermedad de Hunter</i> " (1998) Errores Congénitos del metabolismo, Barcelona, 27-28 Febrer, P48	
2. Discussió.....	151
2.1. Epidemiologia molecular de la MPS II en els pacients espanyols: Anàlisi de mutacions i polimorfismes.....	151
2.1.1. Distribució de les mutacions puntuals en la zona codificant de l' <i>IDS</i>	153
2.1.2. Heterogeneïtat genètica.....	154
2.2. L'anàlisi molecular en l'estudi de portadores i el diagnòstic prenatal.....	155
2.3. Correlació genotip-fenotip.....	157
Capítol III: La leucodistrofia metacromàtica.....	161
1. Resultats.....	163
1.1. Recerca de mutacions, estudi d'haplotips i correlació genotip-fenotip en la població espanyola.....	163
1.1.1. " <i>Identification of 12 novel mutations and 2 new polymorphisms in the arylsulfatase A gene. Haplotype and genotype-phenotype correlation studies in Spanish Metachromatic Leukodystrophy patients</i> " (1999) Hum Mutat 14: 240-248.....	163
1.1.2. Addendum.....	165
1.2. Diagnòstic de portadors	165
1.3. Diagnòstic molecular després del trasplantament de moll d'os.....	166
2. Discussió.....	168
2.1. Anàlisi molecular en pacients amb LDM: Mutacions al gen <i>ARSA</i>	168
2.1.1. Distribució de les mutacions identificades.....	170
2.2. Estudi d'haplotips.....	170
2.2.1. En població normal.....	170

2.2.2. En pacients LDM i origen de les mutacions més freqüents.....	174
2.3. Estudi de l'al·lel ARSApd.....	178
2.4. Utilitat de l'anàlisi molecular pel diagnòstic i seguiment terapèutic de la LDM.....	180
2.5. Correlació genotip-fenotip.....	181
Discussió general.....	185
1. Anàlisi molecular i la seva utilitat diagnòstica.....	187
2. Estudi d'haplotips i origen de les mutacions.....	190
3. Correlació genotip-fenotip.....	191
Conclusions.....	193
Referències.....	201
Annex.....	229

FIGURES

Introducció

Figura 1. Biologia del lisosoma.....	16
Figura 2. Via de degradació del dermatan sulfat.....	29
Figura 3. Via de degradació de l'heparan sulfat.....	30
Figura 4. Estructura del gen de l' α -L-iduronidasa (<i>IDUA</i>).....	32
Figura 5. Estructura del gen de l'Iduronat-2-sulfatasa (<i>IDS</i>).....	51
Figura 6. Estructura del gen <i>IDS</i> i del pseudogèn <i>IDS-2</i>	62
Figura 7. Recombinació intracromosòmica entre el gen <i>IDS</i> i el pseudogèn <i>IDS-2</i>	62
Figura 8. Estructura d'alguns sulfolípid.....	69
Figura 9. Estructura del gen de l'arilsulfatasa A (<i>ARSA</i>).....	74

Resultats i discussió**Capítol I**

Figura 1. Resultats de l'estudi de portadors i del diagnòstic prenatal en familiars de pacients amb la malaltia de Hurler/Scheie.....	130
Figura 2. Genoclina descendent de Nord a Sud de la freqüència de la mutació Q70X en la població europea.....	133
Figura 3. Genoclina descendent de Sud a Nord de la freqüència de la mutació W402X en la població europea.....	134
Figura 4. Possible origen nord-africà de la mutació P533R en població europea.....	135

Capítol II

Figura 1. Arbre genealògic de la família H121.....	144
Figura 2. Arbres genealògics de les famílies H49 i H59.....	145
Figura 3. Resultats de l'estudi de portadors i del diagnòstic prenatal en familiars de pacients amb la malaltia de Hunter.....	149

Capítol III

Figura 1. Anàlisi per SSCP del producte de PCR de l'exó II del gen <i>ARSA</i>	167
Figura 2. Patrons d'SSCP obtinguts en controls per estudi d'haplotips del gen <i>ARSA</i>	172
Figura 3. Esquema dels haplotips identificats en població control respecte els marcadors de l'exó VII i rodalies.....	173

TAULES

Introducció

Taula 1. Principals malalties d'acumulació lisosòmica.....	12
Taula 2. Característiques bioquímiques i clíniques de les mucopolisacaridosis (MPS).....	21
Taula 3. Freqüència de les mutacions més prevalents del gen <i>IDUA</i>	37
Taula 4. Mutacions de canvi de sentit (<i>missense</i>) del gen <i>IDS</i>	53
Taula 5. Mutacions sense sentit (<i>nonsense</i>) del gen <i>IDS</i>	56
Taula 6. Petites insercions i delecions del gen <i>IDS</i>	57
Taula 7. Mutacions d' <i>splicing</i> del gen <i>IDS</i>	59
Taula 8. Mutacions de canvi de sentit (<i>missense</i>) del gen <i>ARSA</i>	76
Taula 9. Petites insercions i delecions del gen <i>ARSA</i>	78
Taula 10. Mutacions d' <i>splicing</i> del gen <i>ARSA</i>	78
Taula 11. Freqüències de la mutació <i>IVS2+1G→A</i> del gen <i>ARSA</i>	79
Taula 12. Polimorfismes descrits al gen <i>ARSA</i>	79
Taula 13. Incidència de l'al·lel <i>ARSA</i> _{pd} i el polimorfisme <i>N350S</i> del gen <i>ARSA</i>	81

Material i Mètodes

Taula 1. Encebadors per amplificar el gen <i>IDUA</i>	107
Taula 2. Enzims de restricció i condicions per la detecció de les mutacions de la malaltia de Hurler/Scheie.....	108
Taula 3. Encebadors per l'estudi de polimorfismes del gen <i>IDUA</i>	109
Taula 4. Encebadors per amplificar el gen <i>IDS</i>	111
Taula 5. Encebadors per amplificar el cDNA del gen <i>IDS</i>	112
Taula 6. Marcadors polimòrfics del cromosoma X estudiats.....	113
Taula 7. Encebadors per amplificar el gen <i>ARSA</i>	117
Taula 8. Enzims de restricció i condicions per la detecció dels polimorfismes del gen <i>ARSA</i>	120

Resultats i Discussió**Capítol I**

Taula 1. Resultats de l'estudi de polimorfismes en els pacients de la malaltia de Hurler/Scheie.....	128
---	-----

PRÒLEG

Ara ja fa vuit anys que les classes d'en Lluís Serra a tercer de carrera (del pla vell) em van fer descobrir un nou món absolutament sorprenent i extasiat: el món de la genètica. Tot i que ja havia encaminat els meus passos cap a una carrera centrada en l'estudi de la naturalesa, no va ser fins aleshores que vaig descobrir el què realment m'agradaria dedicar-me.

Per això, a finals d'aquell any vaig demanar per entrar com a alumna interna al Departament de Genètica de la Facultat de Biologia, i encara recordo l'entrevista que vaig tenir amb la Roser i la Lluïsa i la pregunta sobre en quina branca de la genètica m'agradaria més ficar-me. El fet de què el meu pare es morís de càncer de pulmó i la intuïció que algun dia mitjançant estudis i investigacions potser es podria curar i, per somniar que no quedi, potser jo hi podia posar el meu granet de sorra, i el fet de la utilitat directa i aplicada sobre les persones, no em va fer dubtar gens: la genètica humana.

Després d'estar un parell d'anys al departament aprenent les tècniques més habituals de la biologia molecular, em vaig començar a adonar del gran potencial que aquestes tècniques representaven pel diagnòstic i prevenció de malalties i, després d'acabar la carrera, em vaig decidir a fer el doctorat. Mitjançant en Dani i la Lluïsa vaig anar a parar a l'Institut de Bioquímica Clínica, que en aquell moment estava encara a Cerdanyola del Vallès. Sota la direcció de l'Amparo i la M^a Josep se'm va obrir tot el món de les malalties lisosòmiques i la necessitat vital de desenes de famílies d'un diagnòstic clar i definitiu. Darrera cada mostra, darrera cada nom, hi havia una persona, una família i una situació i calia l'anàlisi molecular per millorar el diagnòstic de portadors i el diagnòstic prenatal d'aquestes malalties.

Tot i la fredor que representen les estadístiques, les freqüències de mutacions, els nombres de pacients, les classificacions de clíniques i l'aparent col·leccionisme de mutacions no descrites, durant aquests cinc anys he estat tractant amb pacients i familiars, els quals acabes coneixent de memòria com si fossin amics de tota la vida. Darrera cada cas hi ha la seva història i situació familiar i, tot i que en comptats casos he tractat directament amb les persones, acabes fent-te'ls teus i pateixes quan estàs pendent d'un diagnòstic prenatal i saltes d'alegria quan detectes que el fetus

és sa o et desesperes quan diagnosticues el tercer fetus afecte en una mateixa família, o maleeixes el moment en què has de donar el diagnòstic de portadora d'una malaltia lligada al cromosoma X a una noia de 20 anys, mentre que la seva germana ha tingut més sort i no és portadora. Acabes associant cada pacient amb una malaltia i una mutació i quan et diuen que ha arribat la mostra de la tia materna de tal pacient, ja saps el què li has d'analitzar.

Sí que és cert que tots aquests pacients i les seves mutacions m'han permès publicar articles a conegudes revistes científiques internacionals i arribar a presentar la tesi doctoral, i que sense ells ara no tindríeu aquesta tesi a les mans, però no cal perdre de vista que són persones i famílies que normalment arriben a l'IBC després de voltar metges i metges per poder saber què és el que tenen i que en ser malalties tan poc freqüents han d'esperar a caure en mans d'algú que pensi en la possibilitat que sigui una malaltia lisosòmica i, quan finalment se'ls dona un diagnòstic, tot i ser malalties sense tractament efectiu, és com si se'ls obrís el cel perquè ja saben què tenen i poden arribar a prevenir la malaltia. Per això, aquesta tesi, a part d'un recull fred de mutacions i d'estadístiques, vol ser el resultat de l'estudi de totes aquestes famílies, i espero que les conclusions extretes d'aquest treball siguin d'utilitat de cara a ajudar futurs pacients i famílies i sigui el meu granet de sorra a la caracterització d'aquestes malalties.

És per això que, bàsicament, voldria dedicar aquesta tesi a tots els pacients i familiars que han passat per les meves mans durant aquests anys les mostres dels quals s'han deixat fer tot tipus de proves sense queixar-se, deixant-me experimentar amb elles i deixant que pogués aprofundir i millorar els meus coneixements de biologia molecular.

Sincerament, he gaudit d'allò més en la realització d'aquesta tesi, i si la biologia molecular ja m'agradava, encara m'ha acabat d'entusiasmar més després d'aquest estudi, per la seva aplicabilitat, per la seva capacitat de lliurar una persona de la por de tenir una criatura afectada perquè es tenen antecedents o d'assegurar la possibilitat d'un possible nou cas en la família, per la seva fiabilitat i perquè aquí no s'hi valen valoracions subjectives, el què l'acosta a l'exactitud de les matemàtiques...

Espero que us agradi aquesta tesi i, si més no, us permeti fer-vos una idea d'aquest món tan poc conegut com és el de les malalties lisosòmiques.

AGRAÏMENTS

Voldria agrair a tots aquells que durant aquests anys m'han ajudat assessorant-me en qüestions científiques o no, donant-me suport en els moments bons i dolents i que han fet possible que en aquest moment tingueu aquesta tesi a les vostres mans:

A l'Amparo i la M^a Josep, les meves directores

A la Lluïsa, la meva tutora

A tots els pacients i els seus familiars estudiats en aquest treball

A tot l'Institut de Bioquímica Clínica i a la Teresa Pàmpols

Al Departament de Genètica de la Facultat de Biologia, a en Dani, la Susanna i la Roser

A la CIRIT

A la família Valls-Sellés, en Pere, l'Helena, l'Adrià i en Marçal, per la seva amistat i suport incondicional

A l'Ana i la Sonia pels bons moments passats juntes i la seva comprensió

A la resta de membres del grup de malalties lisosòmiques i peroxisòmiques de l'IBC, Josep, Lina i Marisa

A la Kitty per la seva ajuda continuada i les xerrades d'amistat

A la resta de becàries que han passat pel centre i que ara ja són doctores: Dolors, Gemma i Montse

A la resta de membres del Departament d'Errors Congènits del metabolisme: Conxita, Lotti, Margot, Mercè, Paz i Toni

A en Carles, Emma, Irene, Montse, Núria i Sabine del Departament de Genètica de l'IBC

*A en Borja, Edu, Dolors, Jordi, Josep Manel, Manolo, Maria, Maya, Neus, Roser i Tívor
del Departament de Cribratge neonatal de l'IBC*

A la Roser, la "secre" i a en Diego, el conserge

A l'Encarna i la Llúcia

*Als alumnes de pràctiques Imma, Ivette, Estela, Mireia, Cristina, Carne, Merche,
Héctor, Sonia, Sandra, Rubén, Elvira, Mari i Pili*

Als cubans Jesús i Cari i a l'argentina Mariana

*Als que em van iniciar en la genètica tenint-me com a "helper" al Departament de
Genètica: Bru, Mònica i Amàlia*

Als que vam començar junts l'estada d'alumnes interns: Rebe i Marc

*A la Neus, en Ricki, en David, la Mari i la resta de becaris, PAS, professors adjunts i
facultatius del departament de Genètica de la Facultat de Biologia i tants d'altres*

A la Neus, la Mònica i l'Eva

A la meva mare, per animar-me sempre a tirar endavant, i a en Jaume

*Als meus germans, Anna i Joaquim, el meu cunyat Jordi i en Jordi, l'Eloi i l'Aida, que
sempre m'han fet costat*

*A la meva iaia i al meu avi, que tot i no entendre massa això de la genètica sempre
m'han recolzat*

*A la família Giol-Prat, Joaquim i Victòria, Quim i Mireia, als cunyats Aurora i Pep i a la
Berta, en Marc i la Maria*

Al meu pare

A en Nazari

PRESENTACIÓ

Aquest treball pretén estudiar les característiques genètiques i moleculars de tres de les malalties lisosòmiques més freqüents en la població espanyola: la mucopolisacaridosi de tipus I (o malaltia de Hurler/Scheie), la mucopolisacaridosi de tipus II (o malaltia de Hunter) i la leucodistròfia metacromàtica.

S'han utilitzat tècniques de recerca de mutacions com l'SSCP per la caracterització de les mutacions desconegudes causants de la malaltia, o la digestió amb enzims de restricció en el cas del diagnòstic de mutacions ja conegudes, i així s'ha pogut establir l'espectre de mutacions i les seves freqüències en cada una de les malalties. Quan la presència de varis pacients amb la mateixa mutació ho ha permès, s'ha intentat establir una correlació genotip-fenotip per poder predir el pronòstic del pacient i poder aconsellar sobre possibles teràpies a aplicar-li, però malauradament, no en tots els casos s'ha pogut arribar a una conclusió clara sobre aquest tipus de correlació. A més, en la leucodistròfia metacromàtica, s'ha intentat correlacionar el nivell d'activitat enzimàtica residual a les cèl·lules dels malalts amb determinades mutacions com un pas previ per a futurs estudis d'expressió funcional d'aquestes mutacions. Així mateix, quan els pacients de cada malaltia han estat caracteritzats, s'ha informat a les famílies i se'ls ha ofert el diagnòstic de portadors i el diagnòstic prenatal per tal de prevenir l'aparició de nous casos afectes. En el cas de no disposar de la mutació concreta causant de la malaltia, s'ha utilitzat l'anàlisi indirecte per estudi de cosegregació de marcadors polimòrfics intra i/o extragènics per fer aquest diagnòstic. D'altra banda, en la malaltia de Hurler/Scheie i en la leucodistròfia metacromàtica s'han realitzat estudis d'haplotips mitjançant aquest tipus de marcadors per intentar esbrinar l'origen de les mutacions més freqüents de cada malaltia, el què ha permès establir un origen únic per algunes de les mutacions més freqüents de la leucodistròfia metacromàtica.

En conjunt, aquest treball dona una visió bastant acurada de la relació entre les característiques genètiques i clíniques dels pacients amb aquestes tres malalties.

ABREVIATURES

ARSA	Ariulfatasa A
ARSA	Gen de l'arulfatasa A
ARSAPd	Al·lel de la pseudo-deficiència de l'arulfatasa A
BSA	Albúmina sèrica bovina
cDNA	Àcid desoxiribonucleic complementari
DNA	Àcid desoxiribonucleic
ddNTPs	Dideoxinucleòtids trifosfat
dNTPs	Desoxinucleòtids trifosfat
g, mg, µg, ng, kg	gram, mil·ligram, microgram, nanogram, kilogram
GAGs	Glucosaminoglicans
GDB	<i>Gene Data Bank</i>
h	hora
HLA	Antigen de Leucocit Humà (<i>Human Leukocyte Antigen</i>)
IDS	Iduronat-2-sulfatasa
IDS	Gen de l'iduronat-2-sulfatasa
IDS-2	Pseudogen de l'iduronat-2-sulfatasa
IDUA	α-L-iduronidasa
IDUA	Gen de la l'α-L-iduronidasa
KDa	Kilodalton
l, ml, µl	litre, mil·lilitre, microlitre
LDM	Leucodistròfia metacromàtica
M, mM, µM	molar, mil·limolar, micromolar
MIM	<i>Mendelian Inheritance in Man</i>
min	minut
mRNA	Àcid ribonucleic missatger
MPS	Mucopolisacaridosis
nt	nucleòtid
PAGE	Electroforesi en gel de poliacrilamida (<i>PolyAcrylamide Gel Electrophoresis</i>)
pb, Kb, Mb	Parell de bases, Kilobase, Megabase
PCR	Reacció en cadena de la polimerasa (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
pl	Punt isoelèctric
PolyA	Senyal de poliadenilació (<i>Polyadenylation</i>)
RFLP	Fragment de restricció de longitud polimòrfica (<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>)
RNA	Àcid ribonucleic
rpm	revolucions per minut
SAP	Proteïnes activadores d'esfingolípids (<i>Sphingolipid Activator Proteins</i>)
SDS	<i>Sodium Dodecil Sulfate</i>
seg	segon
SSCP	Polimorfisme en la conformació de les cadenes senzilles (<i>Single Strand Conformation Polymorphism</i>)
TBE	tampó Tris-Borat-EDTA
TEMED	Tetrametil-etilen-diamina
TMO	Trasplantament de moll d'os
TSE	Teràpia de substitució enzimàtica
U	Unitat
V	Volts
vol	volum
VNTR	Repeticions en tàndem de nombre variable (<i>Variable Number of Tandem Repeats</i>)

INTRODUCCIÓ

1. MALALTIES LISOSÒMIQUES

1.1. CARACTERÍSTIQUES GENERALS

Les malalties lisosòmiques són trastorns hereditaris deguts a la incapacitat de degradar les macromolècules procedents del recanvi cel·lular a causa del defecte funcional d'algun enzim lisosòmic específic. Aquesta disfunció provoca l'acumulació de macromolècules al lisosoma i és la causant de la malaltia.

Els lisosomes foren descoberts per De Duve i col. (1955) però la relació entre lisosomes i malaltia d'emmagatzemament la va establir Hers (1963 i 1965) quan va demostrar que el dèficit de maltasa àcida (α -glucosidasa) provocava l'acumulació de glucogen a l'interior dels lisosomes en els pacients amb la malaltia de Pompe.

Des d'aleshores, s'han descrit unes quaranta malalties per dipòsit lisosòmic, i prop de cinquanta si es consideren els diferents subtipus i variants (Reuser i col, 1994; Chabás i col, 1995; Gieselmann, 1995).

En la majoria dels casos, aquestes malalties són degudes a la deficiència d'una hidrolasa lisosòmica (o d'una subunitat de l'enzim) implicada en la degradació d'una macromolècula, però també es pot tractar de la deficiència d'una proteïna activadora de l'enzim (Furst i col, 1992) o d'un transportador de la membrana lisosòmica encarregat de facilitar l'exportació de petites molècules fora de l'òrganul (Pisoni i col, 1991).

Per descriure-les, es solen agrupar les malalties lisosòmiques sota els noms químics dels substrats no degradats que s'acumulen: mucopolisacaridosis, lipidosi i glucoproteïnos, segons els substrats siguin mucopolisacàrids, lípids o glucoproteïnes respectivament (Taula 1). A aquest grup de malalties, cal afegir la recent adscripció de les formes infantil i infantil-tardana de la ceroid lipofuscinosis.

Les malalties lisosòmiques es transmeten per herència autosòmica recessiva, excepte dues que estan lligades al cromosoma X (malalties de Hunter i de Fabry). Considerades en conjunt, representen l'1% dels trastorns mendelians descrits i el 10% de les malalties genètiques amb el defecte primari establert.

Taula 1. Principals malalties d'acumulació lisosòmica

Malaltia	Deficiència enzimàtica	Substrat acumulat
Lipidosis		
Gangliosidosi GM1	α -galactosidasa	Gangliòsid GM1, queratan sulfat, galactosiloligosacàrids
Gangliosidosi GM2	Hexosaminidasa A	Gangliòsid GM2 i asialo-GM2
Malaltia de Tay-Sachs	Hexosaminidasa A i B	Gangliòsid GM2, globòsid i oligosacàrids
Malaltia de Sandhoff	Proteïna activadora de l'Hexosaminidasa A	Gangliòsid GM2 i asialo-GM2
Variant AB		
Variant B1	Defecte de la interacció de la proteïna activadora i l'Hexosaminidasa A	Gangliòsid GM2 i asialo-GM2
Malaltia de Gaucher	β -glucocerebrosidasa	Glucocerebròsid
Malaltia de Gaucher per dèficit en SAP-2	Proteïna activadora SAP-2	Glucocerebròsid
Malaltia de Niemann-Pick		
Tipus A i B	Esfingomielinasa	Esfingomielina
Tipus C	Desconegut	Esfingomielina
Malaltia de Fabry	α -galactosidasa	Trihexosil-ceramida i dihexosil-ceramida
Leucodistrofia metacromàtica	Ariulfatasa A	Cerebròsid sulfat
Leucodistrofia metacromàtica per dèficit en SAP-1	Proteïna activadora SAP-1	Cerebròsid sulfat
Malaltia d'Austin	Ariulfatases A, B, C i altres	Cerebròsid sulfat, glucosaminoglucans, esterol sulfat
Malaltia de Krabbe	β -galactocerebrosidasa	Galactocerebròsid, galactosilesfingosina
Lipogranulomatosi de Farber	Ceramidasa	Ceramida
Malaltia de Wolman	Lipasa àcida	Èsters de colesterol
Mucopolipidosi IV	Desconegut	Gangliòsids GM3, GD3, GD1a i glucosaminoglucans
Mucopolisacaridosis		
MPS I (Hurler / Scheie)	α -L-iduronidasa	Heparan- i dermatan sulfat
MPS II (Hunter)	Iduronat-2-sulfatasa	Heparan- i dermatan sulfat
MPS III (Sanfilippo)		
Sanfilippo A	Heparan N-sulfamidasa	Heparan sulfat, condroitin sulfat C
Sanfilippo B	α -D-N-acetilglucosaminidasa	Heparan sulfat
Sanfilippo C	AcetilCoA- α -glucosaminid-acetiltransferasa	Heparan sulfat
Sanfilippo D	N-acetilglucosamina-6-sulfatasa	Heparan sulfat
MPS IV (Morquio)		
Morquio A	Galactosa-6-sulfatasa	Queratan sulfat
Morquio B	β -galactosidasa	Queratan sulfat
MPS VI (Maroteaux-Lamy)	Ariulfatasa B	Dermatan sulfat
MPS VII (Sly)	β -D-glucuronidasa	Dermatan- i heparan sulfat, condroitins sulfat A i C
Oligosacaridosis		
Fucosidosi	α -L-fucosidasa	Fucosil-oligosacàrids, fucosilglicolípids
α -manosidosi	α -manosidasa	Oligosacàrids rics en manosa
β -manosidosi	β -manosidasa	Manosil-N-acetilglucosamina
Sialidosi	α -neuraminidasa	Oligosacàrids rics en siàlic
Galactosialidosi	β -galactosidasa i sialidasa	Oligosacàrids rics en siàlic i galactosa
Aspartilglucosaminúria	Aspartilglucosaminidasa	Aspartilglucosamina
Malaltia de Schindler	α -N-acetilgalactosaminidasa	N-acetilgalactosamina-O-glucopèptids, oligosacàrids rics en N-acetil-galactosamina
Glucogenosis		
Glucogenosi II (Pompe)	α -glucosidasa lisosòmica	Glicogen
Defectes de transport		
Mucopolipidosi II i III (I-cell disease i pseudo-Hurler)	UDP- α -N-acetilglucosamina-1-fosfotransferasa	Sialiloligosacàrids, glucosaminoglucans, glucolípids
Malaltia per acumulació d'àcid siàlic	Transportador de siàlic	Àcid siàlic lliure
Cistinosis	Transportador de cistina	Cistina
Variant de l'acidèmia metilmalònica	Transportador de la Vitamina B ₁₂	Vitamina B ₁₂ i àcid metilmalònic

Aquestes malalties solen ser clínicament molt heterogènies i, en general, es classifiquen en subtipus segons l'edat d'aparició dels primers símptomes i la severitat de les manifestacions. Aquestes diferències clíniques poden ser degudes a tres factors: heterogeneïtat al·lèlica, variació del fons genètic i factors no-genètics. De totes maneres, encara no se sap gaire cosa de la influència del fons genètic i quasi res dels factors ambientals.

No es coneix amb exactitud la incidència global de les malalties lisosòmiques, però gairebé totes tenen una incidència baixa en la població, d'entre 1 i 4 en 100.000 naixements. D'altra banda, algunes d'elles són molt més prevalents en determinades poblacions com, per exemple, les malalties de Gaucher i de Tay-Sachs en els jueus asquenaites (amb incidències d'1 en 600 o d'1 en 2.500 respectivament) o l'aspartilglucosaminúria i la malaltia de Salla al nord de Finlàndia (freqüència de portadors d'1 en 40).

La majoria de pacients amb aquest tipus de malalties presenten un curs fatal amb quadre degeneratiu progressiu sever i, en alguns casos, dismorfies, alteracions òssies diverses, afectació ocular, anomalies cutànies i organomegàlies. En general no es disposa de teràpies específiques, tot i que, en algunes malalties com la de Gaucher, hi ha projectes aprovats de teràpia de substitució enzimàtica que s'estan duent a terme amb força èxit; en algunes altres malalties la teràpia que se sol aplicar més sovint és el trasplantament de moll d'os, però aquest tractament no acostuma a tenir els efectes desitjats.

1.2. EL LISOSOMA

Els lisosomes són orgànuls citoplasmàtics limitats per una membrana que contenen una gran varietat d'enzims hidrolítics que funcionen a pH àcid per a la digestió intracel·lular controlada de macromolècules.

El lisosoma fou descobert per De Duve i col. (1955) a partir d'observacions bioquímiques, abans que fos visualitzat mitjançant tècniques de microscopia. En sotmetre homogenats de fetge a tractaments que trencaven o solubilitzaven les membranes cel·lulars es trobaven una sèrie d'activitats hidrolítiques, com la fosfatasa àcida o la glucuronidasa, tot indicant que aquests enzims estarien tancats en compartiments intracel·lulars. Per microscopia electrònica es va veure que aquests orgànuls cel·lulars estan limitats per una bicapa lipídica de 75 Å de gruix. La

membrana lisosòmica està saturada de bombes de protons dependents d'ATP que assegurin el manteniment d'un pH baix, al voltant de 5, a l'interior de l'òrganul. La membrana és permeable a l'aigua i als productes finals de la digestió de les macromolècules, que surten a l'exterior del lisosoma per ser excretats o reutilitzats per la mateixa cèl·lula, però no és permeable als substrats o als productes intermitjos, i s'han identificat mecanismes transportadors específics per a la sortida d'alguns metabolits com ara la cistina i l'àcid siàlic. Es coneix, també, una acetiltransferasa de membrana que catalitza l'entrada d'unitats acetil (concretament, per acetilar els grups glucosamina de l'heparan sulfat). L'estructura i les dimensions del lisosoma són molt variables d'un tipus cel·lular a un altre i, fins i tot, en una mateixa cèl·lula depenent del seu estat fisiològic.

Tot i la seva diversitat anatòmica, els lisosomes es classifiquen en dues categories: els *lisosomes primaris* (vesícules originades per gemmació en el trans-Golgi i que porten enzims hidrolítics però encara no tenen substrats per a la seva digestió) i els *lisosomes secundaris* (vesícules que resulten de la fusió de vesícules que contenen substrats a digerir amb lisosomes primaris, aquests lisosomes contenen, doncs, enzims i substrats en diferents estats de degradació) (Figura 1).

1.3. LES HIDROLASES LISOSÒMIQUES

Actualment es coneixen uns seixanta enzims lisosòmics, la gran majoria dels quals són del tipus proteases, glucosidases, lipases i nucleases, entre altres, que són capaços de catalitzar la degradació seqüencial d'una gran diversitat de substrats macromoleculars incorporats per autofàgia o endocitosi. Aquests substrats són reduïts a estructures monomèriques simples (aminoàcids, monosacàrids, àcids grassos, ac. nuclèics, etc.) i seran reutilitzats per la cèl·lula.

La majoria d'aquestes hidrolases són glucoproteïnes que es sintetitzen en forma de precursors (proenzims) al reticle endoplasmàtic rugós; aquestes formes són glucosilades durant la translocació al lumen o immediatament després, i tenen una modificació posterior del seu contingut hidrocarbonat durant el seu transport pel reticle endoplasmàtic i l'aparell de Golgi. Finalment s'introdueixen als lisosomes primaris a través de receptors específics o per un procés de flux membranós.

Algunes hidrolases tenen una especificitat de substrat bastant àmplia, com les fosfatases o les esterases, mentre que d'altres són més específiques, com les glicosidases. Les alteracions en els gens corresponents que codifiquen per aquestes

hidrolases provoquen una deficiència enzimàtica i, com a conseqüència, l'acumulació de substrat sense digerir als lisosomes. Aquesta acumulació és la causant de la patologia.

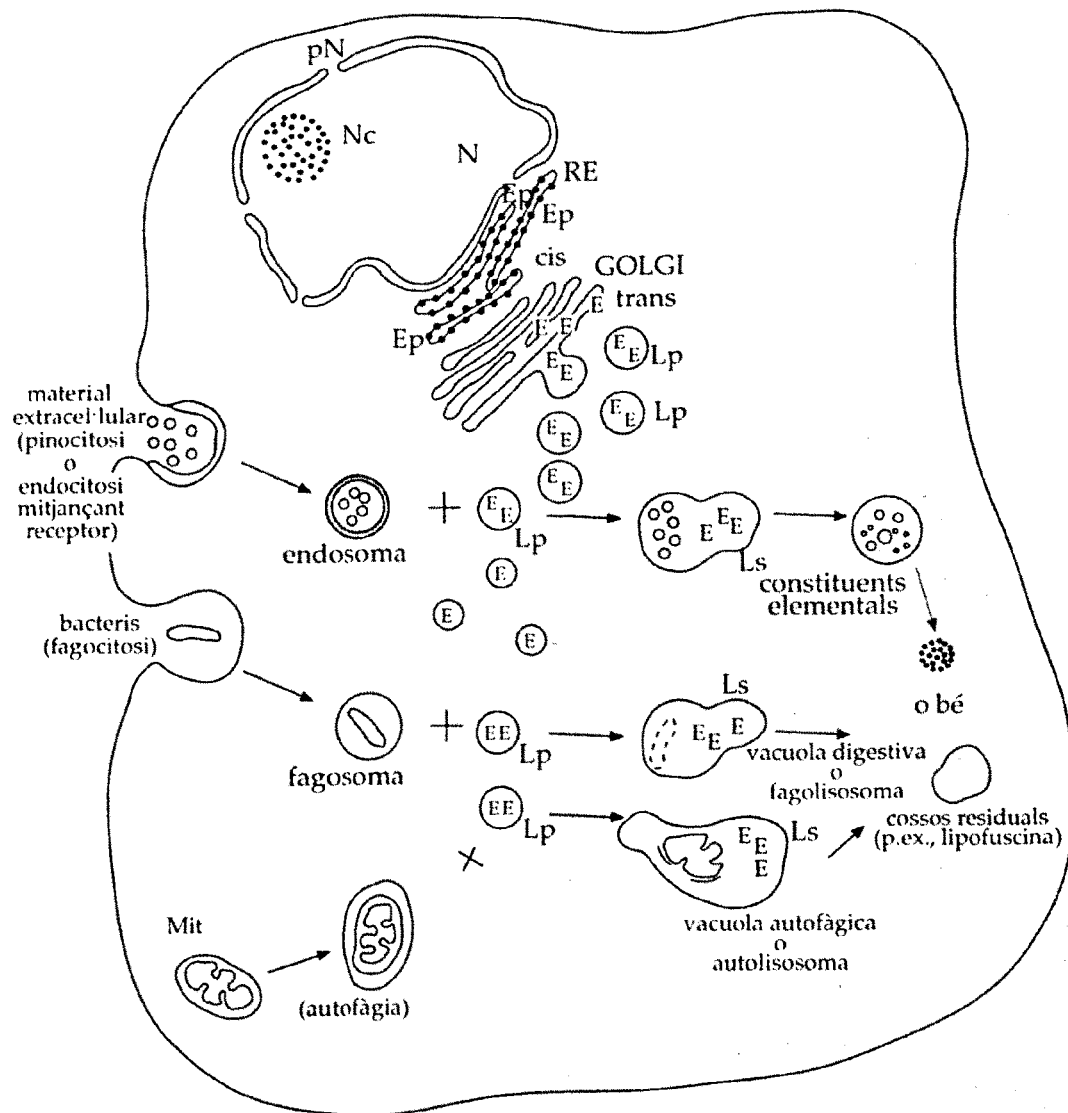


Figura 1. Biologia del lisosoma. Els lisosomes són orgànuls citoplasmàtics envoltats de membrana que contenen una gran varietat d'enzims hidrolítics (E), que funcionen a pH àcid i que són capaços de digerir macromolècules biològiques. Els materials extracel·lulars són captats per processos d'endocitosi (pinocitosi, endocitosi mitjançant receptor i fagocitosi), i els intracel·lulars, per autofàgia. Els lisosomes es denominen primaris (Lp) quan encara no han adquirit substrats per digerir; s'originen per gemmació en el trans-Golgi i porten incorporats enzims (E) que s'han sintetitzat als ribosomes del reticle endoplasmàtic (RE) en forma de precursor (Ep) i, quan passen per l'aparell de Golgi, són glucosilats i modificats i adquireixen un marcador de reconeixement. Els substrats captats per endocitosi o autofàgia i continguts en vacuoles adquireixen els enzims dels lisosomes primaris (Lp) i es converteixen en lisosomes secundaris (Ls). Els materials captats, tant extracel·lulars com intracel·lulars, són descomposats en els seus components elementals, que seran transferits al citosol a través de la membrana lisosòmica per ser reutilitzats en la síntesi d'altres molècules. N, nucli; Nc, Nucleoli; pN, porus nuclear; Mit, mitocòndria. Segons Chabás i col. (1995).

2. LES MUCOPOLISACARIDOSIS

2.1. CARACTERÍSTIQUES GENERALS

Les mucopolisacaridosis (MPS) són un grup de malalties causades per la deficiència d'enzims lisosòmics que degraden glucosaminoglicans (mucopolisacàrids). Segons la deficiència enzimàtica, es poden veure afectades la degradació de l'heparan sulfat, del dermatan sulfat i del queratan sulfat, sols o en combinació, i també la dels condroitins sulfats. Els glucosaminoglicans sense degradar (o mig degradats) s'emmagatzemen al lisosoma i la seva acumulació provoca la disfunció de la cèl·lula, el teixit i/o l'òrgan.

En els malalts afectes de mucopolisacaridosi, els glucosaminoglicans acumulats es troben també a l'orina, factor que s'utilitza per orientar el diagnòstic.

2.2. ELS GLUCOSAMINOGLICANS

Els glucosaminoglicans (GAGs) són cadenes de polisacàrids no ramificats compostos per unitats repetides de disacàrids que inclouen un sucre aminat (glucosamina o galactosamina) i un àcid hexurònic (àcid glucurònic o idurònic). Els aminosucres estan, generalment, acetilats, sulfatats o les dues coses alhora. Els àcids hexurònics també poden estar sulfatats. Les cadenes de GAG, a excepció de l'àcid hialurònic, estan unides a un nucli proteic formant una macromolècula de proteoglicans.

Els GAGs ocupen un volum molt gran, són hidrofílics, de manera que formen gels amb molta facilitat, i són importants constituents de la matriu extracel·lular. Entre altres propietats, poden formar gels de porus i càrregues variables i actuar com a sedàs per regular el trànsit de molècules d'acord amb la seva grandària i/o càrrega.

Des de l'inici de l'estudi de les mucopolisacaridosis, s'han diferenciat sis tipus de GAG i s'han identificat deu defectes enzimàtics en la seva degradació que donen lloc a sis mucopolisacaridosis diferents (Taula 2). Recentment, però, s'ha descrit una nova mucopolisacaridosi (la MPS IX), deguda al defecte de l'enzim hialuronidasa implicat en la degradació del GAG hialuronan; aquesta MPS encara està en estudis inicials i només se n'ha descrit un pacient (Triggs-Raine i col, 1999). Amb aquesta nova MPS, doncs, són set les mucopolisacaridosis descrites fins al moment.

2.3. CLÍNICA

Les mucopolisacaridosis comparteixen moltes característiques clíniques, tot i que ho fan en diferents graus de severitat. En general, es caracteritzen pel seu curs crònic i progressiu, implicació multisistèmica, organomegàlia, disostosi múltiple, fàcies anòmala (gargolisme) i rigidesa articular. L'audició, la visió (opacitats corneals en les MPS I, IV, VI i VII) i la funció cardiovascular poden resultar també afectades (Taula 2).

2.4. HERÈNCIA

Totes les mucopolisacaridosis són autosòmiques recessives excepte la malaltia de Hunter que és recessiva lligada al cromosoma X. Ja s'han identificat varis locus de gens autosòmics que codifiquen enzims de la degradació dels glucosaminoglicans; el locus de la iduronat-2-sulfatasa (la deficiència de la qual provoca la malaltia de Hunter) s'ha assignat al Xq28.

2.5. DIAGNÒSTIC BIOQUÍMIC

El diagnòstic de les mucopolisacaridosis es realitza a partir de la sospita per la clínica del pacient. El diagnòstic definitiu és enzimàtic però com a pas previ es realitza l'estudi d'excreció de GAGs en l'orina i es delimita els tipus de mucopolisacaridosis que poden ser segons els GAGs excretats, aleshores es realitza l'estudi de les activitats enzimàtiques corresponents. Actualment existeixen tècniques senzilles, algunes d'elles radioactives, per a posar de manifest les deficiències enzimàtiques de les mucopolisacaridosis utilitzant fibroblasts cultivats, leucocits o sèrum.

L'anàlisi dels GAGs urinaris és molt important i, en general, és el punt de partida del diagnòstic bioquímic. Tot i així, depenent del tipus de MPS i de l'edat del pacient, també se'n pot trobar una excreció normal; per tant, en aquests casos, si la clínica n'és suggerent, cal fer igualment els estudis enzimàtics per la malaltia que es sospita.

També s'ha de tenir en compte les pseudo-deficiències. Sota aquest nom s'indiquen les deficiències enzimàtiques que no són patogèniques i que es troben en població control amb una certa freqüència. Per tant, en alguns pacients es pot trobar una activitat enzimàtica reduïda però que no és la causa primària de la malaltia, sinó

una pseudo-deficiència. En les MPS només hi ha pseudo-deficiències descrites fins ara en la malaltia de Hurler i en la malaltia d'Sly.

2.6. DIAGNÒSTIC PRENATAL

El diagnòstic prenatal és possible per totes les mucopolisacaridosis. Totes les tècniques enzimàtiques realitzades en fibroblasts cultivats poden ser modificades per la seva utilització en amniocits cultivats (Fratantoni i col, 1969) i en vellositats de corion directes i/o cultivades (Kleijer i col, 1984 i 1986; Yuen i Fensom, 1985; Di Natale i col, 1987; Poenaru, 1987; Nowakowski i col, 1989).

2.7. DETECCIÓ DE PORTADORS

Les famílies afectades de mucopolisacaridosis molt sovint demanen la detecció de portadors en els individus sans. Aquest estudi, en les MPS autosòmiques recessives, generalment es realitza mesurant l'activitat enzimàtica en leucocits o fibroblasts cultivats. Tot i que, en base a una relació gen-dosi, els heterozigots (portadors) presenten la meitat del nivell normal d'activitat enzimàtica, a la pràctica, l'ampli rang i el solapament dels valors de l'activitat entre els grups control i heterozigot, fa molt difícil, i a vegades impossible, tipificar un individu particular. L'estudi de DNA té aplicació immediata en aquest camp, ja que pot donar resposta a resultats ambigus obtinguts per tècniques enzimàtiques, tot i que és necessari identificar la mutació causant de la MPS en cada família abans de l'estudi de portadors.

Les MPS tenen una gran heterogeneïtat de mutacions i, a més, la majoria de malalts són heterozigots compostos. Per tant, s'ha d'estudiar família a família la/les mutació/ons que tenen, però en certs casos, com en la malaltia de Hurler, en què algunes mutacions (com la Q70X o la W402X) són bastant freqüents, es pot fer estudi de portadors en individus de risc directament en cas que no es tingui el cas índex.

La situació és especialment complexa per la MPS II (malaltia de Hunter) que és recessiva lligada al cromosoma X. Les dones familiars de pacients Hunter necessiten saber el seu estat genètic, especialment si consideren l'opció d'un diagnòstic prenatal. El diagnòstic bioquímic té les mateixes desavantatges que en les altres MPS, i a més, en aquest cas, s'hi afegeix el fet del mecanisme de Lyon per la inactivació del cromosoma X i el mosaïcisme que poden portar encara més

varietat als resultats obtinguts. És per això que, en l'actualitat, es sol recórrer a l'estudi molecular en aquestes famílies i el diagnòstic es pot realitzar tant per estudi directe de la mutació, com per estudi indirecte basat en la cosegregació amb la malaltia de marcadors polimòrfics intra i/o extragènics (Gal i col, 1992).

2.8. INCIDÈNCIA

Les mucopolisacaridosis són malalties rares i les dades epidemiològiques són escasses.

Com a grup, Hopwood i Morris (1990) van establir la incidència de les mucopolisacaridosis en 1 en 15000 nascuts vius, essent la MPS I la més comuna en la població europea.

La incidència de la malaltia de Hunter és de 1 en 132.000 a Gran Bretanya (Young i Harper, 1982a), 1 en 78.000 homes nascuts vius en la Colúmbia Britànica (Lowry i Renwich, 1971), 1 en 72.000 a Irlanda del Nord (Nelson, 1997) i 1 en 36.000 a Israel (Schaap i Bach, 1980). La incidència més alta de la malaltia en jueus israelites va ser atribuïda a la selecció per l'al·lel Hunter en aquesta població (Zlotogora i col, 1991) tot i que un altre grup havia suggerit que era degut a deriva genètica (Chakravarti i Bale, 1983).

Encara hi ha menys informació de la resta de mucopolisacaridosis. El mateix estudi fet en la Colúmbia Britànica durant els anys 1952 al 1968, dona una incidència per la malaltia de Hurler de 1 en 100.000, de la malaltia de Scheie (Hurler lleu) 1 en 600.000 i per la malaltia de Morquio de 1 en 300.000 nascuts vius (Lowry i Renwich, 1971), la revisió, que cobria fins el 1986, va establir la freqüència de la malaltia de Hurler en 1 en 144.000 (Lowry i col, 1990). L'estudi a Irlanda del Nord establí una incidència de 1 en 76.000 per la malaltia de Hurler i de 1 en 280.000 per la de Hurler/Scheie (intermedi) (Nelson, 1997).

Pel què fa a la malaltia de Sanfilippo (MPS III), es creu que moltes vegades sol quedar sense diagnosticar degut a que el retard mental no sol anar acompanyada per trets físics molt remarcats. És per això que la relativament alta incidència trobada a Holanda pel grup de Van de Kamp (1979), 1 en 24.000 naixements, pot ser el resultat d'un esforç especial per identificar tots els casos.

Taula 2. Característiques bioquímiques i clíniques de les mucopolisacariosis (MPS)

Malaltia	Defecte enzimàtic	Compostos acumulats	Clínica
Malaltia de Hunter / Scheie (MPS I)	α -L-iduronidasa	Heparan sulfat Dermatan sulfat	Fàcies tosca, retard del desenvolupament psicomotor, rigidesa d'articulacions amb les mans en urpa. Nanisme. Opacitat corneal. Hepatoesplenomegàlia. Retard mental. Cardiopaties i infeccions recurrents. Deteriorament progressiu.
Malaltia de Hunter (MPS II)	Iduronat-2-sulfatasa	Heparan sulfat Dermatan sulfat	Fàcies tosca, retard del desenvolupament psicomotor, rigidesa d'articulacions amb les mans en urpa. Nanisme. Hepatoesplenomegàlia. Retard mental. Cardiopaties i infeccions recurrents. Deteriorament progressiu. Sordesa
Malaltia de Sanfilippo (MPS III)		Heparan sulfat en tots els casos	Retard psicomotor, destrucció neuronal progressiva que es tradueix en signes neurològics focals. Hiperactivitat i conducta agressiva. Hepatoesplenomegàlia, cardiopatia, disostosi múltiple i atropatia, en general, moderades. Progressió variable, però no solen arribar als vint anys.
Sanfilippo A	N-sulfoglucosamina sulfhidrolasa o N-heparan sulfat sulfatasa		
Sanfilippo B	α -D-N-acetilglucosaminidasa		
Sanfilippo C	AcetilCoA: α -glucosaminid acetiltransferasa		
Sanfilippo D	N-acetilglucosamina-6-sulfatasa		
Malaltia de Morquio (MPS IV)			Clínicament heterogènia. Deformitats esquelètiques molt severes que provoquen compressió de la medulla espinal i manifestacions neurològiques perifèriques. Intel·ligència preservada. Opacitat corneal, cardiopatia, anomalies de l'esmaïl dental.
Morquio A	Galactosa-6-sulfatasa	Queratan sulfat	Forma severa
Morquio B	β -galactosidasa	Queratan sulfat, Condrotin sulfat C	Forma lleu
Malaltia de Maroteaux-Lamy (MPS VI)	Arisulfatasa B	Dermatan sulfat	Fenotips severes, lleus i intermedis. Manifestacions sistèmiques com en la malaltia de Hunter, però amb la intel·ligència preservada
Malaltia de Sly (MPS VII)	β -D-glucuronidasa	Dermatan sulfat Heparan sulfat Condrotin sulf. A,C	Molt variable. Les formes severes recorden la malaltia de Hunter.

La malaltia de Maroteaux-Lamy, MPS VI, s'ha trobat amb una incidència de 1 en 216.000 naixements a la Colúmbia Britànica (Lowry i col, 1990); la malaltia d'Sly (MPS VII), encara és més rara, amb menys de 20 casos descrits (Sly i col, 1973; Neufeld i Muenzer, 1995). I, tal i com s'ha dit anteriorment, de la recentment descrita MPS IX, només se n'ha identificat un pacient (Triggs-Raine i col, 1999)

Pel què fa a la població espanyola, l'Institut de Bioquímica Clínica ha diagnosticat, des de mitjans dels anys setanta, 253 pacients amb mucopolisacaridosis. D'aquests, un 18% han quedat sense tipificar per absència de mostra per l'estudi enzimàtic, però es té la ferma sospita que la majoria correspondrien a MPS IIIA. La MPS més freqüent en la població espanyola és la de tipus I (Hurler/Scheie) amb un 22% del total dels pacients amb mucopolisacaridosis, seguida per la tipus II amb un 18.5%; la tercera més freqüent és la MPS IIIA amb un 13.8%; la resta de mucopolisacaridosis presenten freqüències inferiors que oscil·len entre el 0.4% i el 6.5% del total de pacients amb aquests tipus de malalties.

2.9. TERÀPIA

2.9.1. PRIMERS INTENTS (PLASMA, LEUCOCITS, FIBROBLASTS CULTIVATS I MEMBRANES AMNIÒTIQUES)

Els investigadors buscaven la manera de suplir l'enzim, i un primer precedent el va establir DiFerrante cap els anys 70 quan van fer transfusions amb grans quantitats de plasma o leucocits a pacients amb MPS I i MPS II (DiFerrante i col, 1971; Knudson i col, 1971). Aquestes transfusions, al principi, donaren resultats optimistes, ja que els pacients milloraven la mobilitat de les articulacions, però, posteriorment, es va veure que aquestes millores eren transitòries (Erickson i col, 1972; Dean i Muir, 1973; Moser i col, 1974; Yatsiv i col, 1975).

En molts d'aquests estudis les activitats dels enzims d'interès no van ser mesurades, ja que es van dur a terme quan encara no s'havien identificat les deficiències enzimàtiques de les MPS.

Els decebedors resultats obtinguts amb plasma i leucocits van fer buscar altres alternatives com a teràpia, com per exemple el trasplantament de teixit o d'òrgans. Es va provar amb un trasplantament de pell (Dean i col, 1975) però van haver-hi problemes de rebuig i es va decidir provar amb fibroblasts cultivats a partir de biòpsies de pell (Dean i col, 1976 i 1979). Un grup d'investigadors va mencionar

canvis bioquímics (Dean i col, 1979), mentre que un altre grup no va trobar canvis, excepte un increment en l'excreció urinària de glucosaminoglicans de pes molecular més baix que era induïda per les drogues immunosupressores (Gibbs i col, 1983). Així, el trasplantament de fibroblasts no alterava el curs clínic de la malaltia.

Semblantment, es van aconseguir resultats poc fructífers amb el trasplantament de membranes amniòtiques. Aquest teixit (que és una làmina de cèl·lules epitelials) va ser provat degut a que les cèl·lules no són immunogèniques i són riques en enzims lisosòmics, almenys en cultiu (Adinolfi i col, 1982). Un estudi que assegurava un increment transitori del nivell d'enzim (Adinolfi i Brown, 1984), no va ser confirmat (Muenzer i col, 1985; Yeager i col, 1985). Un estudi de 19 pacients trasplantats, afectats de MPS I, II, IIIA o bé IIIB, no van mostrar l'aparició d'enzim ni en sèrum ni en leucocits, dos pacients van presentar canvis mínims en l'excreció urinària de glucosaminoglicans, els familiars i el personal de l'hospital van notar millores en el comportament d'alguns dels pacients, però no hi va haver signes objectius de millora en la mobilitat de les articulacions (Muenzer i col, 1985). Per tant es va concloure que el trasplantament de cèl·lules amniòtiques no era útil com a teràpia de les MPS.

2.9.2. TRASPLANTAMENT DE MOLL D'OS

Hobbs i col. (1981) van descriure un canvi espectacular en el curs clínic de la malaltia de Hurler després del trasplantament de moll d'os: aclariment de les còrnies, disminució de l'hepatoesplenomegàlia i alentiment del deteriorament progressiu que és típic d'aquesta malaltia. Des d'aquest primer estudi més de 140 pacients, la majoria amb MPS I, han rebut trasplantament de moll d'os i han estat controlats durant varis anys (Krivit i col, 1984, 1988-1993; Hugh-Jones, 1986 i 1989; McGovern i col, 1986; Warkentin i col, 1986; Whitley i col, 1986; Malone i col, 1988; Bordigoni i col, 1989; Christiansen i col, 1990; Navarro i col, 1991; Vinallonga i col, 1992; Guffon i col, 1998; Peters i col, 1998b).

Els factors que afecten el resultat del trasplantament de moll d'os inclouen el tipus de mucopolisacariidosi, el tipus de donador, el règim preparatiu, el grau d'afectació clínica del pacient i l'edat en el moment de fer el trasplantament. La majoria de trasplantaments s'han fet en malalts de MPS I, i s'ha tingut menys èxit en malalts de MPS II i MPS III. El tipus de donador i el mètode de realització del trasplantament de moll d'os influencia significativament la morbiditat i mortalitat associada a la intervenció. Utilitzar un donador amb el sistema HLA no idèntic

incrementa la mortalitat i el grau de rebuig i requereix més règim preparatiu tòxic per assegurar-se l'èxit. La mortalitat associada amb trasplantaments fets amb donadors amb HLA idèntic en les MPS és d'un 10-20% i pot arribar a un 40-50% si s'utilitza donadors no idèntics d'HLA (Hugh-Jones i col, 1989; Krivit i col, 1990a i 1993). No es sap la millor edat per fer el trasplantament de moll d'os, però s'assegura més èxit si es fa abans que hi hagi massa afectació somàtica i sobretot del sistema nerviós central.

El trasplantament de moll d'os en pacients de la malaltia de Hurler (MPS I) porta una millora clínica significativa dels trets somàtics (Malone i col, 1988; Hugh-Jones i col, 1989; Christiansen i col, 1990; Krivit i col, 1990a i 1991; Navarro i col, 1991; Vinallonga i col, 1992). En canvi, les anomalies esquelètiques no reverteixen amb el trasplantament, tot i que sembla que el creixement dels ossos llargs continua. El sever dismorfisme facial associat a la MPS I es veu clarament modificat després del trasplantament però no millora del tot. El comportament intel·lectual i neurològic després del trasplantament varia molt, en alguns pacients s'ha vist que és totalment normal (Mc Govern i col, 1986; Krivit i col, 1989 i 1991) però en altres com els pacients de Sanfilippo s'ha vist una clara regressió de la funció neurològica després del trasplantament, probablement degut a la toxicitat de la radiació, de la quimioteràpia i els tractaments que se'ls aplica (Krivit i col, 1992).

Els models animals han ajudat molt a avaluar el trasplantament de moll d'os. Dos gats amb MPS VI i tres gossos amb MPS I han sobreviscut al trasplantament de moll d'os utilitzant radiació de tot el cos (Wenger i col, 1986; Gompf i col, 1990). Aquests models animals han permès estudiar més a fons les millores després del trasplantament a nivell tisular i d'òrgans.

Fins a l'actualitat, el trasplantament de moll d'os és l'únic tractament aplicat a malalts amb MPS amb el qual la clínica els ha millorat. La seva efectivitat és atribuïda a l'habilitat de les cèl·lules que vénen de la medul·la òssia del donador a participar en la degradació lisosòmica dels glucosaminoglicans. No només les cèl·lules derivades del donador són capaces de degradar els GAGs per si mateixes sinó que també poden transferir enzims lisosòmics a les cèl·lules deficientes de l'hoste. Excepte per l'esquelet, el defecte somàtic generalment millora, però la intel·ligència i millora neurològica varia considerablement.

El trasplantament de moll d'os és un tractament que comporta un alt risc de mortalitat i morbiditat degut al rebuig i altres complicacions, és per això que és una

teràpia que només s'hauria d'aplicar en casos escollits amb molt de compte, i en aquests casos s'hauria de dur a terme un consell pre-trasplantacional i assessorament clínic i un control sistemàtic a llarg termini dels resultats.

2.9.3. TERÀPIA GÈNICA

Recentment s'han aprovat quatre protocols de teràpia gènica per a les malalties de Hurler i de Hunter (vegeu seccions 3.10.2 i 4.16.2), però aquest tipus de teràpia encara està a les beceroles per a les altres mucopolisacaridosis i caldrà encara un cert temps per a què es pugui aplicar als pacients.

3. LA MALALTIA DE HURLER/SCHEIE

3.1. DESCRIPCIÓ

La malaltia de Hurler/Scheie o mucopolisacaridosi de tipus I (MPS I, MIM 252800) és una malaltia hereditària d'acumulació lisosòmica produïda per la deficiència de l'enzim α -L-Iduronidasa. Aquest enzim participa en la degradació dels glucosaminoglicans heparan sulfat i dermatan sulfat i, per tant, la seva deficiència provoca l'acumulació en les cèl·lules d'aquests substrats a mig degradar i són els causants del deteriorament i empitjorament de la clínica de forma progressiva. També se n'observa l'excreció en orina.

És una malaltia hereditària autosòmica recessiva.

Inicialment, es van descriure la malaltia de Hurler (Hurler, 1919) i la malaltia de Scheie (Scheie i col, 1962) com a dues malalties diferents i fins i tot, a la malaltia de Scheie, se li va donar el nom de mucopolisacaridosi de tipus V (McKusick i col, 1965). Va ser més tard que es va veure que les dues malalties estaven provocades per la deficiència del mateix enzim (Wiesmann i Neufeld, 1970) i McKusick i col. (1972) van proposar anomenar la malaltia de Hurler com a MPS IH i la de Scheie com a MPS IS. Es creia que hi havia dos al·lels diferents mutants al locus de l'*IDUA*, això vol dir que els pacients Hurler serien homozigots per l'al·lel sever i que els pacients Scheie serien homozigots per l'al·lel lleu, els heterozigots serien els pacients amb clínica intermèdia o Hurler/Scheie (McKusick i col, 1972; McKusick i Neufeld, 1983). Posteriorment s'ha proposat que l'ampli espectre de fenotips clínics que es poden veure en la MPS de tipus I, és deguda a la combinació de diferents al·lels mutants del gen *IDUA* (Neufeld i Muenzer, 1989; Hopwood i Morris, 1990).

3.2. CLÍNICA

La deficiència de l' α -L-iduronidasa pot donar un ampli ventall d'afectació clínica, però, en general, els pacients es classifiquen en tres grups diferents segons el grau d'afectació: Hurler com al més sever, Hurler-Scheie com l'intermedi i Scheie com a lleu (Neufeld i Muenzer, 1995). Els fenotips clínics no es poden distingir bioquímicament per tècniques de diagnòstic rutinàries, ja que tots presenten una excreció urinària excessiva d'heparan sulfat i dermatan sulfat, absència d'activitat α -L-Iduronidasa i acumulació d'aquests glucosaminoglicans en fibroblasts cultivats

(Ashton i col, 1992). L'anàlisi mutacional permet assignar alguns pacients a algun dels grups, però bàsicament la classificació es fa per criteris clínics.

3.2.1. FORMA SEVERA O HURLER

Tot i que s'ha utilitzat la clínica de la malaltia de Hurler com a prototipus per a totes les mucopolisacaridosis, només és representativa pels casos més severes del ventall de clíniques. És una malaltia progressiva amb afectació de diferents òrgans i teixits que porta a la mort prematura, normalment abans dels deu anys de vida. Un infant amb la malaltia de Hurler, sol néixer amb aparença normal però sol presentar hèrnies umbilicals i inguinals. Es sol diagnosticar entre els 6 i els 24 mesos de vida degut a una combinació d'hepatoesplenomegàlia, deformitats esquelètiques, trets facials toscos, llengua engrandida, front prominent i rigidesa d'articulacions. Els pacients amb la malaltia de Hurler acostumen a ser normals de talla quan són petits, però després hi ha un estancament que fa que l'altura màxima sigui de 110cm. El retard de desenvolupament es sol veure entre els 12 i els 24 mesos, i arriben al màxim funcional entre els 2 i els 4 anys de vida; després el segueix un deteriorament progressiu. La majoria de nens afectes arriben a un llenguatge molt limitat degut al retard de desenvolupament, la sordesa progressiva i la llengua engrandida. També solen presentar infeccions recurrents de les vies respiratòries altes i d'orella i tenen una respiració sorollosa. Se'ls desenvolupa l'opacitat corneal progressiva a partir del primer any de vida. Les causes habituals de mort solen ser l'obstrucció o infecció de les vies respiratòries i complicacions cardíaques. Els canvis radiològics que es poden observar en la clínica Hurler tipifiquen totes les anormalitats esquelètiques de les mucopolisacaridosis conegudes com a "disostosi múltiple".

3.2.2. FORMA INTERMÈDIA O HURLER-SCHEIE

Aquesta classificació s'utilitza per designar els pacients que presenten una clínica entre els tipus Hurler i Scheie. Està caracteritzada per una afectació somàtica progressiva, que enclou disostosi múltiple, amb poca (o gens) afectació intel·lectual. L'opacitat corneal, rigidesa d'articulacions, sordesa i afectació de les vàlvules cardíaques solen aparèixer a l'adolescència tot i que es sol diagnosticar la malaltia entre els 3 i els 8 anys de vida. Solen arribar a adults i les causes que acostumen a provocar la mort són les afectacions cardíaques i l'obstrucció de les vies respiratòries.

3.2.3. FORMA LLEU O SCHEIE

La forma lleu de la mucopolisacaridosi de tipus I està caracteritzada per la rigidesa d'articulacions, afectació de la vàlvula aòrtica, opacitat corneal i pocs altres trets somàtics. Els trets facials són característicament toscos però la intel·ligència i l'estatura són normals. La rigidesa de les articulacions és remarcada als peus i a les mans, ja que aquests pacients presenten les mans en forma d'urpa, això, juntament amb l'afectació del túnel carpal, pot limitar molt la funcionalitat (Hamilton i Pitt, 1992). Les manifestacions oftalmològiques inclouen glaucoma i degeneració de la retina, la qual, juntament amb l'opacitat corneal, pot contribuir a una pèrdua de visió progressiva significativa. L'aparició dels primers símptomes sol ser a partir dels cinc anys de vida, però, en molts casos, el diagnòstic bioquímic es sol fer a l'adolescència.

3.3. L' α -L-IDURONIDASA

L'enzim deficient en la malaltia de Hurler/Scheie és l' α -L-iduronidasa (IDUA, EC 3.2.1.76). És una glicosidasa que hidrolitza els residus d'àcid α -L-idurònic terminals del dermatan sulfat (Figura 2) i de l'heparan sulfat (Figura 3). La degradació d'aquests dos glucosaminoglicans (GAGs) queda aturada, doncs, en aquest pas i els productes a mig degradar s'acumulen a les cèl·lules causant el progressiu mal funcionament cel·lular i tisular que provocaran la clínica típica de la malaltia. També part d'aquests GAGs seran excretats per l'orina, fet que s'utilitza per l'orientació del diagnòstic.

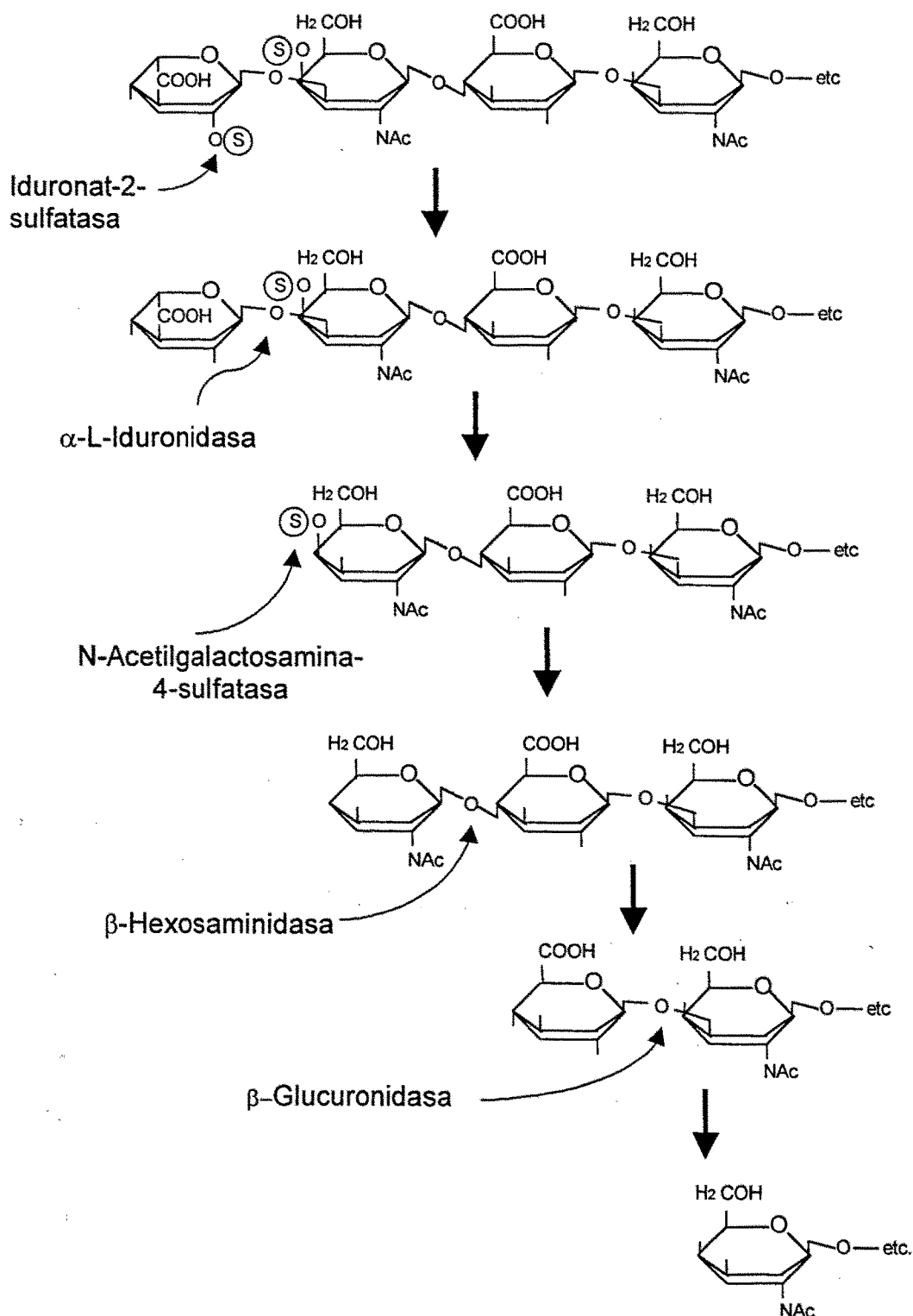


Figura 2. Via de degradació del dermatan sulfat

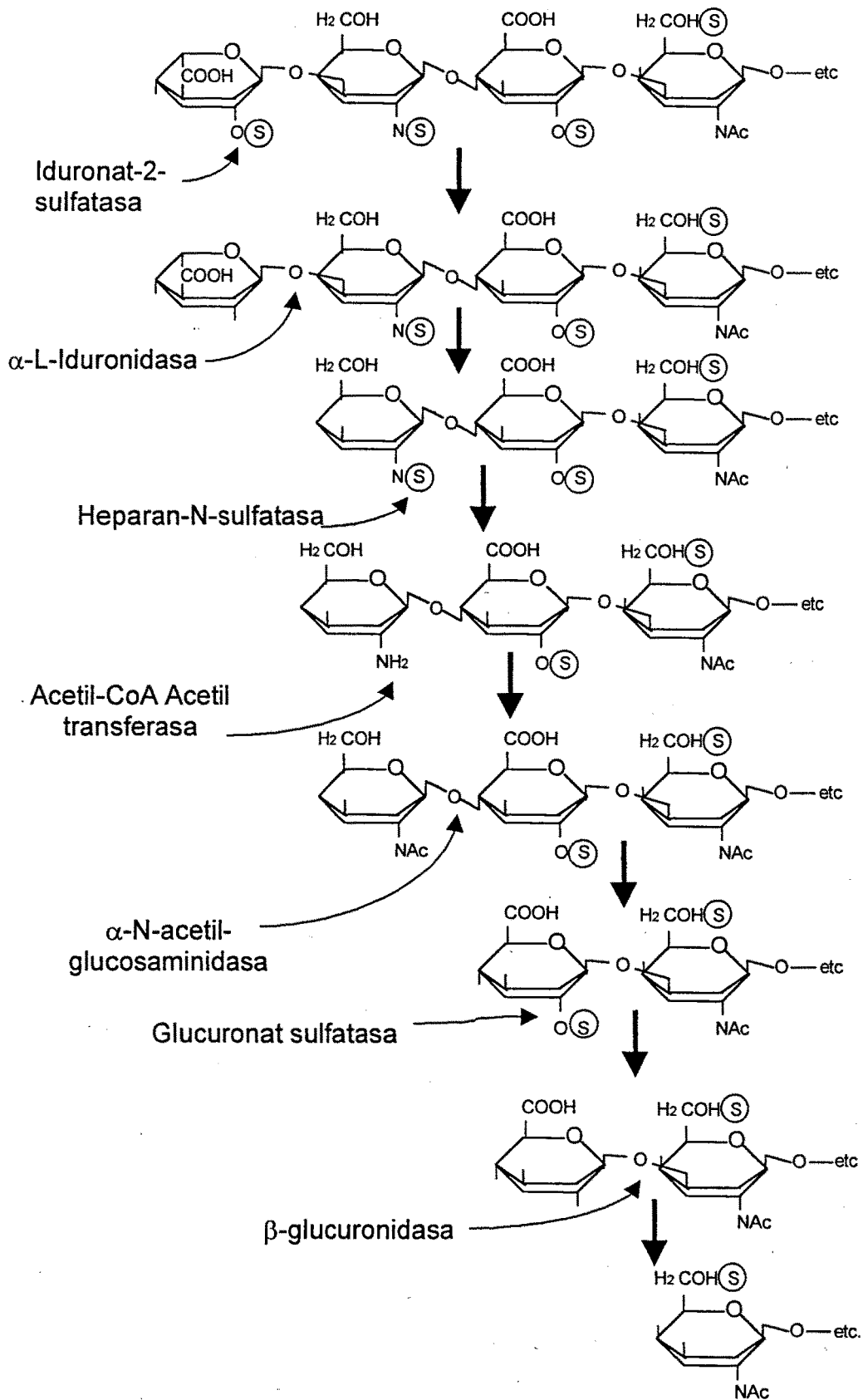


Figura 3. Via de degradació de l'heparan sulfat

L'enzim ha estat purificat i caracteritzat de ronyó humà (Rome i col, 1978), pulmó humà (Schuchman i col, 1984a i b), de fetge humà (Clements i col, 1985a i b) i porcí (Ohshita i col, 1989). La seqüència de la proteïna deduïda de la seqüència nucleotídica del cDNA que codifica per la α -L-iduronidasa humana, conté 653 aminoàcids, presenta sis llocs potencials de N-glicosilació que es creu que són tots utilitzats (Kakkis i col, 1994) i té un pèptid senyal de 26 aminoàcids que és tallat de la proteïna de 74KDa present en el fetge humà (Scott i col, 1991a). L'IDUA immunopurificat de fetge humà conté set bandes polipeptídiques quan es fa SDS/PAGE que representen parts d'un sol polipèptid IDUA i que s'han produït durant el processament proteolític del precursor de 74KDa (Clements i col, 1989). Aquesta forma predita de 74KDa, estaria d'acord amb la mida d'entre 75 i 81KDa pel precursor de l' α -L-iduronidasa secretat que s'havien vist en el marcatge biosintètic dels fibroblasts humans (Myerowitz i Neufeld, 1981; Taylor i col, 1991). L'enzim existeix com a monòmer i, com tots els enzims lisosòmics solubles, l' α -L-iduronidasa adquireix residus de manosa-6-fosfat per poder ésser dirigit cap al lisosoma on entra a través de receptors d'aquests residus (Myerowitz i Neufeld, 1981). La forma fosforilada i secretada de l' α -L-iduronidasa és idèntica al "factor corrector de Hurler" que s'havia vist que normalitzava la degradació dels glucosaminoglicans en fibroblasts de pacients amb MPS I (Neufeld, 1981).

S'ha detectat un sol mRNA de 2.7 Kb que codifica pels 653 aminoàcids de la proteïna, però també s'han descrit dos mRNAs que són el producte de la transcripció del gen *IDUA* però que han sofert un *splicing* alternatiu perdent l'exó II i el IV, respectivament. Aquesta deleció d'un exó, en cap dels dos casos, fa perdre la pauta de lectura i el resultat és una proteïna de 606 i de 617 aminoàcids respectivament (Scott i col, 1991a). Fins al moment es desconeix la funcionalitat d'aquestes dues proteïnes. També s'han vist altres *splicings* alternatius que es donen a nivells més baixos al gen *IDUA* (Bach i col, 1993; Scott i col, 1993a; Bunge i col, 1994).

S'han aïllat els cDNAs de l'IDUA caní i murí i tots dos tenen estructura similar al gen humà (Stoltzfus i col, 1992; Clarke i col, 1994a). La proteïna i el cDNA humà i caní presenten una homologia del 82%, mentre que entre l'IDUA humà i murí hi ha un 78% d'homologia en el cDNA i un 77% en la proteïna.

3.4. EL GEN DE L' α -L-IDURONIDASA (*IDUA*)

3.4.1. LOCALITZACIÓ

Tot i que al principi es va assignar el locus de l'*IDUA* al cromosoma 22 (Schuchman i col, 1982), posteriorment es va veure que el gen estava localitzat al cromosoma 4, al locus 4p16.3, per hibridació *in situ* i va ser reconfirmat per Southern blot (Scott i col, 1990). Va ser mapat després al locus D4S111, a 1.5-2 Mb del gen de la malaltia de Huntington i a 600 Kb del telòmer (MacDonald i col, 1991; Weber i col, 1991).

3.4.2. ESTRUCTURA DEL GEN

El gen que codifica per l'*IDUA* humana ocupa 19 Kb i té 14 exons que van des de 77pb a 217pb. Els dos primers exons estan separats per un intró de 566pb, un gran intró de, aproximadament, 13Kb separa els exons II i III, i els últims 12 exons estan en un zona de només 4.5Kb amb introns de 78 a 478pb (Scott i col, 1992a) (Figura 4).



Figura 4. Estructura del gen de l' α -L-iduronidasa

L'intró 2 de 13Kb de l'*IDUA* conté un element repetitiu *Alu* i un VNTR altament polimòrfic, utilitzat per descriure el locus D4S111 (Scott i col, 1991b i 1992b).

Totes les zones d'unió intró-exó d'*splicing* segueixen la regla "GT/AG" excepte l'intró 11 que és una excepció GC/AG. El promotor potencial de l'*IDUA* té només seqüències consens del tipus caixa-GC i pot tenir múltiples llocs d'inici de transcripció (CA), cosa que ratifica el fet que és un promotor de manteniment intern amb nivells baixos de transcripció.

3.5. VARIANTS DE SEQÜÈNCIA NO PATOGÈNIQUES DESCRITES AL GEN *IDUA*

S'han descrit uns 30 polimorfismes o variants de seqüència no patogèniques al gen *IDUA* (Bunge i col, 1994; Clarke i col, 1994b; Scott i col, 1991a i c; Scott i col, 1992b i f; Scott i col, 1993b; Scott i col, 1995), 18 dels quals són en exons incloent-hi 7 substitucions d'aminoàcid. És un nombre molt gran de polimorfismes si ho comparem amb els d'altres gens de mida similar que provoquen malaltia (veure Eisensmith i Woo, 1992).

Dels 30 polimorfismes només un és una inserció d'una C en una fila de nou Cs a l'intró 8. De la resta dels 29 canvis d'una sola base, 15 es donen en dinucleòtids CpG. A més, sis canvis d'aminoàcid són en residus que no estan conservats entre l'*IDUA* humà i el caní o el murí (Clarke i col, 1994a).

Cal destacar quatre polimorfismes que han estat de gran utilitat per descriure i caracteritzar algunes de les mutacions que provoquen la malaltia. Primer, un VNTR de 86 pb situat a l'intró 2, dels quals se n'han detectat 3 al·lels diferents en la població normal que corresponen a set, vuit i nou còpies del fragment de 86 pb, essent el més freqüent l'al·lel de vuit còpies (55%) i havent-se descrit per aquest polimorfisme un 60% d'heterozigositat (Scott i col, 1991b i 1992b). El segon polimorfisme a destacar és un canvi silenciós a l'exó III que afecta la primera base del codó que codifica per l'aminoàcid L118, aquest canvi destrueix una diana per l'enzim de restricció *KpnI*, de manera que, dels dos al·lels que es troben en població normal, el més freqüent és el que presenta la diana (78%); s'ha descrit una heterozigositat del 37% per aquest polimorfisme (Scott i col, 1991c). Aquests dos polimorfismes van servir a Scott i col. (1992c) per, al fer un estudi de freqüències d'haplotips i comparar-les entre la població normal i els pacients amb MPS I, veure que hi havia un desequilibri de lligament: la freqüència de l'al·lel [2,2] (VNTR, *KpnI*) en els pacients amb MPS I era del 57% mentre que en la població normal aquest al·lel només representava un 37%, van concloure que hi devia haver un al·lel majoritari que provocava la malaltia, i van postular que n'hi podia haver un segon ja que la freqüència de l'al·lel [2,1] també estava augmentada en els pacients. Posteriorment es van identificar les mutacions que estaven en desequilibri de lligament amb aquests al·lels i que, a més, eren molt freqüents en aquesta malaltia (Scott i col, 1992d i e) (veure seccions 3.6).

Els altres dos polimorfismes que cal destacar són dos RFLPs ambdós a l'exó I que han estat utilitzats per ampliar l'estudi d'haplotips realitzat amb el VNTR i el polimorfisme de l'exó III (Scott i col, 1992d). Es tracta d'un canvi silenciós que afecta l'última base del codó que codifica per l'aminoàcid A8 i que crea una diana de restricció per l'enzim *Eco47III*; l'al·lel que no té aquesta diana és el més freqüent en la població normal (72%) i s'ha descrit una heterozigositat del 39%. L'altre polimorfisme provoca un canvi d'aminoàcid, canviant de Glutamina a Histidina l'aminoàcid 33, i crea una diana de restricció per l'enzim *Nsp(7524)I*, essent l'al·lel més freqüent el que no presenta la diana (92%); presenta una heterozigositat del 16% (Scott i col, 1992f).

Amb la resta de polimorfismes no s'han fet estudis d'haplotips, però un cop descrits s'han utilitzat per elucubrar sobre l'efecte que aquests canvis poden tenir en la clínica dels pacients (Scott i col, 1993b i 1995).

3.6. MUTACIONS DESCRITES AL GEN *IDUA*

S'han descrit 46 mutacions diferents al gen de l'*IDUA* (per revisió veure Scott i col, 1995). Algunes d'elles s'han descrit en homozigosi associades a un fenotip en concret (Hurler, Scheie o Hurler/Scheie), però la majoria han estat descrites en heterozigosi amb dues mutacions altament freqüents, que per elles soles, en homozigosi o heterozigosi, acostumen a cobrir un alt percentatge dels al·lells dels pacients MPS I.

3.6.1. LA MUTACIÓ W402X

Scott i col. (1992c) van fer un estudi de freqüència d'haplotips amb els polimorfismes VNTR de l'intró 2 i l'RFLP *KpnI* de l'exó III i van comparar-los entre la població normal i pacients amb la malaltia de Hurler, va ser així com van poder veure que hi havia un desequilibri de lligament entre l'haplotip [2,2] (VNTR, *KpnI*) i la malaltia i que això indicaria que hi podia haver un al·lel majoritari causant de la malaltia. Aquest estudi va donar lloc a la descripció i caracterització de la mutació W402X (Scott i col, 1992d).

Es tracta d'un canvi de TGG a TAG al codó 402 que provoca la substitució d'un codó Triptòfan per un codó *Stop* a l'exó IX. La mutació crea una diana per l'enzim de restricció *MaeI* cosa que facilita molt la seva detecció.

En aquest treball, Scott i col. (1992d) estudien 64 pacients amb MPS I i troben la mutació W402X en un 31% dels al·lels. Posteriorment s'han fet estudis en altres poblacions d'aquesta mutació i la freqüència varia molt segons la població ja que pot anar des del 48% als europeus al 0% als japonesos i israelites (Taula 3).

És una mutació que està associada a un fenotip extremadament sever quan es troba en homozigosi. Els pacients que són heterozigots composts i que en un dels al·lels tenen aquesta mutació, presenten un ampli rang de fenotips clínics. El fet que aquesta mutació comporti un fenotip clínic sever és un dels factors que els autors del treball aconsellen de tenir en compte a l'hora d'aplicar qualsevol teràpia com ara el trasplantament de moll d'os per l'evolució que pot tenir el pacient.

Per intentar esbrinar si la mutació podria tenir un origen únic, ja que sempre s'havia vist associada a l'haplotip [2,2] (VNTR, *KpnI*), Scott i col. (1992d) van ampliar l'estudi d'haplotips afegint-hi dos polimorfismes més de l'exó I, els dos RFLPs que afecten dianes de restricció pels enzims *Eco47III* i *Nsp(7524)I* (veure secció 3.5). Els resultats obtinguts van indicar que la mutació estava associada a tres haplotips diferents: [1,1,2,2] (*Eco47III*, *Nsp(7524)I*, VNTR, *KpnI*), [1,2,2,2] i [2,1,2,2] i postulen que la possible explicació d'aquest fet és que, o bé la mutació es va originar més d'una vegada, o bé, més probablement, que hi ha hagut dues recombinacions intragèniques diferents en l'*IDUA*. Aquestes recombinacions han d'haver ocorregut als al·lels W402X en l'espai entre el polimorfisme VNTR de l'intró 2 i els polimorfismes *Eco47III* i *Nsp(7524)I* de l'exó I. Si ha estat així, el fet de que només en els 16 al·lels que ells estudien hi hagi hagut dues recombinacions indicaria que hi ha una alta freqüència de recombinació al gen *IDUA*; de totes maneres asseguruen que el gran nombre de polimorfismes descrits al gen ajudaran a acabar de confirmar aquesta hipòtesi.

3.6.2. LES MUTACIONS Q70X I P533R

Al mateix estudi d'Scott i col. (1992c) on es va veure que hi havia un desequilibri de lligament entre l'haplotip [2,2] (VNTR, *KpnI*) (veure seccions 3.5 i 3.6.1) i la malaltia de Hurler, es va veure que hi havia un segon haplotip, el [2,1], que també presentava una freqüència lleugerament superior als malalts de MPS I respecte els controls i es va postular que hi podria haver un segon al·lel, tot i que menys freqüent, que provoqués la malaltia.

Aquesta observació va donar lloc a la descripció de la mutació Q70X i, posteriorment, la mutació P533R, ja que aquesta no està exclusivament associada a l'haplotip [2,1] (Scott i col, 1992e).

La mutació Q70X és el resultat del canvi al codó 70 que codifica per una Glutamina (CAG) al codó *Stop* TAG, el resultat és l'acabament de la traducció ja a l'exó II donant una proteïna extremadament curta i d'activitat nul·la, ja que s'espera que sigui inestable i que no tingui capacitat d'unir i modificar el substrat. Els estudis posteriors que s'han fet han recolzat aquesta hipòtesi i, en efecte, els pacients que són homozigots per aquesta mutació presenten una clínica molt severa, així com els pacients que tenen de genotip Q70X / W402X; en canvi, els pacients heterozigots que a l'altre al·lel presenten qualsevol altra mutació, poden presentar tot el ventall de clíniques de la malaltia.

En aquest treball estudien 73 pacients i troben la mutació Q70X en un 15% dels al·lells, però en altres estudis fets en diferents poblacions s'ha trobat una gran varietat de freqüències de la mutació destacant el 62% identificat en escandinaus (Taula 3). A més, tal i com s'esperava, la mutació va sempre associada a l'haplotip [2,1] (VNTR, *KpnI*), però no van ampliar l'haplotip per comprovar si estava associada a més d'un.

La mutació P533R és deguda al canvi de C a G que altera el codó Prolina de la posició 533 (CCG) a codó Arginina (CGG) a l'exó XI. És una substitució no-conservativa d'un aminoàcid neutre per un aminoàcid bàsic, i s'ha pogut comprovar que els pacients homozigots per aquesta mutació presenten també clínica severa o tipus Hurler, així com els heterozigots que a l'altre al·lel presenten la mutació W402X, però en ambdós casos són menys severes que els homozigots per la mutació W402X o els pacients amb genotip W402X / Q70X. Com en el cas de la mutació Q70X, els heterozigots per la P533R poden presentar tot el ventall de clíniques de la malaltia. Per dades immunoquímiques en fibroblasts, s'ha vist que l'al·lel P533R produeix una proteïna IDUA inestable amb molt poca capacitat d'unir-se i modificar el substrat comparativament amb la de l'enzim normal (Scott i col, 1992e).

Després de caracteritzar 73 pacients amb MPS I, Scott i col. (1992e) han trobat la mutació P533R en sols un 3% dels al·lells, però en altres poblacions s'ha trobat amb més freqüència; cal destacar el 92% identificat en població marroquina (Taula 3).

Respecte els estudis d'haplotips, aquest mateix grup, descriu que la mutació P533R ha estat trobada tant associada amb l'al·lel [2,2] (VNTR, *KpnI*) com amb el [2,1], implicant que la mutació pot haver estat originada més d'una vegada o bé que hi pot haver hagut recombinació intragènica en l'*IDUA*. El fet que tres mutacions estiguin associades a cinc haplotips diferents reforcen la hipòtesi que al gen *IDUA* hi ha una alta freqüència de recombinació (veure secció 3.6.1) com s'ha pogut veure a la zona candidata pel gen de la malaltia de Huntington, situada també al cromosoma 4p16.3 (MacDonald i col, 1992).

TAULA 3. Freqüència (en percentatge) de les mutacions més prevalents del gen *IDUA* en grups de pacients de diferent origen ètnic i/o geogràfic

Grup de pacients	W402X	Q70X	P533R	Altres (%)	Referència
Europeus *	48	19	-	L218P (10)	Bunge i col. (1994)
(sense Escandinàvia)					
Escandinaus	17	62	-	-	Bunge i col. (1994)
Francesos	47	11	11	-	Comunicació personal
Anglo-saxons	31	15	3	-	Scott i col. (1992d i e)
Italians	11	13	11	G51D (9.3)	Gatti i col. (1997)
Russos	4	44	-	-	Krasnopolskaya i col. (1997)
Nord-americans	47	14.6	2.9	474-2a→g (5.7)	Clarke i col. (1994b)
Argentins	37	2	28	-	Matte i col. (1999)
Brasilers	29	2	12	A327P (7)	Matte i col. (1997,1999)
Marroquins	0	0	92	-	Alif i col. (1999)
Israelites	0	0	-	T366P (44)	Bach i col. (1993)
Japonesos	0	0	-	R89Q (24)	Yamagishi i col. (1996)

* Els autors no indiquen clarament l'origen de les mostres, però l'estudi es centra majoritàriament a Alemanya, Holanda i països centreeuropeus.

3.6.3. LES MUTACIONS R89Q I IVS5-7G→A (678-7G→A)

Les tres mutacions anteriors han estat descrites com a associades al fenotip sever de la malaltia, però s'han descrit fins a 17 mutacions que estan associades al fenotip lleu o intermedi, la majoria de les quals són mutacions *missense* (Scott i col, 1995). D'aquestes cal destacar-ne dues per la seva relativa alta freqüència ja que juntes representen el 40% dels al·lells en pacients Scheie: les mutacions R89Q i IVS5-7g→a (Scott i col, 1993a).

La mutació R89Q és deguda al canvi del codó CGG que codifica per una Arginina a la posició 89 de la proteïna pel codó CAG que codifica per una Glutamina. És una substitució no-conservativa d'un aminoàcid bàsic per un de polar neutre i el canvi de nucleòtid està situat a l'exó II del gen.

La mutació està associada a clínica lleu perquè en heterozigosi amb la W402X (severa) el pacient presenta aquesta clínica i perquè, per expressió *in vitro* de l'al·lel mutat, es veu l'activitat reduïda però amb un nivell residual relativament elevat. De totes maneres, en algun pacient s'ha trobat la mutació associada al polimorfisme A361T, i s'ha postulat que aquest pot potenciar l'efecte deleteri de la mutació provocant una clínica intermèdia (Scott i col, 1993a).

La R89Q s'ha trobat en un 2% dels al·lells dels pacients MPS I, encloent-hi els de clínica severa, però si tenim en compte només els de clínica Scheie representa el 20% dels al·lells (Scott i col, 1993a). En altres poblacions s'ha trobat en diferents freqüències, per exemple, als pacients italians s'ha trobat en un 1.9% dels al·lells (Gatti i col, 1997) i als pacients japonesos en un 24%, però si, en aquesta població, només tenim en compte els pacients Scheie, la R89Q representa el 50% dels al·lells i el 21.4% dels al·lells dels pacients Hurler/Scheie (Yamagishi i col, 1996).

La mutació IVS5-7g→a és un canvi que afecta l'intró 5, set bases abans de l'exó VI. És una mutació d'*splicing*, ja que el canvi de nucleòtid afecta negativament la zona acceptora d'*splicing* de l'intró i s'escull com a lloc preferent un *ag* situat 28 parells de bases abans de l'exó VI; això introdueix la inserció d'aquestes bases a l'mRNA i, com que canvia la pauta de lectura, es crea un codó Stop abans d'hora i en queda una proteïna truncada (Scott i col, 1993a). Altres autors han postulat que el nou lloc preferencial d'*splicing* és a cinc parells de bases de l'exó VI i no a 28 però cap de les dues proteïnes són funcionals ja que totes dues canvien la pauta de lectura i la proteïna queda truncada (Moskowitz i col, 1993). Ambdós autors destaquen que el nou lloc d'*splicing* no és utilitzat exclusivament, sinó que el normal també s'utilitza però amb menys proporció; això donaria una certa quantitat de proteïna normal que seria la que permetria causar clínica Scheie a aquesta mutació. El caràcter lleu de la mutació s'ha pogut reafirmar perquè els pacients heterozigots per la mutació i per la W402X presenten clínica lleu (Scott i col, 1993a).

Igual que la R89Q, la IVS5-7g→a és freqüent en els pacients Scheie: un 20% dels al·lells, mentre que representa un 2% dels al·lells del total dels pacients amb MPS I (Scott i col, 1993a).

3.6.4. ALTRES MUTACIONS

La resta de mutacions descrites fins ara s'han trobat en relativa poca freqüència i sols algunes, depenent de les poblacions estudiades, s'han trobat amb certa prevalència. D'aquestes destacarem la mutació T366P, que s'ha trobat en un 44% dels al·lels en pacients israelites i sempre en homozigosi (Bach i col, 1993), la mutació A327P que s'ha identificat en un 11% dels al·lels dels pacients d'Europa central (Scott i col, 1995), la mutació L218P que s'ha descrit en un 10% dels al·lels en població europea excloent-ne Escandinàvia (Bunge i col, 1994), la mutació G51D que és la quarta més freqüent (9.3%) després de les W402X, Q70X i P533R en població italiana (Gatti i col, 1997) i finalment destacarem les mutacions IVS3-2a→G (474-2a→g) i A75T que s'han trobat més prevalents (5.7% i 3.9% respectivament) que la P533R (2.9%) en població nord-americana (Clarke i col, 1994b).

3.6.5. FREQUÈNCIA DE LES MUTACIONS EN DIFERENTS POBLACIONS: EXISTÈNCIA D'UNA GENOCLINA?

Tal i com s'ha anat veient als apartats anteriors, les mutacions més prevalents, en general, són la W402X i la Q70X que es presenten amb diferents freqüències en les diverses poblacions (Taula 3). Les freqüències d'aquestes dues mutacions fora d'Europa és molt variada, des de l'absència absoluta d'ambdues mutacions als pacients japonesos fins a una certa freqüència, similar a la població europea, als nord-americans i brasilers. Però el què ha fet especular més han estat les freqüències observades a les diferents poblacions dins Europa: Rússia i Escandinàvia presenten una freqüència molt elevada de la Q70X (44% i 62% respectivament) mentre que la W402X és molt menys prevalent (4% i 17%) (Krasnopolskaya i col, 1997; Bunge i col, 1994); les poblacions anglo-saxona, francesa i europea en general (excloent-ne Escandinàvia), tenen una freqüència semblant de la W402X (31%, 47% i 48% respectivament) i molt més elevada que la de la mutació Q70X (15%, 11% i 19%); i la població italiana presenta unes freqüències més o menys comparables entre aquestes dues mutacions (11% de W402X i 13% de Q70X) i equivalents a la de la mutació P533R (11%).

Aquestes observacions han fet postular l'existència d'una genoclina descendent de la freqüència de la mutació Q70X des de Rússia i Escandinàvia cap al sud d'Europa (Bunge i col, 1994; Krasnopolskaya i col, 1997; Voskoboeva i col, 1997).

També s'ha vist que els malalts d'Europa Central i d'origen anglo-saxó tenen una freqüència elevada de la W402X respecte els països nòrdics i Itàlia (Bunge i col, 1994).

D'altra banda, les freqüències observades en les poblacions nord-americana (Clarke i col, 1994b), brasilera i argentina (Matte i col, 1999) poden ser un reflex de la procedència europea dels seus avantpassats (Scott i col, 1995).

3.7. PSEUDO-DEFICIÈNCIA DE L' α -L-IDURONIDASA

Taylor i Thomas (1993) van descriure la deficiència de l' α -L-iduronidasa en un individu clínicament normal. Si mesuraven l'activitat enzimàtica presentava un 10% d'activitat respecte els controls, però quan es feien estudis d'incorporació de sulfat marcat radioactivament, les cèl·lules en cultiu es comportaven amb tota normalitat, als mateixos nivells d'incorporació que les cèl·lules control; això es va interpretar com a pseudo-deficiència de l' α -L-iduronidasa en aquest individu.

Ja anteriorment s'havien descrit dos casos de pseudo-deficiència sense implicació patològica en dos heterozigots obligats per la malaltia de Hurler que presentaven un al·lel Hurler i l'altre que correspondria a una pseudo-deficiència (Gatti i col, 1985; Whitley i col, 1987).

El defecte genètic molecular que comportava la pseudo-deficiència per l' α -L-iduronidasa va ser descrit per Aronovich i col. (1996) en un pacient que presentava alhora deficiència per l'enzim iduronat-2-sulfatasa (malaltia de Hunter, veure apartat 4 i posteriors) i per l'enzim α -L-iduronidasa (la probabilitat de que les dues malalties es puguin donar alhora és d'aproximadament una en cinc bilions). El pacient presentava al cromosoma X una mutació freqüent en la malaltia de Hunter, la R468W (veure apartat 4.5.2.1) i al cromosoma 4 presentava un al·lel amb la W402X i l'altre amb una mutació nova, la A300T. La seva germana asimptomàtica era portadora per la R468W i tenia el mateix genotip que el seu germà respecte el gen *IDUA*. La noia presentava un metabolisme dels glucosaminoglicans absolutament normal, el que comportava que la A300T era la primera mutació descrita associada a la pseudo-deficiència de l'*IDUA*.

3.8. CORRELACIÓ GENOTIP-FENOTIP

L'espectre continu de fenotips clínics de sever a lleu en la malaltia de Hurler/Scheie és deguda molt probablement a combinacions de diferents al·lels mutants al locus *IDUA* (Neufeld i Muenzer, 1989; Hopwood i Morris, 1990).

El fet que moltes de les mutacions que s'han trobat als pacients MPS I s'hagin identificat en més d'un cas ajuda molt a intentar fer una correlació genotip-fenotip però, degut a la quantitat de mutacions descrites, molts dels pacients presenten combinacions d'aquestes i això dificulta aquesta correlació. A més a més, les descripcions dels fenotips, pel fet de procedir de diferents enfoccs clínics, a vegades són confuses, el què fa més difícil comparar les clíniques (Scott i col, 1995).

L'heterogeneïtat clínica, en la majoria de les malalties lisosòmiques, reflecteixen la taxa d'acumulació del substrat en diferents teixits (Neufeld, 1991). Les mutacions que causen una manca total d'enzim *IDUA* són heterogènies perquè hi ha moltes maneres de prevenir la funció enzimàtica, en canvi les mutacions que comporten una certa activitat enzimàtica i acostumen a ser mutacions *missense* o d'*splicing* que permeten la formació d'una certa quantitat d'enzim normal (Scott i col, 1995).

En general, però, qualsevol combinació de dues mutacions severes acostumen a provocar un fenotip sever; i les formes lleus o intermèdies solen ser degudes a la combinació d'un al·lel sever i un altre que presenti certa activitat residual. Però aquesta correlació no és lineal, ja que fins i tot en germans o en pacients amb genotip igual s'han pogut observar clíniques molt diferents (McDowell i col, 1993; Scott i col, 1993a).

Això fa que sols en algunes de les mutacions s'ha arribat a una correlació clara i se n'han pogut extreure algunes conclusions, ja sigui perquè s'ha descrit en molts pacients, perquè s'han trobat varis homozigots o pels estudis d'expressió. Per exemple, és clar que les mutacions W402X i Q70X estan sempre associades a un fenotip sever i que les mutacions R89Q i IVS5-7g→a estan associades a un fenotip més lleu (Scott i col, 1995).

En la MPS I, es pot observar la dependència de la dosi en el fet que la mutació P533R en homozigosi comporta fenotip intermedi, mentre que en heterozigosi amb la W402X comporta fenotip sever; també es pot veure amb la mutació R383H, ja que

aquesta en heterozigosi amb la Q70X presenta fenotip intermedi, mentre que un homozigot per la R383H presenta una clínica lleu (Scott i col, 1995).

D'altra banda, recentment, s'ha pogut establir una correlació genotip-fenotip mitjançant la cinètica enzimàtica i la immunoquantificació. Els pacients amb clínica Scheie acumulaven menys quantitat de glucosaminoglucans que els de clínica Hurler, i la capacitat catalítica de l'enzim estava directament relacionada amb la severitat del fenotip clínic (Bunge i col. 1998b).

3.9. EFECTE DELS POLIMORFISMES SOBRE EL FENOTIP

Tal i com s'ha vist (apartat 3.5), s'han descrit una trentena de polimorfismes o variants de seqüència no patogèniques al gen *IDUA*. Es desconeix l'efecte que qualsevol dels polimorfismes pot tenir, individualment o en combinació, sobre l'estabilitat i processament de l'mRNA de l'*IDUA*, sobre la taxa de traducció de la proteïna o sobre l'activitat, estabilitat i transport de la proteïna. De totes maneres, aquests polimorfismes són, segurament, un factor que contribueix a la variació de l'activitat de l'*IDUA* observada en individus sans. Una possible explicació de l'ampli marge d'activitat de l'*IDUA* que s'ha vist en fibroblasts humans controls (Ashton i col, 1992) o dels al·lels no patogènics que produeixen nivells baixos d'activitat i que compliquen la interpretació de l'estudi enzimàtic en el diagnòstic prenatal (Gatti i col, 1985; Whitley i col, 1987; Taylor i Thomas, 1993), seria la presència de polimorfismes que alteren aminoàcids individualment o les combinacions de varis polimorfismes. En efecte, s'ha postulat que una acumulació de variants de seqüència normalment no patogènics podria ser la responsable d'alguns dels al·lels lleus de la malaltia (Scott i col, 1995).

Està acceptat que diferències en el fons genètic i ambiental, poden, en part, explicar les diferències en el fenotip clínic de pacients amb el mateix genotip per la malaltia (per revisió Neufeld, 1991). Algunes de les mutacions que s'han trobat en varis pacients estan associades a més d'un haplotip (per exemple la W402X, la P533R o la R89Q), i per tant tenen un fons genètic diferent (Scott i col, 1992d i e, i 1993a; Clarke i col, 1994b). S'ha hipotetitzat que, especialment els polimorfismes Q33H i A361T, poden jugar un paper molt important en modular l'efecte de les mutacions causants de la malaltia i alterar el fenotip clínic (Scott i col, 1993a i b).

Així doncs, és molt probable que un dels polimorfismes o una combinació d'aquests puguin modular l'expressió de les mutacions "primàries", i és per això que, quan es fan estudis d'expressió de mutacions de canvi de sentit per intentar establir una correlació amb el fenotip, s'ha d'anar amb molt de compte ja que els polimorfismes associats a la mutació poden afectar l'estabilitat de l'mRNA mutat (Scott i col, 1995).

3.10. TERÀPIA

3.10.1. TRASPLANTAMENT DE MOLL D'OS

El 8 d'Abril de 1980 es va fer el primer trasplantament de moll d'os per tractar la malaltia de Hurler a un nen de nou mesos (Hobbs i col, 1981), tot i que el pacient era homozigot per la mutació W402X, indicatiu de fenotip sever, avui dia presenta una intel·ligència en el rang normal-baix i utilitza un ordinador en la seva feina (Vellodi i col, 1997).

Des d'aquest moment, han estat molts els pacients que han estat trasplantats i se n'ha fet un seguiment per extreure'n conclusions (Hopwood i col, 1993b; Whitley i col, 1993b; Peters i col, 1996 i 1998a; Guffon i col, 1998).

En general s'està d'acord amb què quan més aviat es faci el trasplantament, millors resultats s'obtenen i que cal escollir amb molt de compte els pacients als quals s'aplicarà el tractament, sobretot per l'afectació cerebral que presentin al moment de fer el trasplantament, perquè d'això en depèn la millora dels trets clínics.

Als pacients que han sobreviscut al trasplantament, s'observa un alentiment (o fins i tot aturada) de la regressió psicomotora, millora dels trets facials dismòrfics i de la sordesa, resolució de l'hepatoesplenomegàlia, millora de l'afectació cardíaca (Gatzoulis i col, 1995), una prolongació de la supervivència i, si es fa el trasplantament abans de que hi hagi dany cerebral, una preservació de la intel·ligència. En canvi s'observa la progressió de la disostosi múltiple, sovint les anomalies esquelètiques requereixen correcció ortopèdica, el creixement és molt pobre (són baixos d'estatura), el desenvolupament sexual és més lent, i l'opacitat corneal persisteix (Huang i col, 1996; Guffon i col, 1998) amb algunes excepcions descrites (Summers i col, 1989; Christiansen i col, 1990).

Tot i que la millora dels pacients després d'un trasplantament exitós no és absoluta, fins avui el trasplantament de moll d'os és l'única teràpia efectiva per la malaltia de Hurler (per revisió veure Peters i col, 1998b).

3.10.2. TERÀPIA GÈNICA

La mucopolisacaridosi de tipus I és una bona candidata per a la teràpia gènica però aquest tractament està encara als seus estudis inicials.

S'ha intentat ja en gossos (Shull i col, 1996), als quals de primer se'ls va injectar intramuscularment un plasmidi que codificava pel cDNA de l' α -L-iduronidasa canina, però no es va detectar producció de l'enzim i en canvi els va sensibilitzar immunològicament a la proteïna IDUA. Després es van fer créixer mioblasts a partir de biòpsies de múscul esquelètic i es van transduir amb un vector retrovíric que contenia el gen caní sota el control del promotor de la creatina quinasa. Després d'observar que realment es sobreexpressava l'enzim es van reintroduir les cèl·lules als gossos, però la producció va declinar ràpidament. Es va veure que això era degut a la producció d'anticossos contra l'enzim, i a mesura que passaven les setmanes cada cop hi havia menys mioblasts que presentaven la seqüència de l' α -L-iduronidasa canina. Es va concloure que cal tenir en compte la resposta immune quan s'intenta la teràpia gènica. Lutzko i col. (1999) van obtenir els mateixos resultats en proves similars.

Un altre estudi va introduir el cDNA de l' α -L-iduronidasa humana en un vector retrovíric i es va utilitzar per transduir moll d'os de pacients amb la malaltia de Hurler/Scheie. L'expressió de l'enzim *in vitro* va ser un èxit, i es va veure que si es cultivava el moll d'os a llarg termini, es mantenien alts nivells d'expressió de l'enzim durant varis mesos. Van concloure que la transferència retrovívica del gen a moll d'os humà podia oferir esperances per la teràpia gènica de la malaltia de Hurler en pacients joves que no tinguessin un donador compatible (Fairbairn i col, 1996). Recentment, també, s'ha estat estudiant l'eficàcia de vectors de virus recombinants adeno-associats per corregir el defecte enzimàtic en fibroblasts MPS I, s'ha demostrat l'eficàcia d'aquests vectors per lliurar i expressar seqüències del gen *IDUA* humà, i, per tant, per un possible tractament de la malaltia de Hurler (Hartung i col, 1999).

A l'actualitat hi ha dos protocols de teràpia gènica aprovats, tots dos estan als estadis inicials i encara no s'ha tractat cap pacient. Un s'està duent a terme a França pel Dr. Alain Fischer i l'altre al Regne Unit pel Dr. LS Lashford. Ambdós utilitzen vectors retrovírics però a França es vol utilitzar via intraperitoneal amb fibroblasts com a cèl·lules diana mentre que al Regne Unit es vol fer via trasplantament de moll d'os i les cèl·lules diana seran les del moll d'os (per més informació consultar la pàgina web <http://www.wiley.co.uk/genetherapy>).

3.10.3. TERÀPIA DE SUBSTITUCIÓ ENZIMÀTICA (TSE)

La teràpia de substitució enzimàtica és una altra de les possibles teràpies a aplicar en malalts de MPS I. S'han realitzat diferents estudis en malalties lisosòmiques i, fins ara, ja s'aplica amb èxit en el tractament de la malaltia de Gaucher (Pastores i col, 1993).

En un model caní de MPS I, la TSE va provocar la disminució de producte emmagatzemat al fetge, a la melsa i al ronyó; en canvi es va veure que el cervell, el cor i la còrnia eren òrgans que presentaven més dificultats, ja que no es va aconseguir la reducció de l'acumulació de GAGs (Shull i col, 1994). Igualment, es va veure que la TSE corregia la patologia en un model murí de MPS I (Clarke i col, 1999).

Recentment s'ha iniciat l'aplicació de TSE en un grup de 10 pacients amb aquesta malaltia i, després d'un any de seguiment, els resultats són força esperançadors, ja que en tots ells s'ha reduït l'hepatoesplenomegàlia i ha disminuït l'excreció de GAGs en orina; la resta de trets clínics també han millorat en la majoria dels pacients tractats (Kakkis i col, 1999).

Tot i aquests resultats, un dels problemes més importants que presenta la TSE és la resposta immunològica del pacient, que pot fer reduir molt l'eficàcia de la teràpia (Brooks, 1999).

3.11. MODELS ANIMALS

Els primers models animals de la malaltia de Hurler van ser descrits en un gat (Haskins i col, 1979) i en un gos (Shull i col, 1982). En el model caní s'han realitzat diferents estudis per avaluar els resultats de les possibles teràpies. Així, se li va intentar el trasplantament de moll d'os (Shull i col, 1987) i, més recentment, s'ha

utilitzat per dur a terme diferents proves com a experiments inicials de teràpia gènica (veure apartat 3.10.2) (Shull i col, 1996; Lutzko i col, 1999) i de TSE (Shull i col, 1994).

El model caní presenta trets clínics similars als que presenten els pacients amb MPS I de clínica moderada a severa, amb acumulació de glucosaminoglicans als lisosomes de la majoria de cèl·lules. Els símptomes del model caní inclouen anormalitats cardíques progressives, emmagatzemament lisosòmic al sistema nerviós central, opacitat corneal, anomalies esquelètiques, afectació de les articulacions progressiva, i progressió de la malaltia fins a un estat tan sever que fa necessària l'eutanàsia entre els 1 i 3 anys de vida (Shull i col, 1982).

Recentment s'ha aconseguit el model murí per la malaltia (Clarke i col, 1997).

4. LA MALALTIA DE HUNTER

4.1. DESCRIPCIÓ

La malaltia de Hunter o mucopolisacaridosi de tipus II (MPS II, MIM 309900) és una malaltia hereditària d'acumulació lisosòmica produïda per la deficiència de l'enzim Iduronat-2-sulfatasa. Aquest enzim participa en la degradació dels glucosaminoglicans heparan sulfat i dermatan sulfat i, per tant, la seva deficiència provoca l'acumulació en les cèl·lules d'aquests metabolits a mig degradar i són els causants del deteriorament i empitjorament clínic de forma progressiva. També se n'observa l'excreció en orina.

És una malaltia hereditària recessiva lligada al cromosoma X i les dones portadores són totalment asimptomàtiques.

La malaltia va ser descrita el 1917 per C. Hunter (Hunter, 1917) que va observar una malaltia rara en dos germans que semblava lligada al cromosoma X, però van ser Bach i Sjöberg, per separat i alhora, els que van descriure que la causant de la malaltia era la deficiència de l'enzim iduronat-2-sulfatasa (Bach i col, 1973; Sjöberg i col, 1973).

4.2. CLÍNICA

En la malaltia de Hunter es poden distingir dues clíniques diferenciades, lleu i severa, que són els extrems d'un ampli espectre de severitat.

4.2.1. FORMA SEVERA

El tipus sever de la malaltia de Hunter està caracteritzat per trets facials toscos, baixa estatura, deformacions esquelètiques, rigidesa de les articulacions i retard mental. La malaltia sol manifestar-se entre els 2 i els 4 anys de vida amb un retard en el desenvolupament somàtic i neurològic progressiu (Young i Harper, 1983).

Els pacients poden presentar degeneració de retina severa però la còrnia es manté clara. Alguns dels pacients joves també presenten diarrea crònica deguda a l'afectació del sistema nerviós autònom i potser també a la disfunció de la mucosa. També solen patir infeccions recurrents d'orella i pèrdua d'audició progressiva. El deteriorament del sistema nerviós central pot veure's accelerat per la hidrocefàlia comunicant que incrementa la pressió intracranial des dels 7 als 10 anys. Aquesta

hidrocefàlia pot presentar-se ja quan es diagnostica el pacient i va progressant al llarg dels anys.

El deteriorament neurològic estès precedeix la mort, que sol tenir lloc entre els 10 i els 15 anys de vida. Les causes que acostumen a provocar la mort solen ser l'obstrucció respiratòria o fallades cardíaques degudes a la disfunció valvular, a l'engruiximent del miocardi, a la hipertensió pulmonar, o a l'estretament de les artèries coronàries.

4.2.2. FORMA LLEU

Els pacients amb la forma lleu de la malaltia poden desenvolupar una clínica semblant a la dels pacients severos però amb una progressió molt més lenta, a més, acostumen a preservar la intel·ligència i arriben a l'edat adulta (Young i Harper, 1982b).

La majoria pateixen de sordesa i han de dur aparell auditiu. També és comú la síndrome del túnel carpià i la rigidesa de les articulacions que pot arribar a provocar la pèrdua funcional total. Es poden observar opacitats cornials molt discretes i no es sol observar hidrocefàlia. Les històries familiars d'aquesta malaltia són molt més comuns en el cas de la forma lleu de la malaltia que no en la forma severa.

Els pacients amb clínica lleu poden arribar a viure fins als cinquanta o seixanta anys i, de fet, el pacient conegut que ha viscut més ha arribat als 87 anys (Hobolth i Pedersen, 1978). De totes maneres, solen morir d'hora en l'edat adulta i normalment degut a fallada cardíaca o a obstrucció respiratòria.

4.2.3. HETEROGENEÏTAT CLÍNICA

Malgrat diferenciem aquests dos tipus de clínica, cal remarcar que la malaltia de Hunter es caracteritza per una gran heterogeneïtat clínica, de manera que podem trobar des de pacients amb clíniques molt lleus a pacients amb clíniques molt severes. S'ha hagut de fer un esforç per, a nivell de publicacions internacionals, establir uns criteris bàsics per poder diferenciar les clíniques i classificar-les en lleu, intermèdia i severa i, tot i així, continuen havent-hi diferències a nivell d'autors per tenir més en compte l'afectació neurològica o l'afectació somàtica a l'hora de classificar els pacients. Bàsicament, però, s'han utilitzat els criteris següents: *lleu* per als pacients amb la intel·ligència preservada i trets somàtics típics però no massa severos; *intermedi* per als pacients amb símptomes típics i retard mental de grau mig,

normalment arriben a parlar però amb l'edat la seva capacitat cognitiva va declinant gradualment; i sever per als pacients amb retard mental sever i trets somàtics molt agreujats, normalment són diagnosticats abans dels dos anys de vida i no arriben a parlar o només aprenen unes quantes paraules (Bunge i col, 1993).

4.3. LA IDURONAT-2-SULFATASA

La deficiència de l'enzim iduronat-2-sulfatasa (IDS, EC 3.1.6.13) és la que provoca la malaltia de Hunter. Aquest enzim talla el grup sulfat de la posició 2 de l'àcid idurònic del dermatan sulfat (Figura 2) i de l'heparan sulfat (Figura 3). La degradació d'aquests dos glucosaminoglicans (GAGs) queda aturada, doncs, en aquest pas i els productes a mig degradar s'acumulen a les cèl·lules causant el progressiu mal funcionament cel·lular i tisular que provocaran la clínica típica de la malaltia. També part d'aquests GAGs seran excretats per l'orina, fet que s'utilitza per l'orientació del diagnòstic.

L'enzim va ser estudiat, al principi, com al "factor corrector de la malaltia de Hunter", que normalitzava la degradació defectuosa dels glucosaminoglicans als fibroblasts dels pacients Hunter (Neufeld, 1981). La IDS ha estat purificada de plasma humà (Wasteson i Neufeld, 1982), placenta (DiNatale i Daniele, 1985) i fetge (Bielicki i col, 1990). És en fetge on es van identificar les dues formes majoritàries, A i B, amb pI 4.5 i <4 respectivament. Ambdues formes contenen polipèptids de pes molecular de 42 KDa i 14 KDa. Es van comparar amb la IDS purificada de ronyó, placenta i pulmó i van veure que la forma A tenia el pes molecular nadiu i les subunitats similars en aquests teixits als observats en l'enzim de fetge. Les dues formes A i B són actives davant una varietat de substrats derivats de l'heparan sulfat i el dermatan sulfat.

S'ha aïllat i seqüenciat un clon de cDNA de 2.3Kb que conté tota la seqüència codificant del gen *IDS* humà (Wilson i col, 1990). Analitzant el precursor de 550 aminoàcids, s'ha vist que la proteïna té un pèptid senyal de 25 aminoàcids que és de reconeixement d'entrada al reticle endoplasmàtic, seguit de 8 aminoàcids més que són escindits de la proproteïna, i set llocs potencials de glicosilació. Del procés de maduració en sortien dos polipèptids de 42 KDa i 14 KDa.

S'ha pogut veure que la IDS té una gran homologia de seqüència amb les arilsulfatases A, B i C i la glucosamina-6-sulfatasa humanes (Wilson i col, 1990).

S'han identificat tres mRNAs de 5.7, 5.4 i 2.1 Kb en placenta humana i recentment s'ha identificat un transcrit alternatiu de 1.4 Kb que conté els set primers exons del gen i li manca els dos últims exons. Encara no és clara la funcionalitat que la proteïna codificada per aquest transcrit pot tenir i el paper que pot jugar en l'heterogeneïtat clínica de la malaltia de Hunter (Malmgren i col, 1995). D'altra banda s'ha vist que els tres transcrits descrits del gen *IDS*, de 5.7, 5.4 i 2.1 Kb, contenen la seqüència sencera de la proteïna i són deguts a la utilització de diferents senyals de poliadenilació (Cudry i col, 1997 i 1999).

S'ha expressat el cDNA de la *IDS* i l'enzim recombinant obtingut s'ha pogut veure que és endocitat dins de fibroblasts d'un pacient Hunter via el receptor manosa-6-fosfat, s'ha localitzat al compartiment lisosòmic i s'ha vist com corregia l'emmagatzemament de GAGs a mig degradar que produïa fenotip Hunter en aquestes cèl·lules (Bielicki i col, 1993).

4.4. EL GEN DE LA IDURONAT-2-SULFATASA (*IDS*)

4.4.1. LOCALITZACIÓ

El gen *IDS* ha estat localitzat al braç llarg del cromosoma X, a Xq28 (Wilson i col, 1991). S'han descrit varis marcadors polimòrfics propers al gen que s'han utilitzat per estudis de portadors, i s'ha establert un mapa de la zona: Xcen – DXS369 – DXS297 – DXS1215 – DXS296 – DXS731 – DXS1123 – *IDS* / DXS466 – DXS1113 – DXS304 – Xqter (Hulsebos i col, 1991; Suthers i col, 1991; Steglich i col, 1993; Timms i col, 1995; GDB ID G00-141-899). El DXS296 és a unes 800 Kb del gen (Wilson i col, 1991); s'ha postulat que el DXS466 és intragènic i que és en un intró (Steglich i col, 1993); el DXS1113 és molt proper al gen, a unes 10kb (Timms i col, 1995) i el DXS304 no és a més de 900 Kb (Beck i col, 1992).

4.4.2. ESTRUCTURA DEL GEN

Flomen i col. (1993) van donar l'estructura del gen. Té nou exons i vuit introns (Figura 5). Les zones donadores i acceptores d'*splicing* compleixen les seqüències GT/AG. La seqüència sencera del gen ocupa unes 24 Kb. El promotor potencial per la *IDS* no presenta la caixa TATA però conté una seqüència consensus de caixa GC, que recolza el seu paper com a gen de manteniment intern (Wilson i col, 1993).

El gen *IDS* està en direcció 5'-3' de telòmer a centròmer, per tant, l'exó I està a l'extrem telomèric (Bondeson i col, 1995a).

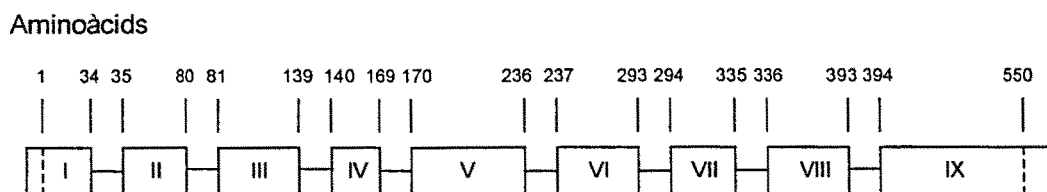


Figura 5. Estructura del gen de l'Iduronat-2-sulfatasa (*IDS*)

4.4.3. LLOCS CATALÍTICS DE LA PROTEÏNA

Comparant la seqüència del gen amb la d'altres sulfatases i tenint en compte la distribució de les mutacions que provoquen la malaltia, s'ha postulat que l'exó III del gen pot codificar per una zona important per la proteïna per la hidròlisi dels ésters de iduronat-2-sulfat presents en el dermatan sulfat i l'heparan sulfat (Wilson i col, 1990; Hopwood i col, 1993a).

4.5. MUTACIONS DESCRITES AL GEN *IDS*

4.5.1. GRANS DELECIONS I REORDENAMENTS

Des de bon principi es va veure que les grans delecions i reordenaments jugaven un paper important en la malaltia de Hunter. Es va descriure que un 20% del pacients tenien aquest tipus de mutacions, que anaven des de delecions totals del gen, a delecions de un o més exons, reordenaments i inversions (Bunge i col, 1993). Les mutacions més freqüents solen ser les delecions totals del gen i la delecio dels exons V-VII, aquesta última deguda, probablement, a dos punts vulnerables de trencament (Steén-Bondeson i col, 1992; Ben Simon-Schiff i col, 1994). Recentment, també, s'ha descrit un delecio de 178 pb situada en la zona promotora del gen que aboleix l'expressió del gen *IDS* (Timms i col, 1998).

D'altra banda també s'ha descrit que molt sovint els pacients que presenten delecio total del gen també els manca el marcador DXS1113, i s'ha postulat que hi pot haver un lloc de trencament preferencial entre aquest marcador i el DXS304 (Biro i col, 1996).

4.5.2. MUTACIONS PUNTUALS

Fins a l'actualitat s'han descrit més de dues-centes mutacions puntuals diferents al gen de l'iduronat-2-sulfatasa. S'ha vist que, en aquesta malaltia, quasi cada família té una mutació particular i sols algunes de les mutacions descrites s'han trobat en més d'un pacient.

4.5.2.1. Mutacions de canvi de sentit (*missense*)

Són la majoria de les mutacions descrites en el gen *IDS*, representen el 49.1% de les mutacions puntuals (Taula 4). Sols un 20% d'aquestes mutacions han estat descrites en més d'un pacient, la resta són mutacions particulars. Cal destacar que no hi ha cap mutació de canvi de sentit descrita a l'exó I. També s'ha parlat que certs codons són altament mutables, com per exemple el R468, en el qual s'han descrit quatre mutacions diferents (R468W, R468G, R468L i R468Q), en aquest cas s'ha dit que pot ser un punt calent CpG altament susceptible de ser mutat (Schröder i col, 1994).

Taula 4. Mutacions de canvi de sentit (*missense*) del gen *IDS*. NS- No se sap

Mutació	Exó	Clínica	Canvi de nucleòtid	De	A	Referències
D45N	II	lleu	GAT->AAT	Asp	Asn	Vafiadaki i col. (1998)
R48P	II	lleu	CGC->CCC	Arg	Pro	Sukegawa i col. (1995), Isogai i col. (1998)
Y54D	II	severa	TAT->GAT	Tyr	Asp	Karsten i col. (1998b) Voskoboeva i col. (1998)
N63D	II	lleu	AAT->GAT	Asn	Asp	Villani i col. (1997) Goldenfum i col. (1996) Rathmann i col. (1996) Karsten i col. (1998b)
A68E	II	severa	GCA->GAA	Ala	Glu	Schroder i col. (1994)
S71N	II	lleu	AGC->AAC	Ser	Asn	Froissart i col. (1998)
S71R	II	NS	AGC->AGA	Ser	Arg	Li i col. (1994, 1999)
L73F	II	NS	CTC->TTC	Leu	Phe	Lissens i col. (1997)
A79E	II	lleu	GCG->GAG	Ala	Glu	Karsten i col. (1998b) Voskoboeva i col. (1998)
A82E	III	NS	GCA->GAA	Ala	Glu	Li i col. (1999)
A85T	III	lleu	GCC->ACC	Ala	Thr	Rathmann i col. (1996) Isogai i col. (1998) Froissart i col. (1998) Li i col. (1999)
A85S	III	severa	GCC->TCC	Ala	Ser	Froissart i col. (1998)
P86R	III	severa	CCG->CGG	Pro	Arg	Bunge i col. (1993) Goldenfum i col. (1996) Karsten i col. (1998a) Millat i col. (1998)
P86L	III	Intermedi	CCG->CTG	Pro	Leu	Popowska i col. (1995) Isogai i col. (1998) Balzano i col. (1998) Froissart i col. (1998) Vafiadaki i col. (1998) Karsten i col. (1998a) Millat i col. (1998)
P86Q	III	severa	CCG->CAG	Pro	Gln	Rathmann i col. (1996)
S87N	III	lleu	AGC->AAC	Ser	Asn	Popowska i col. (1995)
R88C	III	severa	CGC->TGC	Arg	Cys	Rathmann i col. (1996) Karsten i col. (1998a) Li i col. (1999) Bellows i Thompson (1999) Moreira da Silva i col. (1999)
R88H	III	severa	CGC->CAC	Arg	His	Rathmann i col. (1996) Goldenfum i col. (1995) Balzano i col. (1998) Froissart i col. (1998) Karsten i col. (1998b)
R88P	III	severa	CGC->CCC	Arg	Pro	Balzano i col. (1998)
R88G	III	severa	CGC->AGC	Arg	Gly	Froissart i col. (1998)
R88L	III	severa	CGC->CTC	Arg	Leu	Karsten i col. (1998b)
L92P	III	severa	CTC->CCC	Leu	Pro	Popowska i col. (1995)
G94D	III	lleu	GGC->GAC	Gly	Asp	Bunge i col. (1993)
R95G	III	intermedi	AGG->GGG	Arg	Gly	Goldenfum i col. (1996)
L102R	III	lleu	CTG->CGG	Leu	Arg	Karsten i col. (1998b) Voskoboeva i col. (1998)
Y108C	III	lleu	TAC->TGC	Tyr	Cys	Rathmann i col. (1996)
Y108S	III	lleu	TAC->TCC	Tyr	Ser	Froissart i col. (1998)
N115Y	III	lleu	AAC->TAC	Asn	Tyr	Vafiadaki i col. (1998)
T118I	III	lleu	ACC->ATC	Thr	Ile	Balzano i col. (1998) Froissart i col. (1998)
P120R	III	severa	CCC->CGC	Pro	Arg	Bunge i col. (1993)
P120H	III	lleu	CCC->CAC	Pro	His	Muenzer i col. (1992)
Q121H	III	NS	CAG->CAC	Gln	His	Lissens i col. (1997)
Q121R	III	severa	CAG->CGG	Gln	Arg	Froissart i col. (1998)
E125V	III	molt lleu	GAG->GTG	Glu	Val	Rathmann i col. (1996)
S132W	III	severa	TCG->TGG	Ser	Trp	Jonsson i col. (1995) Lissens i col. (1997)
G134R	III	severa	GGA->CGA	Gly	CGA	Rathmann i col. (1996)
K135R	III	intermedi	AAA->AGA	Lis	Arg	Bunge i col. (1993)
K135N	III	Intermedi	AAA->AAT	Lys	Asn	Popowska i col. (1995)
H138D	III	intermedi	CAC->GAC	His	Asp	Froissart i col. (1998)
S143F	IV	severa	TCT->TTT	Ser	Phe	Karsten i col. (1998a) Vallance i col. (1999)
D148H	IV	intermedi	GAT->CAT	Asp	His	Froissart i col. (1998)

Mutació	Exó	Clínica	Canvi de nucleòtid	De	A	Referències
H159P	IV	severa	CAT->CCT	His	Pro	Karsten i col. (1998b) Voskoboeva i col. (1998)
P160R	IV	NS	CCT->CGT	Pro	Arg	Flomen i col. (1992)
L182P	V	intermedi	CTG->CCG	Leu	Pro	Isogai i col. (1998)
C184F	V	lleu/int	TGC->TTC	Cys	Phe	Rathmann i col. (1996)
C184W	V	severa	TGC->TGG	Cys	Trp	Karsten i col. (1998a)
L196S	V	Lleu/int	TTG->TCG	Leu	Ser	Isogai i col. (1998) Karsten i col. (1998b)
D198G	V	lleu	GAC->GGC	Asp	Gly	Karsten i col. (1998b) Voskoboeva i col. (1998)
A205P	V	intermedi	GCC->CCC	Ala	Pro	Goldenfum i col. (1996)
L221P	V	intermedi	CTG->CCG	Leu	Pro	Bunge i col. (1993)
G224E	V	severa	GGG->GAG	Gly	Glu	Karsten i col. (1998b) Voskoboeva i col. (1998)
Y225D	V	intermedi	TAT->GAT	Tyr	Asp	Isogai i col. (1998)
K227Q	V	severa	AAG->CAG	Lys	Gln	Hopwood i col. (1993a)
K227M	V	intermedi	AAG->ATG	Lys	Met	Isogai i col. (1998)
P228L	V	intermedi	CCA->CTA	Pro	Leu	Vafiadaki i col. (1998)
H229Y	V	severa	CAC->TAC	His	Tyr	Jonsson i col. (1995)
H229R	V	int/sev	CAC->CGC	His	Arg	Froissart i col. (1998)
D252N	VI	nd	GAT->AAT	Asp	Asn	Rathmann i col. (1996) Karsten i col. (1998a)
Y264N	VI	NS	TAC->GAC?	Tyr	Asn	Hartog i col. (1999)
N265K	VI	severa		Asn	Lys	Goldenfum i col. (1995)
P266H	VI	lleu	CCC->CAC	Pro	His	Villani i col. (1995) Balzano i col. (1998) Coppa i col. (1999)
P266R	VI	severa	CCC->CGC	Pro	Arg	Vafiadaki i col. (1998)
D269V	VI	lleu	GAC->GTC	Asp	Val	Karsten i col. (1998a)
Q293H	VI	lleu	CAG->CAC	Gln	His	Schroder i col. (1994)
D308N	VII	intermedi	GAT->AAT	Asp	Asn	Isogai i col. (1998)
L314P	VII	severa	CTC->CCC	Leu	Pro	Isogai i col. (1998)
S333L	VII	severa	TCG->TTG	Ser	Leu	Flomen i col. (1992) Sukegawa i col. (1995) Goldenfum i col. (1995) Olsen i col. (1996) Rathmann i col. (1996) Li i Thompson (1996a) Isogai i col. (1998) Froissart i col. (1998) Vafiadaki i col. (1998) Li i col. (1999) Karsten i col. (1998b) Bellows i Thompson (1999)
D334Y	VII	NS		Asp	Tyr	Goldenfum i col. (1995)
D334N	VII	lleu	GAT->AAT	Asp	Asn	Froissart i col. (1998)
D334G	VII	severa	GAT->GGT	Asp	Gly	Li i col. (1999)
H335R	VII	intermedi	CAT->CGT	His	Arg	Froissart i col. (1998)
G336E	VIII	severa	GGG->GAG	Gly	Glu	Froissart i col. (1998)
G336R	VIII	NS	GGG->AGG	Gly	Arg	Li i Thompson (1996a) Lissens i col. (1997)
W337R	VIII	intermedi	TGG->CGG	Trp	Arg	Sukegawa i col. (1995) Isogai i col. (1998)
L339R	VIII	severa	CTA->CGA	Leu	Arg	Froissart i col. (1998)
G340D	VIII	lleu	GGT->GAT	Gly	Asp	Karsten i col. (1998a) Karsten i col. (1998b) Voskoboeva i col. (1998)
E341K	VIII	severa	GAA->AAA	Glu	Lys	Lissens i col. (1997) Vallance i col. (1999)
H342Y	VIII	lleu	CAT->TAT	His	Tyr	Vallance i col. (1999)
W345K	VIII	lleu	TGG->TGT	Trp	Lys	Popowska i col. (1995)
A346V	VIII	lleu	GCC->GTC	Ala	Val	Li i col. (1994,95,99)
A346D	VIII	lleu	GCC->GAC	Ala	Asp	Olsen i col. (1996) Karsten i col. (1998a)
K347T	VIII	severa	AAA->ACA	Lys	Thr	Villani i col. (1995-97)
K347I	VIII	NS	AAA->ATA	Lys	Ile	Rathmann i col. (1996)
K347Q	VIII	NS	AAA->CAA	Lys	Gln	Lissens i col. (1997)
Y348H	VIII	severa	TAC->CAC	Tyr	His	Karsten i col. (1998a)
S349I	VIII	severa	AGC->ATC	Ser	Ile	Isogai i col. (1998)

Mutació	Exó	Clínica	Canvi de nucleòtid	De	A	Referències
S349R	VIII	NS	AGC->CGC o AGG	Ser	Arg	Bellows i Thompson (1999)
P358R	VIII	severa	CCC->CGC	Pro	Arg	Jonsson i col. (1995)
L403R	IX	intermedi	CTT->CGT	Leu	Arg	Rathmann i col. (1996) Froissart i col. (1998)
L410P	IX	lleu	CTG->CCG	Leu	Pro	Ben Simon-Schiff i col. (1994)
C422G	IX	lleu	TGC->GGC	Cys	Gly	Bunge i col. (1993)
C432Y	IX	severa	TGC->TAC	Cys	Tyr	Karsten i col. (1998b) Voskoboeva i col. (1998)
E436K	IX	lleu	GAA->AAA	Glu	Lys	Vafiadaki i col. (1998)
Q465P	IX	severa	CAG->CCG	Gln	Pro	Hartog i col. (1999)
P467L	IX	severa	CCC->CTC	Pro	Leu	Froissart i col. (1998) Moreira da Silva i col. (1999)
R468W	IX	lleu	CGG->TGG	Arg	Trp	Crotty i col. (1992) Jonsson i col. (1995) Popowska i col. (1995) Goldenfum i col. (1996) Lissens i col. (1997) Isogai i col. (1998) Froissart i col. (1998) Li i col. (1999) Hartog i col. (1999)
R468G	IX	severa	CGG->GGG	Arg	Gly	Hopwood i col. (1993a)
R468L	IX	severa lleu	CGG->CTG	Arg	Leu	Sukegawa i col. (1995) Villani i col. (1995-97) Isogai i col. (1998)
R468Q	IX	Lleu intermedi severa	CGG->CAG	Arg	Gln	Whitley i col. (1993a) Aronovich i col. (1993) Li i col. (1995) Sukegawa i col. (1995) Villani i col. (1995-97) Goldenfum i col. (1995-96) Rathmann i col. (1996) Lissens i col. (1997) Isogai i col. (1998) Froissart i col. (1998) Vafiadaki i col. (1998) Karsten i col. (1998a) Li i col. (1999) Karsten i col. (1998b) Bellows i Thompson (1999) Moreira da Silva i col. (1999)
P469H	IX	lleu	CCT->CAT	Pro	His	Jonsson i col. (1995)
D478G	IX	lleu	GAC->GGC	Asp	Gly	Schroder i col. (1994)
D478Y	IX	severa	GAC->TAC	Asp	Tyr	Karsten i col. (1998b) Voskoboeva i col. (1998)
P480Q	IX	lleu	CCG->CAG	Pro	Gln	Froissart i col. (1998) Millat i col. (1998)
P480L	IX	lleu	CCG->CTG	Pro	Leu	Froissart i col. (1998) Millat i col. (1998)
P480R	IX	severa	CCG->CGG	Pro	Arg	Froissart i col. (1998)
I485R	IX	severa	ATA->AGA	Ile	Arg	Goldenfum i col. (1995) Schroder i col. (1994) Vafiadaki i col. (1998) Karsten i col. (1998b)
I485K	IX	severa	ATA->AAA	Ile	Lys	Vafiadaki i col. (1998)
Y490S	IX	intermedi	TAT->TCT	Tyr	Ser	Froissart i col. (1998)
S491F	IX	severa	TCC->TTC	Ser	Phe	Vallance i col. (1999)
W502S	IX	NS	TGG->TCG	Trp	Ser	Flomen i col. (1992)
W502C	IX	severa	TGG->TGT	Trp	Cys	Vafiadaki i col. (1998)
E521K	IX	NS	GAA->AAA	Glu	Lys	Lissens i col. (1997)
E521V	IX	NS	GAA->GTA	Glu	Val	Lissens i col. (1997) Li i col. (1999)
Y523C	IX	lleu	TAT->TGT	Tyr	Cys	Jonsson i col. (1995)

4.5.2.2. Mutacions sense sentit (*nonsense*)

Representen el 11.6% de les mutacions puntuals (Taula 5). La majoria d'aquestes mutacions han estat descrites als exons VIII i IX. Algunes d'aquestes, com la R443X, s'ha trobat amb relativa alta freqüència, tenint en compte la poca repetitivitat de les mutacions en aquesta malaltia.

Taula 5. Mutacions sense sentit (*nonsense*) del gen *IDS*. NS- No se sap

Mutació	Exó	Clínica	Codó	De	A	Referències
R8X	I	lleu	CGA->TGA	Arg	Stop	Vafiadaki i col. (1998)
Q80X	II	severa	CAG->TAG	Gln	Stop	Carrozzo i col. (1996) Vafiadaki i col. (1998)
C84X	III	severa	TGC->TGA	Cys	Stop	Vafiadaki i col. (1998)
Y103X	III	severa	TAC->TAA	Tyr	Stop	Karsten i col. (1998a)
Y151X	IV	severa	TAT->TAG	Tyr	Stop	Isogai i col. (1998)
R172X	V	lleu severa	CGA->TGA	Arg	Stop	Fiomen i col. (1992) Bunge i col. (1993) Jonsson i col. (1995) Goldenfum i col. (1995) Rathmann i col. (1996) Isogai i col. (1998) Vafiadaki i col. (1998)
Y234X	V	NS	TAC->TAA	Tyr	Stop	Li i Thompson (1996a) Li i col. (1999)
Y234X	V	NS	TAC->TAG	Tyr	Stop	Karsten i col. (1998a)
E245X	VI	severa	GAG->TAG	Glu	Stop	Vafiadaki i col. (1998)
L279X	VI	NS	TTA->TGA	Leu	Stop	Li i col. (1994,1999)
Q293X	VI	NS	CAG->TAG	Gln	Stop	Lissens i col. (1997)
Q298X	VII	severa	CAG->TAG	Gln	Stop	Rathmann i col. (1996)
W345X	VIII	severa	TGG->TAG o TGA	Trp	Stop	Sukegawa i col. (1995) Isogai i col. (1998)
G365X	VIII	severa	GGA->TGA	Gly	Stop	Rathmann i col. (1996)
E375X	VIII	severa	GAG->TAG	Glu	Stop	Hopwood i col. (1993a)
Q389X	VIII	severa	CAG->TAG	Gln	Stop	Jonsson i col. (1995) Villani i col. (1995-97) Carrozzo i col. (1996)
Q396X	IX	severa	CAG->TAG	Gln	Stop	Froissart i col. (1998)
S426X	IX	severa	TCA->TGA	Ser	Stop	Schroder i col. (1994)
R443X	IX	intermedi lleu	CGA->TGA	Arg	Stop	Bunge i col. (1993) Sukegawa i col. (1995) Goldenfum i col. (1995) Rathmann i col. (1996) Isogai i col. (1998) Froissart i col. (1998) Vafiadaki i col. (1998) Karsten i col. (1998b) Voskoboeva i col. (1998) Hartog i col. (1999) Moreira da Silva i col. (1999)
Q465X	IX	NS	CAG->TAG	Gln	Stop	Li i Thompson (1996a) Li i col. (1999)
Y466X	IX	severa	TAT->TAA	Tyr	Stop	Vafiadaki i col. (1998)
Q474X	IX	intermedi	CAG->TAG	Gln	Stop	Rathmann i col. (1996)
W475X	IX	intermedi	TGG->TAG o TGA	Trp	Stop	Bunge i col. (1993) Villani i col. (1995) Balzano i col. (1998)
L482X	IX	intermedi	TTA->TGA	Leu	Stop	Froissart i col. (1998)
W502X	IX	NS	TGG->TAG	Trp	Stop	Li i col. (1995,1999) Froissart i col. (1998)
E521X	IX	NS	GAA->TAA	Glu	Stop	Lissens i col. (1997)
Q531X	IX	lleu	CAG->TAG	Gln	Stop	Sukegawa i col. (1995) Isogai i col. (1998) Froissart i col. (1998)

4.5.2.3. Petites insercions i deleccions

Aquest tipus de mutacions es donen sovint en la malaltia de Hunter i representen el 28.9% de les mutacions puntuals (Taula 6). La majoria són inserció o delecció d'un o dos nucleòtids que provoquen el corriment de pauta de lectura i per tant l'acabament de la proteïna abans d'hora. Hi ha, però, també, altres deleccions i insercions més grans.

Taula 6. Petites insercions i delecions del gen *IDS*.

NS- No se sap; nt. nucleòtid; aa. aminoàcid; cpt. canvi de pauta de lectura;

Numeració segons Wilson i col. (1990)

Mutació	Exó	Clínica	Caràcter	Codó / Efecte	Referències
167delC	I	lleu	Deleció d'un nt.	CTG->TG, cpt.	Hopwood i col. (1993a)
194insT	I	intermedi	Inserció d'un nt.	CTC->CTT, cpt.	Vafiadaki i col. (1998)
206insA	I	lleu	Inserció d'un nt.	ACG->AAC, cpt.	Goldenfum i col. (1995-1996)
223delC	I	severa	Deleció d'un nt.	cpt.	Froissart i col. (1998)
247delC	II	lleu	Deleció d'un nt.	CTC->CT-, cpt.	Goldenfum i col. (1995-1996)
ΔL41	II	NS	Deleció de 3 nt.	ΔCTC	Ben Simon-Schiff i col. (1994)
S61del8	II	severa	Deleció de 8 nt	cpt.	Goldenfum i col. (1995-96)
333insC	II	NS	Inserció d'un nt.	cpt.	Li i col. (1999)
407delA	III	severa	Deleció d'un nt.	cpt.	Froissart i col. (1998)
412delA	III	intermedi	Deleció d'un nt.	AGA->AG-, cpt.	Popowska i col. (1995) Karsten i col. (1998a)
421insA	III	severa	Inserció d'un nt.	cpt.	Karsten i col. (1998a)
R95del	III	severa	Deleció de 3 nt.	ΔAGG	Li i col. (1999)
F105insC	III	severa	Inserció d'un nt.	cpt.	Jonsson i col. (1995)
S117del	III	severa	Deleció de 3 nt.	ΔTCC	Froissart i col. (1998)
ΔT118	III	NS	Deleció de 3 nt.	ΔCCA	Lissens i col. (1997)
499insA	III	intermedi	Inserció d'un nt.	cpt.	Karsten i col. (1998a)
507delAT	III	severa	Deleció de 2 nt.	cpt.	Li i col. (1999)
521delG	III	severa	Deleció d'un nt.	cpt.	Froissart i col. (1998)
540delC	III	severa	Deleció d'un nt.	CCT->-CT, cpt.	Bunge i col. (1993) Villani i col. (1995)
578del7	IV	severa	Deleció de 7 nt.	cpt.	Isogai i col. (1998)
582delG	IV	NS	Deleció d'un nt.	cpt.	Lissens i col. (1997)
ΔH159	IV	intermedi	Deleció de 3 nt.	ΔCAT	Bunge i col. (1993)
624delA	IV	severa	Deleció d'un nt.	AAC->A-C, cpt.	Vafiadaki i col. (1998)
634delCA	V	intermedi	Deleció de 2 nt.	ACA->A-, cpt.	Bunge i col. (1993)
717delACAA	V	severa	Deleció de 4 nt.	cpt.	Ben Simon-Schiff i col. (1994)
719delAAAC	V	severa	Deleció de 4 nt	cpt.	Isogai i col. (1998)
720delAACA	V	severa	Deleció de 4 nt.	cpt.	Li i col. (1999) Vallance i col. (1999)
764delA	V	intermedi	Deleció d'un nt.	ACG->-CG, cpt.	Isogai i col. (1998)
777insC	V	lleu	Inserció d'un nt.	CCT->CCC, cpt.	Vafiadaki i col. (1998) Hartog i col. (1999)
790del17	V	intermedi	Deleció de 17 nt.	cpt.	Popowska i col. (1995) Karsten i col. (1998a)
817delC	V	severa	Deleció d'un nt.	CCC->CC-, cpt.	Bunge i col. (1993)
825del8	V	severa	Deleció de 8 nt.	cpt.	Villani i col. (1995)
829delC	V	severa	Deleció d'un nt.	CCC->CC-, cpt.	Vafiadaki i col. (1998)
833insG	VI	severa	Inserció d'un nt.	GAA->GGA	Vafiadaki i col. (1998)
953ins14	VI	severa	Inserció de 14 nt.	cpt.	Jonsson i col. (1995)
960delT	VI	severa	Deleció d'un nt.	TTA->_TA, cpt.	Villani i col. (1995-97)
991delT	VI	severa	Deleció d'un nt.	CCT->CC-, cpt.	Rathmann i col. (1996)
1061delC	VII	fetus	Deleció d'un nt.	CGC->-GC, cpt.	Goldenfum i col. (1995-1996)
1082insT	VII	severa	Inserció d'un nt.	GAT->GTA, cpt.	Hartog i col. (1999)
1147delA	VIII	severa	Deleció d'un nt.	GAA->GA-, cpt.	Vafiadaki i col. (1998)
1156delA	VIII	lleu	Deleció d'un nt.	GAA->G-A, cpt.	Goldenfum i col. (1995)
1160delG	VIII	severa	Deleció d'un nt.	GCC->-CC, cpt.	Rathmann i col. (1996)
1168delC	VIII	intermedi	Deleció d'un nt.	TAC->TA-, cpt.	Bunge i col. (1993)
1173delA	VIII	severa	Deleció d'un nt.	AAT->A-T, cpt.	Vafiadaki i col. (1998)
1188insA	VIII	severa	Inserció d'un nt.	cpt.	Li i col. (1999)

Mutació	Exó	Clinica	Caràcter	Codó / Efecte	Referències
1220del20	VIII	severa	Deleció de 20 nt.	cpt.	Froissart i col. (1998)
1265delC	VIII	lleu	Deleció d'un nt.	CCT->C-T, cpt.	Vafiadaki i col. (1998) Li i col. (1999) Hartog i col. (1999)
1322insC	IX	NS	Inserció d'un nt.	cpt.	Froissart i col. (1998)
1328del14	IX	severa	Deleció de 14 nt.	cpt.	Goldenfum i col. (1995)
1339delTC	IX	NS	Deleció de 2 nt.	cpt.	Lissens i col. (1997)
1340delCT	IX	severa	Deleció de 2 nt.	cpt.	Froissart i col. (1998) Li i col. (1999)
1344delTT	IX	NS	Deleció de 2 nt.	TTT->T-, cpt.	Li i col. (1994, 1995, 1999)
1393insCC	IX	lleu	Inserció de 2 nt.	cpt.	Li i col. (1994, 1995, 1999)
1419insGT	IX	NS	Inserció de 2 nt.	cpt.	Lissens i col. (1997)
1422del9	IX	intermedi	Deleció de 9 nt.	Deleció de 3 aa.	Froissart i col. (1998)
1436delC	IX	NS	Deleció d'un nt.	CTT->-TT, cpt.	Bunge i col. (1993)
1443insA	IX	severa	Inserció d'un nt.	AAG->AAA, cpt.	Villani i col. (1995-97)
1460insA	IX	lleu	Inserció d'un nt.	cpt.	Isogai i col. (1998)
1477del9	IX	NS	Deleció de 9 nt.	Deleció de 3 aa.	Goldenfum i col. (1995)
1514del9	IX	NS	Deleció de 9 nt.	Deleció de 3 aa.	Froissart i col. (1998)
1557delA	IX	molt lleu	Deleció d'un nt.	GAC->G-C, cpt.	Goldenfum i col. (1995-96)
1606del7	IX	NS	Deleció de 7 nt.	cpt.	Vafiadaki i col. (1998)
1632delT	IX	severa	Deleció d'un nt.	GTT->GT-	Hartog i col. (1999)
1691insT	IX	lleu	Inserció d'un nt.	TAT->TTAT, cpt.	Rathmann i col. (1996)
1700delG	IX	lleu	Deleció d'un nt.	TGG->TG-, cpt.	Vafiadaki i col. (1998)
1704ins14	IX	intermedi	Duplicació de 14 nt.	cpt.	Popowska i col. (1995) Karsten i col. (1998a)
1711delA	IX	NS	Deleció d'un nt.	cpt.	Froissart i col. (1998)

4.5.2.4. Mutacions d'*splicing*

Són les mutacions menys freqüents en la malaltia de Hunter i representen el 10.3% de les mutacions puntuals (Taula 7). Cal destacar la mutació G374G, una mutació que crea un nou lloc d'*splicing* a mig exó VIII que provoca la pèrdua de 60 nucleòtids a aquest exó i, per tant, la pèrdua de 20 aminoàcids a la proteïna. Aquesta mutació és de les més freqüents, i ha estat descrita en quasi totes les poblacions.

Taula 7. Mutacions d'*splicing* del gen *IDS*.

In- Intró; NS- No se sap; nt. Nucleòtid; aa. Aminoàcid; Numeració segons Wilson i col. (1990)

Mutació	Exó	Clínica	Caràcter	Canvi	Referències
125-239del	I	severa	Deleció de 38 aa.		Schroder i col. (1994)
IVS1+1G->T	In1	lleu	Deleció de 63 nt.	AGgt-> agtt	Goldenfum i col. (1996)
IVS1-2A->G	In1	severa	Pèrdua del lloc 3'	ag->gg	Vafiadaki i col. (1998) Karsten i col. (1998b) Voskoboeva i col. (1998) Moreira da Silva i col. (1999)
IVS2+1G->A	In2	severa	Deleció exons II i III	gt->at	Froissart i col. (1998)
IVS2-10T->G	In2	lleu	Deleció de 14 aa.	gctc->gcgc	Vafiadaki i col. (1998)
IVS3-2A->G	In3	intermedi	Inserció d'un nt.	aagG-> agGG	Bunge i col. (1993)
IVS4+1G->A	In4	severa	Inserció de 22 aa.	AGgt->AGAT	Karsten i col. (1998b) Voskoboeva i col. (1998)
T214R	V	lleu	Deleció de 67 nt.	ACG->agG	Rathmann i col. (1996)
K236K	V	intermedi	Deleció de 37 nt.	AAG->AAA	Rathmann i col. (1996)
IVS5+2T->G	In5	severa	Inserció de 12 aa.	Aggt->AGGG	Vafiadaki i col. (1998)
IVS5+934G->A	In5	NS	Inserció de 141 nt.	g->a	Vallance i col. (1999)
IVS5-2G->A	In5	NS		ag->aa	Lissens i col. (1997)
L236L	V	severa	Inserció de 12 aa.		Vafiadaki i col. (1998)
E237E	VI	severa	Deleció de 5 nt.		Olsen i col. (1996)
IVS6+1G->A	In6	intermedi		gt->ag	Karsten i col. (1998b) Voskoboeva i col. (1998)
IVS6-2A->G	In6	severa	Deleció de 17 nt.	agC->ggc	Bunge i col. (1993) Froissart i col. (1998)
IVS7	In7	severa	Inserció de 22 nt.	TGgt->tttt	Bunge i col. (1993)
IVS7+2T->C	In7	severa	Inserció de 8 aa.	TGgt->TGGC	Vafiadaki i col. (1998)
IVS7+5G->C	In7	NS	Inserció de 22 nt		Li i col. (1999)
IVS7-133A->G	In7	lleu		a->g	Rathmann i col. (1996)
IVS7-8T->G	In7	lleu	Inserció de 7 nt.	tatgaactagGGT -> tagGAACTAGG	Hopwood i col. (1993a)
IVS7-1G->C	In7	intermedi	Deleció de 12 nt.	agG->acg	Bunge i col. (1993)
G374G	VIII	lleu intermedi	Deleció de 20 aa.	AGGC-> AGgt	Flomen i col. (1992) Bunge i col. (1993) Hopwood i col. (1993a) Popowska i col. (1995) Goldenfum i col. (1996) Ben Simon-Schiff i col. (1994) Rathmann i col. (1996) Lissens i col. (1997) Balzano i col. (1998) Vafiadaki i col. (1998) Karsten i col. (1998b) Hartog i col. (1999) Li i col. (1999) Moreira da Silva i col. (1999)
IVS8-1G->A	In8	lleu		agG->aag	Popowska i col. (1995)

4.6. DISTRIBUCIÓ DE LES MUTACIONS PUNTUALS EN LA ZONA CODIFICANT DE L'*IDS*

Mentre que la distribució de les petites insercions i deleccions sembla ser a l'atzar, les mutacions puntuals de canvi de sentit i sense sentit semblen ser més freqüents als exons III, VIII i IX. Aquesta distribució és molt significativa (test $\chi^2 = 35.28$; $p < 2.5 \times 10^{-5}$). Als exons VIII i IX, però, l'alta freqüència de mutacions ve donada, bàsicament, per la recurrència de mutacions en certs codons (el 374 a l'exó VIII i els 443 i 468 a l'exó IX), que s'han trobat en varis pacients. A l'exó III, en canvi,

hi ha una gran varietat de mutacions diferents, gairebé totes particulars. Aquest fet podria indicar que, com que l'exó III conté seqüències específiques de sulfatases que estan evolutivament conservades i podria ser un possible lloc catalític, alteracions en aquesta zona funcionalment important, sempre donin clínica de la malaltia de Hunter (Rathmann i col, 1996).

4.7. POLIMORFISMES DESCRITS EN ZONA CODIFICANT DEL GEN *IDS*

Al gen *IDS* s'ha descrit un sol polimorfisme en zona codificant que no canvia d'aminoàcid. Està situat a l'exó IV i és un canvi silenciós de ACC a ACT al codó 146 que codifica per una treonina (T146T) (Flomen i col, 1992).

4.8. EL PSEUDOGÈN DE LA IDURONAT-2-SULFATASA (*IDS-2*)

Bondeson i col. (1995a) va descriure un pseudogèn de la *IDS* i el va anomenar *IDS-2*. Està situat a 20 Kb telomèricament del gen *IDS* (Timms i col, 1995) i té homologia amb els exons II i III i els introns 2, 3 i 7 d'aquest gen. El pseudogèn té un 96% d'homologia amb les regions identificades, cal destacar, però, que l'exó III del gen i el del pseudogèn són exactament iguals. La *IDS-2* està situada 5'-3' de centròmer a telòmer, per tant, l'exó II del pseudogèn està de costat amb l'exó I del gen (Figura 6).

4.9. MUTACIONS RELACIONADES AMB EL PSEUDOGÈN

Recentment s'han descrit varies mutacions relacionades amb el pseudogèn, la majoria relacionades amb una recombinació entre l'intró 7 de l'*IDS* i la seva zona homòloga de l'*IDS-2*, que provoquen deleccions de diferents tipus (Biro i col, 1996; Bunge i col, 1998a), però és necessari destacar la primera que es va descriure perquè s'ha identificat en un 13% dels pacients (Bondeson i col, 1995b). És una inversió del gen *IDS* deguda a la recombinació entre el gen i el pseudogèn que es dona entre l'intró 7 del gen i la seva zona homòloga del pseudogèn. La recombinació provoca la inversió del gen, que ara queda orientat 5'-3' centròmer-telòmer, i la col·locació dels exons VIII i IX del gen al costat del pseudogèn, per tant, el gen *IDS* es queda amb sols set exons (Bondeson i col, 1995b) (Figura 7). S'ha postulat que la recombinació pot ser deguda a trencaments de la doble cadena en l'intró 7 del gen *IDS* (Lagerstedt i col, 1997).

Aquesta mutació dona un patró típic quan s'analitza el DNA genòmic dels pacients digerit amb els enzims de restricció EcoRI i HindIII per Southern blot i hibridant amb la sonda del cDNA del gen. Aquest patró ha estat clau perquè varis autors hagin pogut identificar aquesta mateixa mutació en els seus pacients i s'hagi vist que és relativament freqüent (Steén-Bondeson i col, 1992; Palmieri i col, 1992; Olsen i col, 1996; Rathmann i col, 1996; Moreira da Silva i col, 1999).

Les altres mutacions que s'han descrit relacionades amb el pseudogèn comprenen des de deleccions de varis exons (del IV al VII, o del V i VI) a inversions, totes degudes a la recombinació homòloga per trencament de la doble cadena (Lagerstedt i col, 1997) en una zona de 1.6Kb que presenta una homologia del 96% entre l'intró 7 del gen i el de l'IDS-2, però, als pacients estudiats, el punt de recombinació és sempre diferent, el que indica una gran tendència d'aquesta zona a la recombinació. El que resulta sorprenent és que des de la segona meitat de l'exó II a la primera meitat de l'intró 3 de l'IDS-2 hi hagi una homologia encara superior amb la zona corresponent de l'IDS (98.4%) i en canvi no s'hagi observat fins ara cap inversió deguda a la recombinació en aquesta zona (Bunge i col, 1998a).



Figura 6. Estructura del gen *IDS* i del pseudogèn *IDS-2*

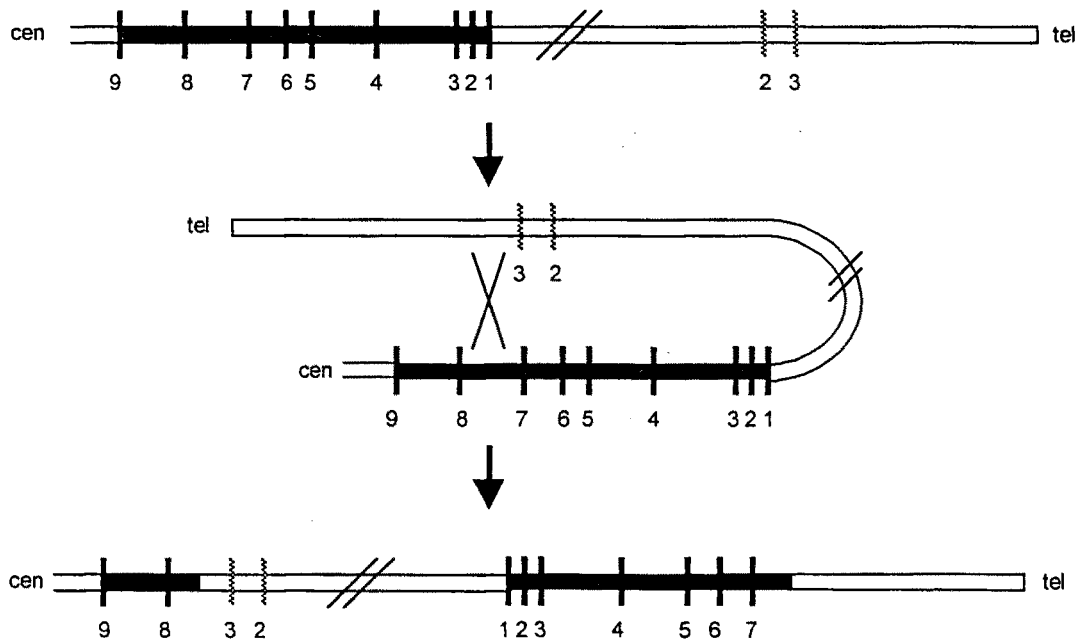


Figura 7. Recombinació intracromosòmica entre el gen *IDS* i el pseudogèn *IDS-2*

4.10. HETEROGENEÏTAT GENÈTICA

Tal i com es pot veure, la malaltia de Hunter es caracteritza per una gran heterogeneïtat genètica. Hi ha una gran quantitat de mutacions descrites diferents que donen lloc a la malaltia amb diferents graus de severitat, i alhora, també s'ha pogut comprovar que una mateixa mutació en diferents famílies pot donar lloc a clíniques diferents, com per exemple les mutacions R468Q, R468L o G374G (Schroder i col, 1994). Fins ara no es sap massa el perquè d'aquesta diversitat clínica davant les mateixes mutacions i es postula la diferència de fons genètic. D'altra banda, la gran varietat de mutacions descrites podria ser la causa de la gran heterogeneïtat clínica que hi ha en la malaltia de Hunter (veure apartat 4.2.3).

4.11. CORRELACIÓ GENOTIP-FENOTIP

El fet que en aquesta malaltia les mutacions són, en la majoria dels casos, de tipus particular, dificulta l'estudi de correlacions genotip-fenotip ja que un sol cas per mutació no permet generalitzar. Sols s'ha pogut estudiar en els casos de les mutacions que s'han trobat en varis pacients i, tot i així, s'ha vist que la malaltia és molt heterogènia i que una mateixa mutació pot donar fenotips diferents (veure apartats 4.5).

De totes maneres, s'ha intentat treure algunes conclusions dels estudis mutacionals fets en pacients Hunter i s'ha vist que, en general, les mutacions sense sentit (*nonsense*) i els grans reordenaments estructurals (delecions, insercions, inversions i duplicacions), solen estar associades amb un fenotip intermedi o sever, ja que aquest tipus de mutacions donen com a resultat proteïnes truncades molt curtes que acostumen a mancar (sovint completament) d'activitat enzimàtica (Rathmann i col, 1996). D'altra banda també s'ha vist que en el cas de les grans delecions, la delecio de gens veïns poden contribuir a la variabilitat clínica (Wilson i col, 1991).

Els pacients que presenten mutacions de canvi de sentit (*missense*) presenten fenotips que van des de molt lleu a sever, però les que afecten residus que estan conservats en les sulfatases (Tomatsu i col, 1991; Franco i col, 1995) acostumen a presentar clíniques intermèdies o severes.

Les mutacions d'*splicing* i les petites insercions i delecions, provoquen, també, un gran ventall de clíniques.

Tenint en compte, doncs, la gran heterogeneïtat clínica i la gran heterogeneïtat genètica, és molt difícil establir correlacions genotip-fenotip que serien molt útils per intentar predir el curs de la malaltia (Rathmann i col, 1996).

4.12. ORIGEN FAMILIAR DE LES MUTACIONS

Rathmann i col. (1996), després de recollir dades de 50 famílies amb la malaltia de Hunter, van veure que les mutacions (sobretot les puntuals) ocorrien amb molta freqüència en la meiosi masculina. Aquesta observació està d'acord amb les fetes en altres malalties lligades al cromosoma X com la distròfia muscular de Duchenne (Grimm i col, 1994), l'hemofília A (Knobloch i col, 1993) i l'hemofília B (Becker i col, 1996). Si aquesta afirmació es confirma en més famílies pot tenir una implicació important pel consell genètic de les familiars femenines de pacients amb MPS II, perquè la freqüència de portadores entre les mares dels casos esporàdics sembla ser més alta que el valor estadístic que s'esperaria per una malaltia genètica letal lligada al cromosoma X (aprox. un 60%, Chase i col. (1986)).

4.13. DIAGNÒSTIC DE PORTADORES I DIAGNÒSTIC PRENATAL

Degut a que la malaltia de Hunter és lligada al cromosoma X, el diagnòstic de portadores i el diagnòstic prenatal s'ha convertit en una eina molt important per a la prevenció de la malaltia. Les dones portadores són absolutament asimptomàtiques, excepte comptades excepcions (veure apartat 4.14.), i l'estudi de l'activitat enzimàtica no acostuma a aclarir el seu estat, ja que els valors enzimàtics de les heterozigotes es solapen amb els valors controls. És per això que l'estudi molecular de les famílies amb membres afectes s'ha tornat quasi imprescindible per poder diagnosticar les dones portadores de la família i poder oferir-los el diagnòstic prenatal.

4.14. DONES AMB LA MALALTIA DE HUNTER

En general, les dones portadores de la malaltia de Hunter són totalment asimptomàtiques, d'altra banda, no s'han descrit dones homozigotes per aquesta malaltia perquè els homes afectats de la malaltia de Hunter no arriben a l'edat adulta o si hi arriben no es reproduïen. S'han descrit, però, algunes excepcions de dones portadores de la malaltia i amb la simptomatologia típica.

Mossman i col. (1983), per exemple, van descriure una nena de tres anys amb clínica típica de Hunter. La nena presentava una translocació recíproca equilibrada entre els cromosomes X i 5 amb el punt de tall al locus Xq28. Aquest cas va ajudar a la localització del gen. Un cas semblant va ser descrit per Broadhead i col. (1986) en una nena de dos anys i mig que presentava una deleció parcial del braç llarg d'un dels cromosomes X.

D'altra banda, Winchester i col. (1992) van descriure una nena amb el cariotip normal que presentava la malaltia. La nena era bessona univitel·lina d'una altra nena absolutament asimptomàtica. Els estudis moleculars que se li van fer van demostrar una inactivació no-a l'atzar del cromosoma X no mutat en els seus fibroblasts i limfocits, mentre que la seva bessona mostrava una inactivació equilibrada dels dos cromosomes X. Aquesta inactivació del cromosoma no mutat és la causant de la malaltia en dones i també es va veure que ho era en el cas de la nena descrita per Broadhead i col. (1986). Altres autors han descrit, també, casos de nenes afectes, totes amb el rerefons de la inactivació no-a l'atzar del cromosoma no mutat (Clarke i col, 1992; Sukegawa i col, 1997 i 1998).

4.15. SELECCIÓ POSITIVA PER L'AL·LEL MUTAT?

Zlotogora i col. (1985) van descriure que en jueus asquenassites d'Israel hi havia una gran desviació en la segregació dels al·lels normal i mutant en les dones heterozigotes afavorint el mutant. En la població no-asquenassita, el factor de segregació era semblant a l'esperat (Archer i col, 1983; Tønnesen, 1984). Posteriorment, Zlotogora i col. (1991) van donar més evidències que en les famílies d'origen asquenassita hi havia una desviació significativa del factor de segregació entre l'al·lel mutat i el normal en la descendència de mares heterozigotes i entre els germans de nens afectats, suggerint una selecció positiva a favor del cromosoma X que duia la mutació. Aquesta selecció, aparentment, no s'ha observat en altres grups ètnics. L'explicació que donen és que pot ser deguda a un altre gen lligat molt proper que faci que aquesta característica sigui típica de la població jueva, o bé que la mutació per si mateixa doni una avantatge selectiva al cromosoma.

En canvi, Machill i col. (1991), després d'estudiar cinc famílies amb un total de 158 casos, van veure que l'al·lel mutant segregava tal i com s'esperava segons les lleis mendelianes per una malaltia lligada al cromosoma X, però que la proporció de

casos esporàdics era significativament més baixa que l'esperada per l'equilibri mutació-selecció.

4.16. TERÀPIA

4.16.1. TRASPLANTAMENT DE MOLL D'OS

Així com en la malaltia de Hurler aquest tractament s'ha utilitzat molt i ha tingut resultats bastant satisfactoris (veure seccions 2.9.2 i 3.10.1), en la malaltia de Hunter aquest tipus de teràpia s'ha utilitzat en pocs pacients i els resultats obtinguts no han estat tan bons com s'esperava.

En general s'ha vist com l'edat a la qual es fa el trasplantament és molt important de cara a la millora de la clínica, sobretot des del punt de vista del dany cerebral, ja que s'ha descrit que, per exemple, un trasplantament fet en un nen de 29 mesos amb fenotip sever de la malaltia no ha aconseguit aturar el deteriorament de les habilitats neurocognitives (McKinnis i col, 1996). En altres pacients trasplantats, s'ha observat una disminució de l'excreció de glucosaminoglicans en orina i un augment de l'activitat iduronat-2-sulfatasa en sèrum i leucocits; s'ha normalitzat la mida del fetge i la melsa, ha millorat la mobilitat de les articulacions i s'ha recuperat parcialment les funcions motores i socials (Coppa i col, 1995; Li i col, 1996b), però la malaltia progressa, tot i que més lentament que abans del trasplantament, i si es tenen en compte els riscos de l'operació, la manca de donadors histocompatibles, l'alta mortalitat del 20% al 50%, les complicacions com el rebuig de la nova medul·la i les millores clíniques que se n'obtenen, es conclou que aquest tipus de teràpia és aplicable sols en casos molt concrets i escollits, i això ha fet que en aquesta malaltia no sigui gaire habitual el trasplantament de moll d'os (Maria i col, 1997; Vellodi i col, 1999).

4.16.2. TERÀPIA GÈNICA

Com a teràpia alternativa s'està estudiant la possibilitat d'utilitzar la teràpia gènica per subministrar l'enzim IDS per tractar la malaltia de Hunter. Braun i col. (1993) van utilitzar el vector retrovíric L2SN per transduir el gen *IDS* a línies cel·lulars limfoblastoides de pacients amb la malaltia de Hunter. Les línies cel·lulars van expressar alts nivells d'activitat de l'enzim iduronat-2-sulfatasa (de 10 a 70 vegades

superior que en leucocits de sang perifèrica) i la manca d'acumulació de sulfat marcat radioactivament als GAGs va indicar que l'enzim IDS recombinant participava en el metabolisme dels glucosaminoglicans.

El 1995 es va aprovar el primer assaig clínic de teràpia gènica en limfocits per tractar la forma lleu de la malaltia (Whitley i col, 1996; Braun i col, 1996) i encara avui continua vigent.

Arran dels resultats obtinguts per Di Francesco i col. (1997) es va aprovar el segon protocol de teràpia gènica a càrrec del Dr. F. Zacchello per tractar els pacients amb la forma severa de la malaltia. Aquest grup utilitza de vector adenovirus ja que s'ha comprovat que aquests poden infectar cèl·lules del sistema nerviós central sense gaire (o gens) resposta immunològica.

Així, la teràpia gènica és, ara per ara, l'esperança pel tractament de la malaltia de Hunter (per més informació sobre els protocols de teràpia gènica consultar la pàgina web <http://www.wiley.co.uk/genetherapy>).

4.17. MODELS ANIMALS

Així com en la mucopolisacaridosi de tipus I existeixen models caní i felí de la malaltia i fins i tot s'hi ha pogut treballar per provar possibles teràpies (veure secció 3.11); no ha estat fins fa poc que s'ha trobat el model caní de la malaltia de Hunter (Wilkerson i col, 1998). El gos, un Labrador Retriever, representa el primer model, i a més natural, de la MPS II. La malaltia va ser diagnosticada perquè el gos presentava descoordinació progressiva, intolerància a l'exercici i problemes visuals, també presentava trets facials toscos, macrodactília, distròfia corneal unilateral, osteopènia generalitzada i deteriorament neurològic progressiu. El curs clínic va anar empitjorant i finalment als 5 anys de vida es va haver de sacrificar el gos.

LA LEUCODISTRÒFIA METACROMÀTICA

5.1. DESCRIPCIÓ

La leucodistròfia metacromàtica (LDM, MIM 250100) és una malaltia hereditària d'acumulació lisosòmica produïda per la deficiència de l'enzim arilsulfatasa A que afecta el metabolisme de la mielina. La malaltia, que va ser descrita per primera vegada per Greenfield (1933), es caracteritza per l'acumulació del galactosil sulfat (o cerebròsid sulfat) en la substància blanca del sistema nerviós central i als nervis perifèrics. El cerebròsid sulfat i, en menys quantitat, el lactosil sulfat, també s'acumulen al ronyó, a la bufeta del fel i a altres òrgans visceralis i són excretats en excés en orina (Austin, 1960). En les preparacions histològiques formen masses granulars esfèriques que es tenyeixen metacromàticament. Aquesta malaltia, doncs, és una sulfatidosi dins el grup de les esfingolipidosi.

La LDM pot ser deguda, també, a la deficiència de la saposina B, la proteïna activadora del cerebròsid sulfat.

5.2. ELS SULFOLÍPIDS O SULFÀTIDS

El terme sulfolípid és aplicable a un ampli ventall de lípids que contenen sofre. Aquest pot estar present en varis estats d'oxidació i pot estar enllaçat directament a l'element lipídic o estar-hi indirectament associat a través d'un sucre o d'un aminoàcid. Si considerem les lipidosi que afecten sulfàtids, només ens interessin els sulfolípid que presenten ésters de sulfat, sobretot els que estan sulfatats al residu 3-hidroxil d'una galactosa. El més abundant d'aquests és el cerebròsid sulfat, un glicoesfingolípid que és present en altes concentracions en la mielina del sistema nerviós central i perifèric i al fetge (Kikkawa i col, 1991), també es pot trobar en altres teixits, sobretot els que tenen un epiteli amb molta excreció, com les mucoses respiratòries i gàstriques, la bufeta del fel i l'endometri uterí (Abe i col, 1977; Krivan i col, 1989; Natomi i col, 1990; Takamatsu, 1992). També es troba a fluids del cos com el sèrum, l'orina i el fluid cerebrospinal (Zhu i col, 1991; Kaye i col, 1992; Molzer i col, 1992).

L'estructura del cerebròsid sulfat es pot veure a la figura 8. L'esfingosina unida, en el C-2, a un grup acil d'un àcid gras de cadena llarga (C₁₆-C₂₄) es denomina ceramida, i el seu galactosil derivat galactocerebròsid. El cerebròsid sulfat és un

galactocerebròsid amb un grup sulfat al C-3 de la galactosa. El lactosil sulfat és una ceramida unida a una lactosa que presenta un grup sulfat al C-3 de la galactosa.

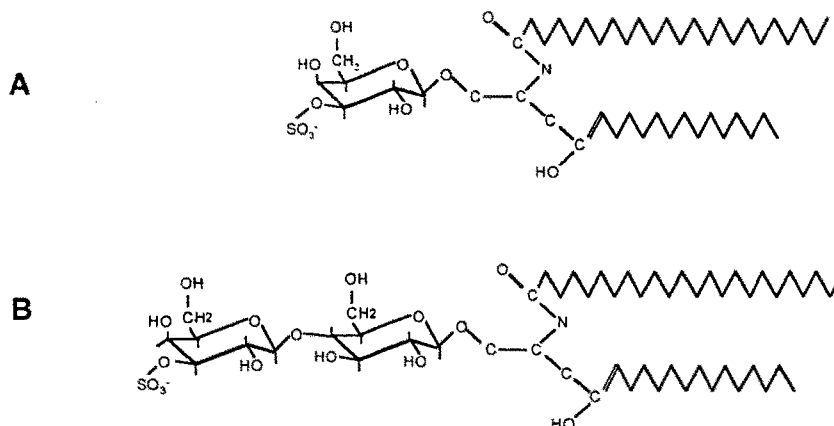


Figura 8. Estructura d'alguns sulfolípid. (A) galactosil sulfàtid; cerebròsid sulfat; galactosil-3-sulfat ceramida. (B) Lactosil sulfàtid; galactosil-3-sulfat-glucosil ceramida; lactosil ceramida 3-sulfat.

5.3. CLÍNICA

La deficiència de l'arilsulfatasa A pot donar un gran ventall de clíniques però s'ha intentat dividir les diferents presentacions en tres grups segons l'edat d'aparició de la malaltia i la severitat de l'afectació. En general, però, els pacients pateixen d'una desmielinització progressiva que causa una gran varietat de símptomes neurològics com atàxia, atròfia òptica, demència, convulsions i tetraparesi espàstica. Uns anys després de l'aparició de la malaltia els pacients moren en un estat decerebrat (Gieselmann i col, 1994).

5.3.1. FORMA INFANTIL

La forma infantil es presenta entre el primer i segon any de vida. S'evidencia un retard del desenvolupament, amb alentiment en aprendre a caminar i dificultats per començar a parlar, també es presenten caigudes freqüents. Tenen feblesa i hipotonia a ambdues cames. A mesura que la malaltia progressa es produeix una regressió mental, pèrdua del llenguatge i presenten atròfia òptica; a la llarga els

pacients s'han de quedar al llit ja que no poden aguantar-se drets i en la fase terminal de la malaltia presenten ceguesa i una incapacitat total de relacionar-se amb el seu entorn. Els pacients afectes amb la forma infantil acostumen a morir abans dels deu anys de vida (Kolodny i Fluharty, 1995). Aquesta forma representa el 60% dels casos de LDM (Gieselmann i col, 1994).

5.3.2. FORMA JUVENIL

En la forma juvenil, la malaltia apareix entre els 3 i els 16 anys de vida. En la majoria dels casos es comença a notar una baixada en el rendiment escolar, confusió en seguir direccions, comportament anormal i incontinència, posteriorment els pacients presenten problemes en la parla, anomalies posturals, augment del to muscular i tremolors. Al cap d'un any el nen deixa de poder caminar i la malaltia va progressant però no tant ràpid com en la forma infantil, de manera que el curs de la malaltia pot durar fins a 20 anys, tot i així, la majoria dels pacients amb la forma juvenil no acostumen a arribar a la vintena (Kolodny i Fluharty, 1995). Aquesta forma representa el 30% dels casos de LDM (Gieselmann i col, 1995).

5.3.3. FORMA ADULTA

La forma adulta de la malaltia, pot aparèixer quasi a qualsevol edat a partir de la pubertat, s'han descrit casos des dels 14 als 62 anys. En la majoria dels casos, a partir del moment que es presenta la malaltia, els pacients sobreviuen de 5 a 10 anys més, però s'han donat casos de cursos més ràpids i casos en què la malaltia progressa lentament durant varies dècades. Normalment es detecta la malaltia per un canvi de personalitat i per problemes en seguir a l'escola o a la feina, l'individu esdevé ansiós, apàtic i emocionalment inestable. Es pot observar poca memòria, pensament desorganitzat i pèrdua de la capacitat de concentració, acostumen a seguir tractament psiquiàtric degut a símptomes de depressió, psicosi tipus esquizofrènia o alcoholisme crònic. Al final de la malaltia es presenta una pèrdua de contacte del pacient amb el seu entorn, postura decorticada i reflexos patològics, fins arribar a un estat severament deteriorat en el qual el pacient és mut, cec, no es mou del llit i no dóna absolutament cap resposta (Kolodny i Fluharty, 1995). La forma adulta representa un 10% dels casos dels pacients amb LDM, tot i que recentment sembla identificar-se'n més casos degut al millor coneixement de la malaltia i, casos

que abans es diagnosticaven com a casos psiquiàtrics, ara es diagnostiquen com a leucodistròfia metacromàtica (Gieselmann i col, 1994).

5.4. DIAGNÒSTIC BIOQUÍMIC

El diagnòstic de la leucodistròfia metacromàtica s'orienta a partir de la detecció de sulfàtids en orina i es confirma per la reducció de l'activitat de l'enzim arilsulfatasa A a nivells patològics.

La mesura de l'activitat de l'arilsulfatasa A es pot realitzar en leucocits i/o en fibroblasts cultivats a partir de biòpsia de pell, i els valors que s'aconsegueixen són del tot fiables per la detecció de malalts (ja que donen del 0 al 15% de l'activitat control) i bastant indicatius per la detecció de portadors, ja que aquests acostumen a presentar la meitat de l'activitat que s'observa en controls. Així mateix, es poden realitzar diagnòstics prenatals en amniocits cultivats o vellositats coriòniques cultivades.

D'altra banda, s'ha de tenir en compte que la disminució de l'activitat de l'arilsulfatasa A respecte els controls, també pot ser deguda a la pseudo-deficiència, condició que abaixa els valors enzimàtics però fins a nivells que no són mai patològics. La presència de la pseudo-deficiència pot dificultar el diagnòstic tant de malalts com de portadors i pot fer donar falsos diagnòstics, és per això que la determinació de la pseudo-deficiència a nivell molecular és de gran ajut en aquests casos.

5.5. HERÈNCIA

La leucodistròfia metacromàtica és una malaltia lisosòmica hereditària autosòmica recessiva.

5.6. INCIDÈNCIA

Tot i que hi ha poques referències en aquest sentit, s'ha estimat una incidència general per la LDM de 1 en 100.000 naixements (Kolodny i Fluharty, 1995), però s'han descrit altres incidències segons la població estudiada. Així, es va veure que la LDM de forma infantil presentava una incidència de 1 en 40.000 al nord de Suècia i a l'estat de Washington (Gustavson i Hagberg, 1971; Farrell, 1981), en jueus habbanites s'ha trobat molt més elevada, de 1 en 75 (Zlotogora i col, 1995), i en indis

Navajos s'ha estimat una freqüència de portadors de 1 en 40 (Pastor-Soler i col, 1995), d'altra banda, en població francesa i alemanya s'han estimat incidències de la malaltia molt inferiors, de 1 en 130.000 i de 1 en 160.000 respectivament (Guibaud i col, 1973; Heim i col, 1997).

5.7. L'ARILSULFATASA A

L'arilsulfatasa A (ARSA, EC 3.1.6.8) o galactocerebròsid sulfatasa, es troba en tots els teixits i fluids del cos, és una glicoproteïna àcida amb un punt isoelèctric baix degut a un alt contingut dels àcids aspàrtic i glutàmic. Per sobre de pH 6.5, l'enzim es presenta com a monòmer d'un pes molecular aproximat de 100KDa, i a pH 4.5 forma un dímer de dues subunitats no idèntiques de 63 i 54 KDa en orina (Laidler i col, 1985); en fetge, placenta i fibroblasts, les dues subunitats tenen mides lleugerament diferents que varien dels 55 als 64KDa (Draper i col, 1976; Waheed i col, 1982; Fujii i col, 1992).

Com altres enzims lisosòmics, l'ARSA es sintetitza als ribosomes lligats a membrana com a precursor glicosilat, després passa pel reticle endoplasmàtic i l'aparell de Golgi, on els oligosacàrids lligats al N de l'asparagina són processats amb la formació d'oligosacàrids fosforilats de tipus complex (Braulke i col, 1990). En fibroblasts normals cultivats, es produeix un polipèptid precursor de 62KDa que entra via receptor manosa-6-fosfat a un endosoma prelisosòmic, abans d'entrar al lisosoma, la pro-forma de l'enzim és processada cap a dues formes madures de 61.5 i 57 KDa per un trencament de cap a 50 residus del l'extrem C-terminal (Waheed i col, 1982; Kelly i col, 1989; Braulke i col, 1990).

El lloc catalític de l'arilsulfatasa A conté un residu d'histidina essencial i un o més residus d'arginina (Lee i Van Etten, 1975; James, 1979).

L'arilsulfatasa A hidrolitza *in vivo* diferents substrats com l'àcid ascòrbic-2-sulfat, el cerebròsid-3-sulfat, el lactosil ceramida-3-sulfat, el seminolípid i la psicovina sulfat, en canvi no pot hidrolitzar el condroitin sulfat, el cerebròsid-6-sulfat o la galactosa-6-sulfat (Farooqui i Mandel, 1977). Tot i que l'àcid ascòrbic-2-sulfat és també un substrat natural de l'ARSA, no s'acumula en pacients LDM degut a que també pot ser hidrolitzat per l'arilsulfatasa B (Roy, 1975). D'altra banda, tots els sulfàtids que són substrats de l'ARSA necessiten unir-se a un activador natural, la saposina B, per poder ser hidrolitzats.

5.8. L'ACTIVADOR NATURAL: SAPOSINA B

La hidròlisi de la majoria d'esfingolípids requereix l'acció de petites glicoproteïnes anomenades proteïnes activadores d'esfingolípids (*Sphingolipid Activator Proteins*, SAP) (per resum veure O'Brien i Kishimoto, 1991). Aquestes proteïnes actuen com a detergents solubilitzant els substrats lipídics hidrofòbics o estimulant l'enzim directament. L'arilsulfatasa A només pot hidrolitzar el seu substrat amb l'ajuda d'una SAP (Fischer i Jatzkewitz, 1977). Aquesta proteïna solubilitza el cerebròsid sulfat i el fa accessible per l'acció hidrolítica de l'enzim i, per tant, la deficiència de la proteïna activadora pot causar també leucodistròfia metacromàtica (Shapiro i col, 1979), però aquesta deficiència és molt menys freqüent que la de l'ARSA.

D'un polipèptid precursor comú anomenat prosaposina se'n deriven quatre proteïnes activadores anomenades saposina A, B, C i D. La prosaposina és una glicoproteïna de 524 aminoàcids amb quatre dominis de proteïna homòlegs, de cap a 80 aminoàcids cada un, que estan separats per regions que funcionen com a espaiadors entre els dominis (Fürst i col, 1988; O'Brien i col, 1988). La prosaposina és tallada proteolíticament donant lloc a quatre proteïnes saposines madures (Fujibayashi i Wenger, 1986) que poden estimular diferents enzims que hidrolitzen esfingolípids. El correcte funcionament de l'arilsulfatasa A depèn de la presència del segon domini de la prosaposina, corresponent a la saposina B (SAP-B). Aquesta, forma un complex 1:1 amb els sulfàtids que són els substrats de l'arilsulfatasa A, permetent la seva hidròlisi.

Es poden donar mutacions al domini de la SAP-B que interferiran en la seva funció, per les quals l'arilsulfatasa A no serà capaç d'hidrolitzar els substrats per què no estan units a la proteïna activadora. Una deficiència d'aquest tipus es caracteritza pels mateixos símptomes clínics típics de la leucodistròfia metacromàtica però acostuma a complicar la interpretació de l'anàlisi bioquímic perquè l'activitat de l'arilsulfatasa A presenta valors normals. És el que s'anomena leucodistròfia metacromàtica deguda al dèficit de SAP-B i és molt poc freqüent (una dotzena de malalts descrits fins ara).

5.9. EL GEN DE L'ARILSULFATASA A (ARSA)

5.9.1. LOCALITZACIÓ

El gen de l'arilsulfatasa A (ARSA) ha estat localitzat a l'extrem terminal del braç llarg del cromosoma 22, al locus 22q13.31-qter (Geurts van Kessel i col, 1980; Narahara i col, 1992).

5.9.2. ESTRUCTURA DEL GEN

Kreysing i col. (1990) van establir l'estructura del gen de l'arilsulfatasa A humana. El gen té vuit exons que van de 103 a 320 nucleòtids i és relativament petit, ja que la zona codificant, que ocupa 1.5Kb, sols agafa 3.2 Kb de DNA genòmic. La seqüència d'aminoàcids que codifica és de 507 residus, encloent un pèptid senyal de 18 aminoàcids. Totes les unions d'*splicing* intró-exó segueixen la seqüència *consensus* GT/AG. S'han identificat varis llocs d'iniciació de la transcripció entre els nucleòtids -367 i -387 i s'ha identificat una regió promotora però que no conté les típiques caixes TATA i CAAT. També s'ha identificat un senyal de poliadenilació AATAAC a uns 100 nucleòtids del codó de terminació TGA, però tot i així, sembla que la regió 3' no traduïda continua fins a una distància considerable de la zona codificant, i sembla que hi podria haver dos senyals més de poliadenilació (Gieselmann i col, 1991a).

S'han identificat tres mRNAs diferents transcrits del gen ARSA, de 2.1, 3.7 i 4.8 Kb, probablement deguts a l'ús de diferents senyals de poliadenilació, però el que és majoritari i responsable de la síntesi d'arilsulfatasa A funcional és el de 2.1Kb (Kreysing i col, 1990).

L'estructura del gen és la de la figura 9.

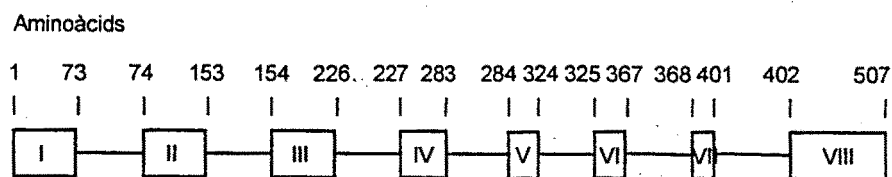


Figura 9. Estructura del gen de l'arilsulfatasa A (ARSA)

El cDNA de l'arilsulfatasa A és de 2027pb i presenta una pauta oberta de lectura de 1521 pb, s'hi ha trobat tres llocs potencials de N-glicosilació (Stein i col, 1989), però s'ha vist que l'arilsulfatasa A només té dues cadenes laterals d'oligosacàrids (Waheed i col, 1983) i no se sap quins dels tres llocs són utilitzats.

5.10. MUTACIONS DESCRITES AL GEN *ARSA*

Fins a l'actualitat s'han descrit una setantena de mutacions al gen *ARSA* causants de leucodistròfia metacromàtica. Cal destacar que no s'han descrit grans delecions ni reordenaments del gen i, per tant, en la majoria dels casos el defecte als al·lels LDM són deguts a mutacions puntuals i petites delecions o insercions.

5.10.1. MUTACIONS DE CANVI DE SENTIT (*MISSENSE*)

Les mutacions de canvi de sentit són la majoria de les mutacions puntuals descrites al gen *ARSA*, representen el 74.7% (Taula 8). Quasi totes elles són de caràcter particular, en la majoria dels casos sols s'han trobat en una sola família.

D'aquestes mutacions cal destacar la mutació P426L. Polten i col. (1991) la van descriure com a una mutació associada a fenotip juvenil o adult que en les poblacions alemanya i holandesa representava un 25% dels al·lels LDM, era, per tant, la mutació de canvi de sentit descrita més freqüent. Posteriorment altres autors han donat diferents freqüències de la mutació: 16.2% als britànics (Barth i col, 1993b) i 14.3% als francesos (Draghia i col, 1997). S'ha hipotetitzat que la mutació dóna fenotip adult o juvenil degut a que la proteïna es sintetitza en quantitats normals, l'activitat és normal i arriba correctament als lisosomes, però un cop allà, l'enzim pateix una reducció dràstica en la vida mitjana (Gieselmann i col, 1994).

Aquesta mutació s'ha trobat a quasi totes les poblacions, però se n'han descrit d'altres que en determinades poblacions representen un percentatge molt alt dels al·lels LDM, com per exemple la T274M, que representa el 20% dels al·lels en pacients australians (Gieselmann i col, 1994), la G99D, present en un 66% dels al·lels LDM en japonesos (Kondo i col, 1991) o la mutació P377L, que representen el 100% dels al·lels estudiats en sis famílies jueves que viuen a Habban (Zlotogora i col, 1995).

D'altra banda, cal destacar que no s'ha descrit cap mutació de canvi de sentit a l'exó I, i que l'exó que en presenta més és l'exó II.

Draghia i col. (1997) van descriure la mutació R496H com a una mutació nova de canvi de sentit causant de LDM, posteriorment Ricketts i col. (1998) van desmentir aquesta afirmació, ja que van trobar-la en un 9% de població control i van comprovar que l'activitat de l'enzim ARSA era del tot normal. Aquest canvi, doncs, és un polimorfisme descrit en el gen *ARSA* (Taula 12).

Taula 8. Mutacions de canvi de sentit (*missense*) del gen *ARSA*. NS- No se sap

Mutació	Exó	Clínica	Canvi de nucleòtid	De	A	Referències
P82L	II	NS	CCG->CTG	Pro	Leu	Barth i col. (1995)
R84Q	II	Adult	CGG->CAG	Arg	Gln	Kappler i col. (1992)
G86D	II	Infantil	GGC->GAC	Gly	Asp	Heinisch i col. (1995)
S95N	II	Infantil	AGC->AAC	Ser	Asn	Draghia i col. (1997)
S96F	II	Infantil	TCC->TTC	Ser	Phe	Gieselmann i col. (1991b) Penzien i col. (1993) Salamon i col. (1994)
S96L	II	Infantil	TCC->CTC	Ser	Leu	Heinisch i col. (1995)
S96G	II	NS	NS	Ser	Gly	Gieselmann i col. (1998)
G99D	II	Adult	GGC->GAC	Gly	Asp	Kondo i col. (1991)
G119R	II	Juvenil	GGA->AGA	Gly	Arg	Draghia i col. (1997)
G122S	II	Adult	GGC->AGC	Gly	Ser	Kappler i col. (1994), Honke i col. (1993)
L135P	II	Adult	CTG->CCG	Leu	Pro	Gomez-Lira i col. (1998)
P136L	II	Infantil	CCC->CTC	Pro	Leu	Heinisch i col. (1995)
P148L	II	Juvenil	CCG->CTG	Pro	Leu	Qu i col. (1999)
D152Y	II	NS	GAC->TAC	Asp	Tyr	Draghia i col. (1997)
G154D	III	NS	GGC->GAC	Gly	Asp	Kappler i col. (1994)
P155R	III	NS	CCC->CGC	Pro	Arg	Gieselmann i col. (1998)
P167R	III	NS	CCT->CGT	Pro	Arg	Kappler i col. (1994)
D169N	III	NS	GAC->AAC	Asp	Asn	Gieselmann i col. (1998)
C172Y	III	NS	TGT->TAT	Cys	Tyr	Barth i col. (1995)
I179S	III	Juvenil Adult	ATC->AGC	Ile	Ser	Penzi i col. (1993), Fluharty i col. (1991) Gomez-Lira i col. (1998) Perusi i col. (1999) Halsall i col. (1999) Marcao i col. (1999b)
Q190H	III	NS	CAG->CAC	Gln	His	Heinisch i col. (1995)
P191T	III	Juvenil	CCC->ACC	Pro	Thr	Qu i col. (1999)
Y201C	III	NS	TAC->TGC	Tyr	Cys	Barth i col. (1995)
A212V	III	Adult	GGC->GTC	Ala	Val	Barth i col. (1993a) Draghia i col. (1997)
A224V	III	Adult	GCC->GTC	Ala	Val	Barth i col. (1993a)
P231T	IV	NS	CCT->ACT	Pro	Thr	Caillaud i col. (1993)
R244C	IV	Infantil	CGC->TGC	Arg	Cys	Draghia i col. (1997)
R244H	IV	Infantil	CGC->CAC	Arg	His	Draghia i col. (1997)
G245R	IV	Infantil	GGG->AGG	Gly	Arg	Hasegawa i col. (1993)
S250Y	IV	Infantil	TCC->TAC	Ser	Tyr	Draghia i col. (1997)
E253K	IV	infantil	GAG->AAG	Glu	Lys	Regis i col. (1999)
D255H	IV	Infantil	GAT->CAT	Asp	His	Lissens i col. (1996) Marcao i col. (1999b)
T274M	IV	Infantil	ACG->ATG	Thr	Met	Harvey i col. (1993) Heinisch i col. (1995)
D281Y	IV	Adult	GAC->TAC	Asp	Tyr	Halsall i col. (1999)
R288C	V	NS	CGT->TGT	Arg	Cys	Gieselmann i col. (1998)
S295Y	V	Infantil	TCC->TAC	Ser	Tyr	Barth i col. (1993a)

Mutació	Exó	Clínica	Canvi de nucleòtid	De	A	Referències
L298S	V	Infantil	TTG->TCG	Leu	Ser	Kurosawa i col. (1998)
C300F	V	Infantil	TGT->TTT	Cys	Phe	Marcao i col. (1999a)
G309S	V	Infantil	GGT->AGT	Gly	Ser	Kreysing i col. (1993)
R311Q	V	NS	CGA->CAA	Arg	Gln	Barth i col. (1995)
A314T	V	Infantil	GCC->ACC	Ala	Thr	Draghia i col. (1997)
D335V	VI	Infantil	GAC->GTC	Asp	Val	Gieselmann i col. (1998) Qu i col. (1999)
K367N	VI	Juvenil	AAG->AAC	Lys	Asn	Draghia i col. (1997)
R370W	VII	Infantil	CGG->TGG	Arg	Trp	Heinisch i col. (1995)
R370Q	VII	Adult	CGG->CAG	Arg	Gln	Heinisch i col. (1995)
P377L	VII	Infantil	CCG->CTG	Pro	Leu	Zlotogora i col. (1994a)
E382K	VII	Juvenil	GAG->AAG	Glu	Lys	Barth i col. (1993a)
R384C	VII	Juvenil	CGT->TGT	Arg	Cys	Draghia i col. (1997)
R390W	VII	Juvenil	CGG->TGG	Arg	Trp	Draghia i col. (1997), Barth i col. (1995)
R390Q	VII	Juvenil	CGG->CAG	Arg	Gln	Coulter-Mackie i Gagnier (1998)
H397Y	VII	Adult	CAC->TAC	His	Tyr	Coulter-Mackie i Gagnier (1998) Qu i col. (1999)
T409I	VIII	Adult	ACT->ATT	Thr	Ile	Hasegawa i col. (1994)
P425T	VIII	Juvenil	CCC->ACC	Pro	Thr	Marcao i col. (1999a)
P426L	VIII	Juvenil / adulta	CCG->CTG	Pro	Leu	Pollen i col. (1991), Penzien i col. (1993) Berger i col. (1993) Barth i col. (1993b) Berger i col. (1997) Draghia i col. (1997) Gieselmann i col. (1998) Perusi i col. (1999)
L428P	VIII	Infantil	CTC->CCC	Leu	Pro	Regis i col. (1997)
A464V	VIII	NS	GCC->GTC	Ala	Val	Berger i col. (1997)

5.10.2. MUTACIONS SENSE SENTIT (*NONSENSE*)

Només s'ha descrit una mutació sense sentit al gen de l'ARSA, es tracta de la mutació Q486X (CAG→TAG), situada a l'exó VIII i lligada a clínica infantil (Harvey i col, 1994; Barth i col, 1994a). Aquest tipus de mutacions són molt poc habituals en la leucodistrofia metacromàtica.

5.10.3. PETITES DELECCIONS I INSERCIONS

Aquestes mutacions representen el 14.7% de les mutacions descrites al gen ARSA (Taula 9).

Cal destacar que només s'ha descrit una inserció, totes les altres mutacions han estat petites delecions, i que estan concentrades al principi (exons I i II) i al final del gen (exons VII i VIII). Totes elles són de caire particular, sols s'han trobat en una família.

Taula 9. Petites insercions i delecions del gen ARSA

NS- No se sap; nt- nucleòtid; cpt. Canvi de pauta de lectura

Numeració segons cDNA descrit per Stein i col. (1989)

Mutació	Exó	Clinica	Caràcter	Deleció	Referències
7delG	I	infantil	Deleció d'un nt, cpt.	Δ G	Berger i col. (1999)
103del8	I	NS	Deleció de 8 nt, cpt.	Δ GACCTGGG	Draghia i col. (1997)
298delC	II	infantil	Deleció de 2 nt., cpt.	Δ C	Kreysing i col. (1993)
297delC	II	infantil	Deleció d'un nt, cpt	Δ C	Kreysing i col. (1993)
391del12	II	infantil	Deleció de 12 nt	Δ AGGGGGCCTTCC	Luyten i col. (1995)
561insC	II	infantil	Inserció d'un nt., cpt.	ins C	Marcao i col. (1999a)
1779delC	VI	infantil	Deleció d'un nt., cpt.	Δ C	Marcao i col. (1999a)
Δ F398	VII	NS	Deleció de 3 nt.	Δ TTC	Gieselmann i col. (1998)
1215del9	VIII	infantil	Deleció de 9 nt.	Δ AGTGATACC	Regis i col. (1998)
1219delAT	VIII	infantil	Deleció de 2 nt., cpt.	Δ AT	Regis i col. (1995)
1401del11	VIII	infantil	Deleció d'11 nt, cpt.	Δ CGCAGCTGTGA	Bohne i col. (1991)

5.10.4. MUTACIONS D'SPLICING

Les mutacions d'*splicing* representen el 9.3% de les mutacions descrites al gen ARSA (Taula 10).

Taula 10. Mutacions d'*splicing* del gen ARSA. NS- No se sap

Mutació	Exó/Intró	Clinica	Codó	Referències
IVS1-2A→G	In1	infantil	cagGGC→cggGGC	Kurosawa i col. (1998)
IVS2+1G→A	In2	infantil	CAGgta→CAGata	Polten i col. (1991) Penzien i col. (1993) Berger i col. (1993) Barth i col. (1993b) Zlotogora i col. (1994a) Salamon i col. (1994)
IVS3+1G→A	In3	inf / juv	CACgta→CACata	Barth i col. (1995)
IVS4+1G→A	In4	infantil	TGGgta→TGGata	Pastor-Soler i col. (1993, 1994, 1995)
G325C	V	NS	CCGgtc→CCTgtc	Gieselmann i col. (1994)
IVS7+1G→A	In7	juvenil	AGCgta→AGGata	Penzien i col. (1993) Fluharty i col. (1991)
T409I	VIII	juvenil	ACT→ATT	Hasegawa i col. (1994)

De les set mutacions d'*splicing* descrites fins a l'actualitat al gen ARSA, quatre afecten la primera base de l'intró, canviant la G de la seqüència donadora d'*splicing* GT per una A, i fent perdre el lloc de reconeixement, provocant *splicings* alternatius.

De totes les mutacions descrites al gen ARSA, la que s'ha estudiat més ha estat la mutació d'*splicing* IVS2+1G→A, lligada a clínica infantil. Aquesta mutació va ser descrita per Polten i col. (1991) i la van trobar en un 25% dels pacients; des d'aleshores, en quasi totes les poblacions estudiades, s'ha trobat amb força freqüència i, en general, és la mutació més freqüent de les causants de LDM. Les freqüències de la mutació a les diferents poblacions són les de la taula 11.

TAULA 11. Freqüències (en percentatge) de la mutació IVS2+1G→A del gen *ARSA* en grups de pacients de diferent origen ètnic i/o geogràfic

Grup de pacients	Freqüència de la IVS2+1G→A	Referències
Britànics	43.2 (dels severs)	Barth i col. (1993b)
Danesos	30	Salamon i col. (1994)
Àrabs	23.5	Zlotogora i col. (1994a)
Francesos	14.3	Draghia i col. (1997)
Japonesos	0	Kondo i col. (1991)

5.11. POLIMORFISMES DESCRITS AL GEN *ARSA*

Fins a l'actualitat, s'han descrit nou polimorfismes al gen *ARSA*, sis d'ells són en zona codificant i cinc d'aquests provoquen canvi d'aminoàcid, la resta són en zona intrònica (Taula 12).

Taula 12. Polimorfismes descrits al gen *ARSA*.

E.R.- Enzim de restricció; (-) destrueix diana; (+) crea diana

Numeració genòmica segons Kreysing i col. (1990)

Polimorfisme	Canvi genòmic	Exó / Intró	E.R.	Referències
L76P	T376C	II	AccI (-)	Berger i col. (1996)
H151H	C602T	II	NlaIII (+)	Perusi i col. (1997)
W193C	G842T	III	BglI (-)	Polten i col. (1991)
IVS4+109G→C	G1294C	in4	NlaIII (+)	Coulter-Mackie i Gagnier (1997)
IVS4-112A→G	A1386G	in4	NlaIII (-)	Coulter-Mackie i Gagnier (1997)
N350S	A1788C	VI	-	Gieselmann i col. (1989)
T391S	C2161G	VII	BsrI (-)	Polten i col. (1991)
IVS7+20C→G	C2213G	in7	BamHI(-)	Coulter-Mackie i Gagnier (1997)
R496H	G2591A	VIII	-	Ricketts i col. (1998)

D'aquests polimorfismes cal destacar que l'N350S és un canvi que afecta un lloc de N-glicosilació i que, juntament amb un canvi que afecta el senyal de poliadenilació, formen l'al·lel de la pseudo-deficiència de l'arilsulfatasa A (veure apartat 5.12.). De totes maneres, s'ha pogut identificar aquest polimorfisme sense estar associat al canvi al senyal de poliadenilació amb una certa freqüència en població control.

5.12. LA PSEUDO-DEFICIÈNCIA DE L'ARILSULFATASA A

En individus clínicament sans es pot detectar una activitat reduïda d'arilsulfatasa A respecte la normal. Aquest fenotip ha estat designat amb el nom de pseudo-deficiència de l'arilsulfatasa A.

5.12.1. CARACTERÍSTIQUES

La pseudo-deficiència es va detectar inicialment en parents sans de pacients LDM, als quals, bioquímicament, se'ls detectava una activitat ARSA de malalt (Du Bois i col, 1975; Lott i col, 1976). Posteriorment es va veure que la pseudo-deficiència era deguda a un al·lel (al·lel ARSApd) que contenia dos canvis, l'N350S (veure taula 12) que afecta un lloc de N-glicosilació i el PolyA-. Ambdós canvis són deguts a una transició de A a G. La mutació N350S és un canvi d'arginina a serina que provoca la pèrdua del lloc de N-glicosilació, aquesta pèrdua explica la mida més petita que presenta l'ARSA en fibroblasts amb la pseudo-deficiència. L'altre canvi afecta el primer senyal de poliadenilació situat després del codó stop que canvia de AATAAC a AGTAAC; el nou senyal provoca una greu deficiència de l'mRNA de 2.1Kb i això explicaria la disminució de la síntesi d'ARSA que s'observa en fibroblasts (Gieselmann i col, 1989).

Tot i que en aquest estudi inicial es va postular que la mutació N350S no contribuïa a la reducció de l'activitat de l'ARSA, paper que quedava adjudicat exclusivament al PolyA-, posteriorment s'ha vist que totes dues mutacions són responsables de la disminució de l'activitat, i que l'efecte combinat de la reducció de l'mRNA de l'ARSA deguda al defecte en el polyA amb la disminució de l'activitat ARSA i la mala direccionalitat cap al lisosoma deguda al canvi N350S, pot reduir l'activitat ARSA en homozigots per la pseudo-deficiència fins a un 8% del normal (Harvey i col, 1998). S'ha vist que la proteïna codificada per l'al·lel ARSApd, tot i estar estructuralment alterada, té propietats similars a la hidrolasa normal, per tant, fins i tot sintetitzada en baixes quantitats és suficient per promoure el catabolisme normal dels sulfàtids i preservar el fenotip sà (Fluharty i col, 1983; Herz i Bach, 1984).

Per estudis en poblacions control fets per varis grups d'autors, es va veure que, mentre la mutació N350S es podia trobar sola en un al·lel en la població normal amb certa freqüència, el canvi que afecta el polyA sempre anava acompanyat de la

N350S, mai es trobava sol (veure freqüències a la taula 13) (Nelson i col, 1991; Barth i col, 1994b; Zlotogora i col, 1994b; Shen i col, 1993; Ricketts i col, 1996; Ott i col, 1997). Aquesta afirmació, però, s'ha vist desmentida recentment, ja que s'han descrit dos germans que presenten la polyA- sola, el que indicaria que el desequilibri de lligament entre les dues mutacions no és perfecte (Ricketts i col, 1996).

D'altra banda, s'han trobat mutacions causants de malaltia en una al·lel ARSAPd i es postula que és tan freqüent trobar un al·lel ARSAPd amb una mutació com en la resta d'al·lells no ARSAPd (Gieselmann i col, 1991b, Regis i col, 1999).

Quan s'estudia l'activitat enzimàtica ARSA de controls i d'heterozigots per l'al·lel ARSAPd, s'ha vist que els valors obtinguts es superposen (Chabás i col, 1993; Goldenfum i col, 1993), així com els valors obtinguts en heterozigots per la malaltia i en homozigots per l'al·lel ARSAPd. En el camp del diagnòstic, doncs, la detecció molecular de les mutacions d'aquest al·lel ajuden a evitar falsos diagnòstics.

5.12.2. INCIDÈNCIA DE L'AL·LEL ARSAPD

Des de la descripció de les mutacions de l'al·lel ARSAPd, s'han realitzat molts estudis en diferents poblacions per estimar la incidència de l'al·lel en controls, així com també la presència de la mutació N350S sola (taula 13). La incidència de l'al·lel ARSAPd oscil·la entre el 0.5 i el 22.7%.

Taula 13. Incidència en percentatge de l'al·lel ARSAPd i el polimorfisme N350S del gen ARSA en grups de pacients de diferent origen ètnic i/o geogràfic.

Grup de pacients	PolyA*	N350S sol	Referències
Europeus	7.5	6	Ott i col. (1997)
Espanyols	12.7	ND	Chabás i col. (1993)
Britànics	12.3	5.2	Barth i col. (1994b)
Australians	9.6	4.8	Nelson i col. (1991)
Jueus no-asquenasites	12.2	3.6	Zlotogora i col. (1994b)
Jueus asquenasites	13.3	0.6	Zlotogora i col. (1994b)
Àrabs	22.7	6.8	Zlotogora i col. (1994b)
Indis (de l'Índia)	12.5	1	Ott i col. (1997)
Brasilers	7.9	20.7	Pedron i col. (1999)
Africans	0.5	32	Ott i col. (1997)
Est-asiàtics	0.5	21	Ott i col. (1997)

ND- No determinat. * S'entén que l'estudi de la mutació PolyA- és representatiu de l'al·lel ARSAPd, ja que, en general, sempre que es troba aquesta mutació hi ha també la mutació N350S

Aquestes dades han donat lloc a la hipòtesi que el canvi N350S pot ser un esdeveniment recurrent entre els europeus, però que va ocórrer per primer cop en un al·lel ancestral abans que l'*Homo sapiens* sortís d'Àfrica. La mutació al senyal de poliadenilació es va donar en aquest al·lel ancestral mutat i va tenir lloc després de la divergència entre les línies europees i est-asiàtiques (Ott i col, 1997).

5.12.3. L'AL·LEL ARSAPD I EL SEU EFECTE SOBRE LA CLÍNICA

Alguns autors han estudiat la influència que pot tenir la presència de l'al·lel ARSAPd en persones no LDM en l'aparició de malalties neurològiques com la malaltia d'Alzheimer i la demència vascular, suggerint que ser portador de l'al·lel ARSAPd podria ser un factor de risc per la demència (Philpot i col, 1997).

El paper que pot tenir un al·lel com l'ARSAPd, que redueix l'activitat de l'enzim, quan aquest està en combinació amb mutacions al gen ARSA que provoquen la malaltia, ha estat també estudiat, però les conclusions que se n'han extret no són massa clares. S'ha postulat, però que si una mutació que pot ser només abaixés lleugerament l'activitat ARSA ocorre en un al·lel ARSAPd, pot ser causant de malaltia (Gieselmann i col, 1991a i b). Els resultats obtinguts per Regis i col. (1999) reforcen aquesta hipòtesi, ja que van identificar un pacient que presentava la mutació P426L associada a l'al·lel ARSAPd, i el pacient enlloc de presentar la forma juvenil/adulta de la malaltia típica d'aquesta mutació, presentava la forma infantil. D'altra banda, estudis fets en controls sans (ARSA+/ARSA+), homozigots per l'ARSAPd (ARSAPd/ARSAPd) i heterozigots per l'ARSAPd i per un al·lel LDM (ARSAPd/ARSA-) han demostrat que en general, els portadors de la pseudo-deficiència no acostumen a presentar símptomes neurològics, però els heterozigots ARSAPd/ARSA- que tenen activitat ARSA a nivells crítics, poden desenvolupar desordres neuropsiquiàtrics d'aparició tardana (Hohenschutz i col, 1989; Kappler i col, 1991).

5.13. ESTUDI D'HAPLOTIPS

Ja des del començament dels estudis moleculars del gen ARSA, es van descriure dos al·lells diferents, l'al·lel I (perquè donava clínica infantil) i l'al·lel A (perquè donava clínica adulta). L'al·lel I contenia la mutació IVS2+1G→A i l'haplotip [T, G] respecte els polimorfismes [G842T, C2161G], i l'al·lel A contenia la mutació P426L i l'haplotip [G, C] respecte els mateixos marcadors (Polten i col, 1991).

Posteriorment i degut a la relativament alta freqüència de la mutació IVS2+1G→A, altres autors han realitzat estudis d'haplotips lligats a aquesta mutació a mesura que s'han anat descrivint els polimorfismes. Així, s'ha pogut comprovar que la IVS2+1G→A està sempre associada a un mateix haplotip, [T, G, G, G, G] respecte els polimorfismes [G842T, G1294C, A1386G, C2161G, C2213G], aquest desequilibri de lligament aporta la idea d'origen únic de la mutació (Zlotogora i col, 1994b; Coulter-Mackie i Gagnier, 1997).

La mutació P426L també s'ha trobat en desequilibri de lligament amb un determinat haplotip, el [G, G, G, C, G] per als mateixos marcadors (Polten i col, 1991; Coulter-Mackie i Gagnier, 1997).

L'al·lel de la pseudo-deficiència ARSApd, que conté el canvi N350S i el PolyA-, també ha estat objecte d'estudi d'haplotips, i s'ha trobat sempre associat al mateix haplotip que la mutació P426L, el [G, G, G, C, G] respecte els marcadors [G842T, G1294C, A1386G, C2161G, C2213G]. En canvi, el polimorfisme N350S quan es presenta sol, pot anar associat a fins a tres haplotips diferents (Zlotogora i col, 1994b; Coulter-Mackie i Gagnier, 1997).

5.14. CORRELACIÓ GENOTIP-FENOTIP

La correlació genotip-fenotip en la leucodistròfia metacromàtica sembla ser força evident. L'homozigositat per al·lells que no permeten la síntesi de gens d'enzim funcional (com les mutacions d'*splicing* i les delecions) causen la forma severa, infantil, de la malaltia. L'heterozigositat per un al·lel nul d'aquest tipus i un al·lel que permet la síntesi d'una petita quantitat d'enzim funcional (com la mutació P426L), acostuma a causar les formes juvenils i ocasionalment fins i tot la forma adulta de la malaltia. L'homozigositat per al·lells que permeten una petita activitat residual de l'enzim, en la majoria dels casos dona lloc a una clínica adulta i algunes vegades a la forma juvenil de la leucodistròfia metacromàtica (Gieselmann i col, 1994). De totes maneres, la variabilitat de severitat entre pacients amb genotip idèntic pot ser molt remarcable i fa que la predicció del curs de la malaltia basant-se en el genotip sigui quasi impossible (Polten i col, 1991).

La correlació genotip-fenotip més clara establerta fins ara ha estat en la mutació IVS2+1G→A, que en homozigosi dona quasi sempre clínica infantil, i la

mutació P426L, que és una mutació suau i pot donar clínica juvenil o, quasi sempre, adulta (Polten i col, 1991).

5.15. TERÀPIA

Actualment no hi ha un tractament específic que pugui aturar la progressió de la LDM. L'objectiu, en tractar un nen o adult amb aquesta malaltia, és intentar mantenir les funcions i una interacció entenedora el màxim de temps possible.

5.15.1. TRASPLANTAMENT DE MOLL D'OS

Fins a l'actualitat s'ha realitzat el trasplantament de moll d'os en molts pacients i els resultats aconseguits no són del tot desesperançadors.

Així com els trasplantaments realitzats en pacients que presenten la clínica infantil, i ja amb símptomes neurològics, només ha aconseguit alentir la progressió de la malaltia (Pridjian i col, 1993), en pacients de forma juvenil el trasplantament aconsegueix estabilitzar la malaltia, els signes neurològics no progressen i no presenten deteriorament neuro-psicològic, el trasplantament pot incrementar els nivells d'ARSA el suficient per prevenir el deteriorament (Kidd i col, 1998). Recentment, però, en el seguiment fet a una pacient amb la forma juvenil, després de sis anys d'haver-li fet el trasplantament, s'ha vist que la malaltia progressa igualment i de forma similar a com ho faria si aquesta seguís el seu curs natural (Kapaun i col, 1999). També s'ha provat el trasplantament de moll d'os en dos pacients amb LDM deguda a la deficiència de la SAP-B amb resultats dispersos. En un cas, després d'un seguiment de 3 anys, el pacient ha anat empitjorant i no s'ha aturat la progressió de la malaltia (Landrieu i col, 1998), mentre que en una malalta espanyola, als 4 anys del trasplantament, la resposta ha estat moderadament encoratjadora, amb alentiment del curs de la malaltia (Chabás i col, 1997).

En general, s'ha vist que els pacients que ja manifesten signes neurològics no milloren després del trasplantament i només se'ls alenteix la progressió, és per això que es recomana aplicar aquesta teràpia als pacients el més aviat possible i quan encara no s'han desenvolupat aquests trets (Krivit i col, 1987 i 1990b), això, però, no és garantia absoluta de l'èxit de la teràpia, ja que s'han donat casos en què el trasplantament s'ha realitzat en un nadó dos anys abans de l'aparició esperada dels símptomes i la malaltia ha aparegut al cap dels 18 mesos (Fath i col, 1997).

Tot i que el trasplantament de moll d'os ha tingut èxits limitats, és actualment l'única opció terapèutica definitiva i la investigació continuada en aquest camp és del tot justificada.

5.15.2. TERÀPIA GÈNICA

La teràpia gènica aplicada a la leucodistròfia metacromàtica està encara als seus estadis inicials d'estudi.

Tot i que s'ha aconseguit transduir i expressar el gen *ARSA* en fibroblasts de pacients i s'ha corregit el defecte amb èxit (Rommerskirch i col, 1991; Ohashi i col, 1993), i que s'ha proposat un model de teràpia gènica en ratolins LDM (Gieselmann i col, 1998), qualsevol aplicació d'aquesta teràpia a pacients vius ha d'esperar una millora considerable en les tècniques de distribució del gen. Ara per ara, doncs, no és una teràpia aplicable als pacients.

5.15.3. TERÀPIA DE SUBSTITUCIÓ ENZIMÀTICA

La teràpia de substitució enzimàtica per infusió de l'enzim normal no ha estat mai aplicat amb èxit en malalties d'emmagatzematge lisosòmic de tipus leucodistròfia. S'ha pogut veure com l'arilsulfatasa A subministrada al medi nutritiu de cultius de teixit és endocitada i pot degradar sulfàtids acumulats a les cèl·lules, però l'enviar l'enzim a una cèl·lula oligodendroglial *in vivo* és una tasca molt més difícil. S'han fet varis intents en malalts LDM i cap ha resultat amb èxit (Kolodny i Fluharty, 1995).

OBJECTIUS

L'objectiu principal d'aquest treball ha estat fer la caracterització genètica i molecular de les mucopolisacaridosi tipus I, mucopolisacaridosi tipus II i de la leucodistròfia metacromàtica en la població espanyola afecta, amb el principal propòsit de desenvolupar una estratègia adequada de diagnòstic molecular. Els objectius concrets que ens hem proposat són:

- **Anàlisi mutacional.** Determinar l'espectre de mutacions responsables de la mucopolisacaridosi de tipus I, mucopolisacaridosi de tipus II i de la leucodistròfia metacromàtica en els malalts. En la mucopolisacaridosi de tipus I s'estudiarà la prevalència de les mutacions W402X, Q70X, P533R, R89Q i IVS5-7G→A determinades com a prevalents en altres poblacions i localitzades al gen que codifica l' α -L-iduronidasa (*IDUA*). En canvi, en la mucopolisacaridosi de tipus II i la leucodistròfia metacromàtica, es determinarà l'espectre de mutacions responsables de les dues malalties mitjançant l'anàlisi del gen que codifica l'iduronat-2-sulfatasa (*IDS*) i l'arilsulfatasa A (*ARSA*), respectivament.
- **Correlació genotip-fenotip.** Establir correlacions entre aquestes mutacions i l'expressió clínica de la malaltia, per utilitzar aquesta informació en el consell genètic, en el probable pronòstic de la malaltia i en el consell sobre la conveniència d'establir una possible teràpia.
- **Aplicació diagnòstica.** Basant-nos en els resultats d'aquests estudis, establir una estratègia d'anàlisi molecular de la mucopolisacaridosi de tipus I, la mucopolisacaridosi de tipus II i la leucodistròfia metacromàtica per la detecció de portadors sans i pel diagnòstic prenatal d'aquestes malalties hereditàries.
- **Origen.** Estudiar si les mutacions més prevalents en aquests malalts són recurrents o bé deriven d'al·lels ancestrals que s'han expandit a les poblacions

MATERIAL I

MÈTODES

1. MATERIAL

1.1. PACIENTS I FAMÍLIES ESTUDIADES

Tenint en compte les tres malalties (MPS I, MPS II i Leucodistròfia Metacromàtica), s'han estudiat noranta-sis malalts i cent seixanta-set individus sans d'un total de vuitanta-tres famílies, de les quals cinc eren d'origen marroquí i la resta espanyoles. Les mostres d'aquestes famílies ens han estat trameses per pediatres i neuròlegs d'hospitals d'arreu de l'estat espanyol amb la sospita clínica de malaltia lisosòmica i, un cop a l'Institut de Bioquímica Clínica, se n'ha fet el diagnòstic bioquímic. Establert el diagnòstic del cas índex (pacient), s'ha fet l'estudi molecular a fi de poder oferir el diagnòstic de portadors i diagnòstic prenatal als membres de la família que ho sol·licitin.

1.2. MOSTRES

Les mostres que s'han utilitzat han estat de diferent tipus segons l'estudi a fer:

- *Diagnòstic del cas índex i de familiars portadors:* fibroblasts cultivats a partir de biòpsia de pell i leucocits aïllats de sang.
- *Diagnòstic prenatal:* Vellositats coriòniques directes i cultivades, i amniocits cultivats a partir de líquid amniòtic.

D'aquestes mostres se n'ha extret el material bàsic pel nostre estudi: el DNA i l'RNA.

1.3. OBTENCIÓ DEL DNA

L'obtenció del DNA a partir de fibroblasts cultivats, leucocits, vellositats coriòniques cultivades i amniocits cultivats s'ha fet seguint el mètode d'extracció salina (Miller i col, 1988).

L'obtenció de DNA a partir de vellositats coriòniques directes s'ha fet seguint el següent mètode:

Protocol

1. En una placa de Petri separar les restes hemàtiques del villi amb una agulla
2. Passar el villi a una altra placa amb una fulla de bisturi i homogeneïtzar la mostra
3. Passar-ho a un tub Eppendorf
4. Afegir 300µl de tampó d'urea

5. Afegir 6µl de solució de Proteinasa K i deixar tota la nit a 37°C en agitació
6. Afegir un volum de fenol-cloroform-isoamílic 25:24:1
7. Centrifugar un minut a 14000 rpm
8. Passar el sobrenedant a un altre tub Eppendorf
9. Afegir un volum de cloroform-isoamílic 24:1
10. Centrifugar un minut a 14000 rpm
11. Passar el sobrenedant a un altre tub
12. Afegir 40µl d'Acetat de Sodi 3M pH 5.2
13. Afegir dos volums d'etanol absolut
14. Deixar mitja hora a -70°C
15. Centrifugar mitja hora a 14000 rpm
16. Rentar el pellet amb etanol al 70%
17. Afegir de 50 a 100 µl d'aigua estèril o bé TE
18. Ressuspendre el DNA a 37°C durant tota la nit o bé a 65°C durant 10 min i guardarlo a -20°C

<u>Tampó d'urea</u>	<u>Solució de Proteinasa K</u>
8M Urea	10mg/ml Proteinasa K
300mM NaCl	1% SDS
10mM EDTA pH 8	125mM EDTA pH 8
10mM Tris pH 8	
2% SDS	

La mesura de la concentració de DNA es realitza espectrofotomètricament. Es fa una dilució 1:20 de la mostra i es mesura l'absorbància a 260 i a 280 nm. La lectura que s'obté a 260 nm és proporcional a la concentració de DNA present a la dilució (1 unitat de D.O₂₆₀ correspon a 50 µg / ml de DNA de cadena doble). La mesura del quocient D.O₂₆₀ / D.O₂₈₀ indica la puresa del DNA. S'aconsella que aquest quocient sigui d'entre 1.7 i 2 (Sambrook i col, 1989).

1.4. OBTENCIÓ DE L'RNA

L'obtenció d'RNA s'ha fet a partir de fibroblasts cultivats. S'ha utilitzat el sistema d'aïllament Ultraspec™ RNA isolation system (Biotecx) seguint el protocol de la casa comercial (Biotecx bulletin nº 27, 1992).

La mesura de concentració d'RNA es realitza també espectrofotomètricament. Es fa una dilució 1:40 de la mostra i es mesura l'absorbància a 260 i a 280 nm. La lectura que s'obté a 260 nm és proporcional a la concentració d'RNA present a la

dilució (1 unitat de D.O₂₆₀ correspon a 40 µg / ml d'RNA). La mesura del quocient D.O₂₆₀ / D.O₂₈₀ indica la puresa de l'RNA. S'aconsella que aquest quocient sigui d'entre 1.7 i 2 (Sambrook i col, 1989).

1.5. SÍNTESI DE CDNA

Per la síntesi del cDNA s'ha utilitzat la AMV transcriptasa reversa (*Promega*). En cada malaltia s'ha utilitzat l'encebador situat més a 3' i en direcció reversa.

Protocol

1. Desnaturalitzar l'encebador (concentrat a 10µM) a 96°C durant 10 min i clavar en gel
2. Barrejar en un tub 4µl d'RNA (uns 5µg) amb 1µl d'encebador
3. Deixar 10min a 65°C
4. Deixar 10min a 37°C
5. Afegir-li
5µl tampó de la transcriptasa (*Promega*)
1µl (9U) de transcriptasa
1µl de dNTPs 10mM
1µl de RNAsin® (*Promega*), inhibidor de RNases
12µl d'aigua tractada amb DEPC
6. Deixar la barreja a 52°C durant 45min
7. Deixar a 95°C durant 5min

Aquest cDNA serà el material de sortida per amplificar per PCR i fer els estudis necessaris en cada malaltia.

2. MÈTODES

2.1. TÈCNIQUES GENERALS

2.1.1. REACCIÓ EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Les condicions d'amplificació (Saiki i col, 1988) depenen, en gran part, de la regió del genoma que s'analitza i, sobretot, de la seqüència dels encebadors utilitzats. Les condicions generals, sobre les que s'han fet variacions per tal de millorar-ne el resultat, són:

Protocol

1. Concentració dels reactius

300 ng de DNA

200 µM de dNTPs

20 pmols de cada encebador

1x tampó (*Boehringer Mannheim*)1.5 mM MgCl₂2.5 U *Taq* DNA polimerasa (*Boehringer Mannheim*)

Volum final de 50 µl

Cobrir la reacció amb una gota d'oli mineral

2. Condicions de la reacció

Desnaturalització inicial: 5 min a 94°C

35 cicles amb dos passos*: 40 seg. a 94°C (desnaturalització)

30 seg. a la temperatura d'anellament
(anellament i extensió)

Extensió final: 3 min a 72°C

Nota:

- * La majoria de fragments amplificats en aquest treball són menors de 500 pb i, per tant, s'ha pogut utilitzar un protocol amb només dos passos (desnaturalització i anellament). El temps en què la temperatura augmenta des de la d'anellament a 94°C és suficient per què la polimerasa actuï. Per fragments de més de 500 pb o pels que l'amplificació no era prou bona, s'ha afegit un tercer pas des de 30seg a 1 min a 72°C.

Els aparells de PCR utilitzats han estat el model PTC-100 (*MJ Research*) i el Progene (*Techne*).

En la majoria d'amplificacions per PCR s'han mantingut aquestes condicions i només s'han modificat la temperatura d'anellament de la reacció; en algunes, a més, s'ha hagut de modificar la concentració de MgCl₂ i/o afegir un 10% de DMSO.

La temperatura de dissociació o T_d (°C) de cadascun dels encebadors es calcula segons la fórmula (Suggs i col, 1981):

$$T_d = (n^{\circ}G + n^{\circ}C) \times 4 + (n^{\circ}A + n^{\circ}T) \times 2$$

La temperatura d'anellament emprada en la PCR és entre 5 o 10°C per sota de la T_d.

Després de la reacció de PCR, es comprova l'amplificació del fragment desitjat carregant 7µl de producte amb 3µl de tampó de càrrega en un gel d'agarosa al 2%, es corre l'electroforesi a 100V durant una hora aproximadament i es tenyeix amb una solució de Bromur d'Etidi (veure apartat 2.1.5). Es deixa el gel de 10 a 30 min en la solució i s'observen les bandes en un transil·luminador de llum ultraviolada de longitud d'ona llarga.

2.1.2. MÈTODES PER LA DETECCIÓ DE NOVES MUTACIONS

2.1.2.1. SSCP (*Single Strand Conformation Polymorphism*)

Aquesta tècnica permet detectar diferències de fins a un sol parell de bases degut a la diferent conformació que adopten les cadenes senzilles quan es desnaturalitzen, ja que presenten un recorregut electroforètic diferent que visualment ens permet detectar diferències entre les cadenes control i les que presenten algun canvi. La mida òptima dels fragments és d'entre 100 i 300 parells de bases (Orita i col, 1989; Sheffield i col, 1993).

2.1.2.1.1. Amplificació per PCR i electroforesi

Amplificació per PCR dels fragments que es volen estudiar amb els encebadors i condicions apropiats per cada un (veure seccions 2.2.1., 2.3.1., 2.3.2. i 2.4.1.).

Per l'electroforesi s'han utilitzat gels de poliacrilamida : bisacrilamida (29:1) no desnaturalitzants amb 1xTBE; els agents polimeritzants han estat 0.85% d'APS al 10% i 0.1% de TEMED. Els aparells utilitzats són el model SE410 de 24 cm (*Hofer Scientific Instruments*) i el MiniProtean II (*BioRad*) de 7 cm de llargada.

Es barregen un volum de producte de PCR amb un volum de tampó de càrrega desnaturalitzant (7µl si és al SE410 i 3µl si és al MiniProtean), es desnaturalitzen les mostres a 96°C durant 3 min i es deixen en gel uns 3 min més.

L'electroforesi es duu a terme a voltatge constant, a 350-400V si és a temperatura ambient i a 480-550V si és a 4°C durant tota la nit (15-20h) pel model SE410, mentre que l'electroforesi en MiniProtean s'ha corregut a 200V a temperatura ambient i a 300V a 4°C durant 2-4h, segons la mida dels fragments.

Per què la tècnica de l'SSCP sigui el màxim d'efectiva s'han de provar diferents condicions d'electroforesi variant els paràmetres:

- Temperatura d'electroforesi: a temperatura ambient o a 4°C

- Concentració d'acrilamida : bisacrilamida: 8, 10, 12 o 15%
- Presència de glicerol: 0, 5 o 10%

D'entrada sempre s'ha provat les dues condicions del 12% d'acrilamida: bisacrilamida, sense glicerol, a temperatura ambient i a 4°C, i si després de passar tots els exons d'un pacient no s'ha trobat cap canvi o en cas de dubte, s'han provat altres condicions.

Tampó de càrrega desnaturalitzant

95% formamida desionitzada

20mM EDTA

0.05% Xilencianol

0.05% Blau de bromofenol

2.1.2.1.2. Tinció en plata

Un cop correguda l'electroforesi, els gels s'han tenyit amb nitrat de plata. És un mètode molt senzill i sensible que permet visualitzar tant els cadenes dobles com les cadenes senzilles (Leibermann i col, 1990).

Protocol

1. Fixar el gel en etanol 10% durant 5 min
2. Tractar el gel amb HNO₃ 1% durant 3 min, per oxidar-lo
3. Fer dos rentats de 30 seg. agitant amb aigua destil·lada
4. Tenyir amb AgNO₃ 12mM durant 20 min com a mínim
5. Fer dos rentats de 30 seg. Agitant amb aigua destil·lada
6. Revelar amb una solució de Na₂CO₃ 280mM i formaldehid 0.02%. Cal agitar constantment el gel durant el revelat i canviar la solució quan es forma un precipitat de color negrós
7. Posar el gel en àcid acètic 10% durant 5 min com a mínim per aturar el revelat
8. Deixar el gel en aigua
9. Assecar-lo entre dos fulls de paper de celofan xops d'aigua ficats entre dos marcs de plàstic i fixats amb pinces, a temperatura ambient (24h) o en un assecador de gels d'aire calent (2h) com el Gel Air Dryer (BioRad)

2.1.2.2. Anàlisi d'heterodúplex

Quan s'amplifiquen al·lells de DNA que difereixen entre ells en la seva seqüència es formen molècules de DNA heterodúplex, en les quals els dos al·lells s'aparellen però en la zona que són diferents, l'aparellament és imperfecte. Aquesta

zona desaparellada pot ser suficient per fer variar la mobilitat de la molècula respecte l'homodúplex en una electroforesi en gel de poliacrilamida. La mida òptima dels fragments per fer aquest anàlisi és d'entre 100 i 400 pb (Keen i col, 1991; White i col, 1992).

2.1.2.2.1. Amplificació per PCR i electroforesi

Amplificació per PCR dels fragments que es volen estudiar amb els encebadors i condicions apropiats per cada un (veure seccions 2.2.1., 2.3.1., 2.3.2. i 2.4.1.), però per tal d'afavorir la formació d'heterodúplexs, a les reaccions de PCR se'ls ha afegit un últim pas de desnaturalització de 3 min a 96°C, després es deixen refredar lentament a temperatura ambient perquè es renaturalitzin durant 20-30 min abans de carregar-les al gel. En alguns casos, s'ha induït la formació d'heterodúplexs barrejant producte de PCR de controls amb producte de PCR amplificat a partir de DNA homozigot per una mutació o un polimorfisme. En aquest cas també cal desnaturalitzar la barreja a 96°C durant 3 min i deixar refredar.

L'electroforesi s'ha realitzat en els mateixos aparells que a la secció 2.1.2.1.1. S'ha carregat de 3 a 7µl de mostra amb 0.2 vol. de tampó de càrrega i l'electroforesi es corre a voltatge constant de 150 a 300 V en l'aparell SE410 durant tota la nit i entre 100 i 150V en el MiniProtean II durant 1-2 h.

Sovint en fer SSCP ja es poden detectar heterodúplexs ja que sempre hi ha una part de producte de PCR que es renaturalitza.

2.1.2.2.2. Tinció

La tinció dels gels es fa amb nitrat de plata (veure apartat 2.1.2.1.2) o bé en solució de Bromur d'Etidi (veure apartat 2.1.1.).

2.1.3. MÈTODES PER LA DETECCIÓ DE MUTACIONS JA DESCRITES PRÈVIAMENT

2.1.3.1. Digestió amb enzims de restricció

Per les mutacions o canvis que creen o destrueixen una diana per un enzim de restricció, s'ha utilitzat la digestió amb l'enzim concret per fer el diagnòstic. S'ha fet seguint les recomanacions de la casa comercial: utilització del tampó corresponent a cada enzim, addició de BSA quan calia i incubació a la temperatura indicada per cada un. En general, la majoria d'enzims de restricció utilitzen el tampó a x1, quan

ha calgut BSA s'hi ha afegit 100µg/ml, la temperatura de restricció acostuma a ser de 37°C i la digestió es duu a terme durant tota la nit. En general n'hi ha prou amb 10U d'enzim de restricció per digerir tot el producte. La reacció s'acostuma a fer en un volum total de 50µl dels quals 15µl corresponen al producte de PCR a digerir.

La digestió es comprova en gel d'agarosa a diferents concentracions segons els fragments que es volen diferenciar, des de l'1% fins al 2% d'agarosa normal amb 2% d'agarosa NuSieve™GTG™ (*FMC Bioproducts*). Per fragments amb poca diferència de parells de bases s'han utilitzat gels de poliacrilamida en el MiniProteanII™ (*BioRad*). Es carrega de 7 a 12µl de la digestió amb 0.2 vol. de tampó de càrrega i es corre l'electroforesi a voltatge constant de 70 a 100V durant 1-2h. El gel es tenyeix amb solució de Bromur d'Etidi, o els de poliacrilamida també amb nitrat de plata.

2.1.3.2. SSCP

Un cop conegut el patró que una mutació o canvi presenta en una o varies condicions d'SSCP, aquest patró pot ser utilitzat per comparació per diagnosticar altres pacients. Cal que la mutació o canvi hagi estat seqüenciat i que els patrons siguin clars, així mateix cal comprovar la similitud de patrons en totes les condicions d'SSCP per descartar que no sigui un canvi diferent que dona el mateix patró, ja que la probabilitat que dues mutacions donin el mateix en varies condicions és molt baixa. Tot i així, el diagnòstic de mutacions ja conegudes per SSCP només s'ha fet quan no hi ha hagut un enzim de restricció que les detectés.

2.1.4. SEQÜENCIACIÓ

2.1.4.1. Preparació del producte per seqüenciar

2.1.4.1.1. Aïllament de l'al·lel mutat

En la malaltia de Hunter, per ser lligada al cromosoma X, aquest pas no ha calgut, ja que els pacients són hemizigots i el producte de PCR conté només l'al·lel mutat. En les malalties autosòmiques, tampoc ha calgut aquest pas si el pacient és homozigot per la mutació, però si és heterozigot el producte de PCR conté tant

producte de l'amplificació de l'al·lel mutat com del no mutat i convé quedar-nos només amb el mutat per poder seqüenciar-lo.

Com que el laboratori no contemplava la infraestructura per a realitzar clonatges, s'ha optat per aïllar l'al·lel mutat retallant la banda que dóna el patró anòmal en SSCP del gel de poliacrilamida.

Protocol

1. En acabar la tinció en plata del gel, deixar només un minut en àcid acètic 10% per parar el revelat i deixar-lo en aigua
2. Amb una espàtula fina retallar la banda anòmala del gel de poliacrilamida i posar-la en un tub Eppendorf de 0.5ml
3. Afegir aigua al tub fins cobrir la banda (aprox. uns 200µl)
4. Posar una gota d'oli mineral
5. Deixar 3 hores en un bany a 50°C
6. Treure el sobrenedant i passar-lo a un altre tub
7. Afegir 0.1 vol d'acetat sòdic 3M pH 5.2
8. Afegir 3 vol d'etanol fred (-20°C)
9. Afegir 1µl de glicogen 20µg/µl (*Boehringer Mannheim*)
10. Deixar el tub a -70°C durant 30 min
11. Centrifugar a 12500 rpm durant 30 min
12. Treure sobrenedant
13. Ressuspendre el pellet en 10µl d'aigua destil·lada
14. Utilitzar 5µl per la nova PCR

2.1.4.1.2. PCR de l'al·lel mutat i comprovació

Un cop extret el DNA de la banda retallada cal utilitzar-ne 5µl per fer una nova PCR, en la qual, si l'aïllament ha anat bé, només amplificarem l'al·lel mutat. Per comprovar-ho, caldrà fer un nou gel d'SSCP posant de costat aquest producte de PCR, el del qual vam retallar banda i un control. Per continuar caldrà comprovar que només tenim patró anòmal i no ens queda cap rastre del patró control. Si no és així caldrà retallar banda de nou i tornar a començar.

2.1.4.1.3. Purificació del producte de PCR

Si el producte de PCR no té bandes inespecífiques, es fan tres tubs de producte de PCR, els quals s'ajuntaran per fer un volum de 150µl de producte i es

purifica amb el Qiaquick PCR purification Kit (Qiagen), que permet quedar-te només amb el producte i treu de la solució la resta d'encebadors i de dNTPs que hi hagin.

Si el producte de PCR té alguna banda inespecífica deguda a la reamplificació, cal fer, igual que abans, un volum de 150µl de producte que es barreja amb 0.2vol de tampó de càrrega. La mostra es carrega en un gel d'agarosa NuSieve™GTG™ (FMC Bioproducts) al 3% i es corre a 70V, ja que és agarosa de baix punt de fusió, durant 2-3 h. Es tenyeix el gel en solució de Bromur d'Etidi i amb una fulla d'afaitar es retalla la banda desitjada. El producte es purifica amb el Qiaquick Gel extraction kit (Qiagen).

Ambdós kits utilitzats en aquesta secció es basen en l'acomplexament del DNA a una resina i la seva elució en una minicolumna, en tots dos casos s'han seguit les instruccions del subministrador.

2.1.4.2. Seqüenciació utilitzant [α -³⁵S]dATP

2.1.4.2.1. Reacció de seqüència

Per la reacció de seqüència s'ha utilitzat el Sequenase™ 2.0 DNA sequencing kit (USB, Amersham), que fa servir com a enzim la seqüenasa, una variant de la DNA polimerasa del bacteriòfag T4. S'han emprat inosines en comptes de guanosines per tal d'evitar estructures secundàries del DNA que aturin la reacció de seqüència. Pel marcatge s'ha utilitzat Readyvue™ [α -³⁵S]dATP (10mCi/ml, Amersham).

Protocol

1. Barrejar en un tub 3µl de producte de PCR purificat (25-50ng/ µl)
0.5µl d'encebador (10pmols/µl)
1.5µl d'aigua destil·lada
2. Posar el tub a 96°C durant 3 min i clavar en gel 5 min
3. Fer un pols de centrifuga i clavar en gel altre cop
4. Preparar quatre tubs ben rotulats i al·liquotar 1.25µl de cada un dels quatre ddNTPs.
Incubar els tubs a 37°C durant un min.

5. Afegir al tub del pas 3,
 - 1µl de tampó de la seqüenasa
 - 0.5µl de DTT 0.1M
 - 0.5µl de Mn²⁺
 - 0.55µl de ³⁵S-dATP
 - 0.2µl de barreja de marcatge
 - 10U de seqüenasa
6. Incubar a temperatura ambient 5 min
7. Repartir 1.75µl d'aquest tub a cada un dels quatre del pas 4
8. Incubar 8 min a 37°C
9. Parar la reacció amb 2µl de tampó de càrrega desnaturalitzant

2.1.4.2.2. Preparació del gel de seqüència i electroforesi

S'ha utilitzat l'aparell de seqüenciació GenomyxLR™ (*Beckman*) i s'ha seguit les instruccions del subministrador. El gel és de 61cm, sense gradient i d'una gruixudaria de 340µm. S'ha utilitzat una matriu al 6% d'acrilamida desnaturalitzant HR-1000™ (*Beckman*) al qual se li afegeix 80µl de TEMED i 800µl d'APS al 10%, la barreja es fa passar entre els dos vidres i se li posa la pinta, es deixa polimeritzar durant 45 min o una hora.

Es posa TBEx0.5 a la cubeta de baix, es col·loquen els vidres verticalment a la cubeta i es fixa la cubeta de dalt a la qual hi posem TBEx1. Les mostres a carregar es desnaturalitzen durant 3 min a 96°C i es claven en gel. Es neteja el front i els pous un a un amb TBEx1 i es carreguen 3µl de mostra a cada pou, es connecta l'elèctrode i es tanca l'aparell. L'electroforesi s'ha fet utilitzant el programa P₀: 3000V, 100W, 50°C durant 2h15min, que és el temps necessari perquè el front arribi a baix.

2.1.4.2.3. Assecament del gel i exposició

Un cop acabat el recorregut es para l'aparell, es treuen els vidres i en un suport, i amb una espàtula, es separen amb molt de compte els vidres, el gel queda agafat a un d'ells. Es posa el vidre que porta el gel altre cop a l'aparell i utilitzem el programa P₆₀ per assecar-lo mitjançant l'emissió d'aire calent que permet deshidratar el gel. Al cap de 10 min s'han format cristalls d'urea a la superfície del gel, cal fer un rentat amb aigua calenta per dissoldre'ls perquè sinó emmascaren l'exposició. Es torna a posar el gel al GenomyxLR™ i després d'un segon rentat al cap d'uns vint minuts es deixa durant unes dues hores perquè s'assequi bé i quedi fixat al vidre.

Un cop sec, es posa el vidre amb el gel en un xassís per exposició de la mida del gel LR-Film Cassette (*Beckman*), s'hi posa un film Bio-Max MR (*Kodak*) i es deixa exposar de 24h a tres dies segons l'activitat del sofre radioactiu.

2.1.4.2.4. Revelat

El revelat del film es fa submergint-lo en una cubeta amb revelador radiogràfic (*Agfa*) diluït cinc vegades en aigua durant 5min, després es fa un rentat durant un minut amb una solució d'aigua amb un 1% d'àcid acètic i finalment es fixa durant un mínim d'un minut amb fixador radiogràfic (*Agfa*), també diluït cinc vegades en aigua. Per acabar, rentar el film amb aigua corrent durant uns cinc minuts i deixar assecat penjat amb una pinça per un costat.

2.1.4.3. Seqüenciació utilitzant dNTPs marcats amb fluorocroms

2.1.4.3.1. Reacció de seqüència

Últimament, per la reacció de seqüència s'ha utilitzat el ABI PRISM™ dRhodamine terminator Perkin Elmer cycle sequencing ready reaction kit de *Perkin Elmer*.

Protocol

1. Barrejar en un tub aprox. 60 ng de producte de PCR purificat
 0.5 µl d'encebador (3.2pmols/µl)
 4 µl de reactiu del kit de seqüència
 Aigua fins a 10 µl
2. Barrejar bé i cobrir amb una gota d'oli mineral
3. Posar els tubs en un aparell de PCR i engegar el següent programa:
 - 96°C 30 seg
 - 50°C 15 seg
 - 60°C 4 min
 - realitzar 25 cicles
4. Fer un pols de centrifuga
5. Preparar per a cada reacció un tub de 0.5 ml rotulat i posar-hi 50µl d'etanol absolut fred i 2µl d'acetat sòdic 3M pH 4.6
6. Pipetejar el producte de PCR de sota l'oli amb molt de compte i afegir-lo al tub preparat al pas anterior.
7. Barrejar bé i clavar en gel durant 10 min

8. Centrifugar els tubs durant 15 min a 14000 rpm
9. Treure el sobrenedant i descartar-lo
10. Rentar el pellet amb 250 µl d'etanol al 70%
11. Centrifugar els tubs durant 5 min a 14000 rpm
12. Treure el sobrenedant i descartar-lo
13. Assecar el pellet en una centrifuga del buit durant 10-15 min o fins que s'assequi

2.1.4.3.2. Electroforesi

Les mostres així preparades són enviades a la unitat de DNA de l'Hospital Clínic de Barcelona on disposen dels seqüenciadors ABI 373A Fluorescent DNA Sequencer i ABI 310 Fluorescent DNA Sequencer, ambdós de *Perkin Elmer*. Allà es realitza l'electroforesi i els resultats ens són retornats per la seva interpretació.

2.1.5. SOLUCIONS GENERALS

Tampó de càrrega

20% Ficoll en pols
0.1% SDS
1mM EDTA
0.05% Xilencianol
0.05% Blau de bromofenol

Solució de Bromur d'Etidi

0.01% Bromur d'Etidi 10mg/ml

TE

10mM Tris HCl pH7.5
1mM EDTA

10xTBE

1M Tris
20mM EDTA
1M Àcid Bòric

Fenol-Cloroform

250ml Fenol
240ml cloroform
10ml alcohol isoamílic
Saturar amb 50 ml de Tris 20mM pH8
Guardar a 4°C en una ampolla opaca

Cloroform-isoamílic

480ml cloroform
20 ml alcohol isoamílic
Guardar a 4°C

2.2. LA MUCOPOLISACARIDOSI I O MALALTIA DE HURLER/SCHIE

Per estudiar la malaltia de Hurler/Scheie es va optar inicialment per analitzar només les mutacions descrites com a més freqüents en altres poblacions. D'altra banda, l'estudi per SSCP per la recerca de mutacions noves es preveia molt complicada per la presència de gran quantitat de polimorfismes que feien gairebé una tasca impossible aclarir els patrons obtinguts per aquesta tècnica. Així, doncs, inicialment, es va optar per estudiar les mutacions W402X, Q70X, P533R, IVS5-7g→a i R89Q. Posteriorment, també s'han analitzat les mutacions IVS3-2a→g, L218P i A327P. L'estudi es va fer per amplificació per PCR dels exons on hi havia les mutacions i digestió amb l'enzim de restricció corresponent. També es va fer l'estudi de dos polimorfismes (un VNTR a l'intró 2 i un lloc KpnI a l'exó III) per comprovar el lligament de les mutacions amb un determinat haplotip (veure apartats 3.6.1. i 3.6.2. de la Introducció).

2.2.1. ENCEBADORS I CONDICIONS PER AMPLIFICAR ELS EXONS DEL GEN *IDUA*

Els encebadors utilitzats per amplificar els exons s'indiquen a les Taules 1 i 3. En tots els casos els encebadors són intrònics per poder amplificar els exons sencers. En el cas dels exons XI i XII s'ha optat per amplificar-los junts ja que l'intró 11 que els separa és molt petit. Els encebadors han estat dissenyats segons la seqüència de DNA genòmic descrita al GDB n° M95739 pels exons I i II, i n° M95740 pels exons del III al XIV.

Les condicions de PCR són les descrites a la secció 2.1.1. pels exons II, IV, VI, VIII i XI-XII mentre que per l'exó IX els passos de desnaturalització i anellament s'han hagut d'allargar (94°C, 45seg i 58°C, 1min) i s'ha hagut d'afegir un tercer pas d'extensió de 1 min a 72°C. D'altra banda en alguns exons s'ha hagut d'utilitzar una concentració de MgCl₂ diferent de 1.5 mM per millorar la reacció (veure Taula 1), i en alguns s'hi ha afegit un 10% de DMSO.

Taula 1. Encebadors per amplificar el gen *IDUA*

Exó	Seqüència dels encebadors (5'-3')	Mida (pb)	T°	MgCl ₂ (mM)	DMSO
II	D.- CATGCTGAGGCTCGGGACTGAGCCG R.- TCTGGGACGCCAGACCCTG	216	55°C	1.5	-
IV	D.- GTGGTGTGTGGTGGGCGGTG R.- TAGGGGTGCAACCTGCCAG	216	55°C	0.6	10%
VI	D.- GGAAGGCAGGAGCAGAGGCTAAGC R.- ACAGCGGCTGAGGGCGCAGAACAC	324	55°C	0.7	-
VIII	D.-CGGTCCCAGCTGCCCTGGAC R.-AGCGGGGCCTTCGCAGGAGC	318	55°C	0.75	10%
IX	D.- TGGGACTCCTTCACCAAGGGGAG R.- CAGAGCCCCAGCGGGGCCAGAGAC	370	58°C	1	10%
XI-XII	D.- GGAGAACCCTGAGGACCGGCCACT R.- CGGGACCCAGGGACCTGCCTAGGA	371	67°C	1.5	10%

T°.- Temperatura d'anellament

2.2.2. DETECCIÓ DE LES MUTACIONS: DIGESTIÓ AMB ENZIMS DE RESTRICCIÓ

Totes les mutacions estudiades en aquesta malaltia es poden detectar amb digestió amb enzims de restricció. Els enzims i condicions de digestió utilitzats són els de la Taula 2. Tots els enzims són de la casa *Boehringer Mannheim* a excepció del BsiEI i del HhaI que és de *New England Biolabs*. Totes les digestions s'han dut a terme a la temperatura indicada durant tota la nit.

L'electroforesi s'ha realitzat de diferents maneres segons els fragments a diferenciar: en gel d'agarosa al 2% per les mutacions R89Q, L218P i W402X, en gel barreja d'agarosa i d'agarosa NuSieve™GTG™ (*FMC Bioproducts*) al 2% de cada una per les mutacions Q70X i P533R, i en gel de poliacrilamida al 12% en el MiniProteanII™ (*BioRad*) per les mutació IVS3-2a→g, IVS5-7g→a i A327P. En tots els casos s'ha fet tinció en Bromur d'etidi.

Taula 2. Enzims de restricció i condicions per la detecció de les mutacions de la malaltia de Hurler/Scheie

Mutació	Exó	Enzim	T°	Fragments (pb)
Q70X	II	Sau96I	37°C	AN.- 89 + 65 + 57 + 5 AM.- 146 + 65 + 5
R89Q	II	MspI	37°C	AN.- 149 + 67 AM.- 216
IVS3-2a→g	IV	MspI	37°C	AN.- 180 + 36 AM.- 141 + 39 + 36
IVS5-7g→a	VI	MspI	37°C	AN.- 155 + 81 + 62 + 26 AM.- 155 + 143 + 26
L218P	VI	BsiEI	55°C	AN.- 324 AM.- 191 + 133
A327P	VIII	HhaI	37°C	AN.- 80 +51 +51 +45 +37 +34 +13 +5 +2 AM.- 88 +80 +51 +45 +34 +13 +5 +2
W402X	IX	MaeI	45°C	AN.- 370 AM.- 244 + 126
P533R	XI	BsiEI	55°C	AN.- 297 + 74 AM.- 263 + 34

T°.- Temperatura òptima per la digestió; AN.- Al·lel normal; AM.- Al·lel mutat

2.2.3. ESTUDI DE POLIMORFISMES DEL GEN *IDUA*

S'han estudiat dos polimorfismes de la trentena descrits al gen *IDUA*. Es va escollir aquests dos perquè eren els que formaven dos haplotips que, inicialment, s'havia descrit que anaven lligats, respectivament, a les dues mutacions freqüents, la W402X i la Q70X (veure apartats 3.6.1. i 3.6.2. de la Introducció).

Es tracta d'un VNTR situat a l'intró 2, que és la repetició en tàndem de 86pb i d'un canvi silenciós T→C en zona codificant, a l'exó III, que afecta l'aminoàcid L118, aquest canvi crea una diana per l'enzim de restricció *KpnI* i és el que s'ha utilitzat per detectar-lo.

També s'ha posat a punt la detecció de dos polimorfismes de l'exó I per si cal l'anàlisi indirecte per l'estudi de portadors en alguna família. Es tracta del polimorfisme A8A (606C→A) que crea una diana de restricció per l'enzim *Eco47III*, i del polimorfisme Q33H (681G→T) que crea una diana de restricció per l'enzim *NspI*. Els oligonucleòtids o encebadors per l'amplificació de l'exó I, de la part d'intró 2 i de

l'exó III són els de la Taula 3. Les condicions de PCR són les descrites a l'apartat 2.1.1. En l'amplificació de l'exó I, però, cal afegir-hi un 10% de DMSO.

Taula 3. Encebadors per l'estudi de polimorfismes del gen *IDUA*

Polimorf.	Seqüència dels encebadors (5'-3')	Mida (pb)	T°
Exó I	D.- TCACATGGGGTGCGCGCCCAGACT	326	55°C
	R.- AAGCTCTCACAGTGCGCAGTCAGG		
VNTR - in 2	D.- TAGGTGTCTCCTCAGAGAGG	630-800	59°C
	R.- AGGACCTGGTGGACACCTCA		
KpnI - exó III	D.- GGGCACCTGCTTCTGACGCTGA	152	63°C
	R.- GGCTGGGAGGGCAGAGCCCACA		

T°.- Temperatura d'anellament

Per detectar el polimorfisme *Eco47III* de l'exó I es digereix el producte de PCR amb aquest enzim de restricció (*Boehringer Mannheim*) a 37°C durant tota la nit. Es poden veure dos al·lels possibles:

Al·lel 1 (C) 326 pb
Al·lel 2 (A) 215 + 111 pb

Així mateix, per detectar el polimorfisme *NspI* també de l'exó I, es digereix el producte de PCR amb aquest enzim de restricció (*Boehringer Mannheim*) a 37°C durant tota la nit i els dos al·lels possibles són:

Al·lel 1 (G) 326 pb
Al·lel 2 (T) 186 + 140 pb

En ambdós casos, per detectar els diferents al·lels, es carrega el producte de la digestió en un gel d'agarosa al 2%, es corre a voltatge constant de 100V durant 30min – 1h i es tenyeix amb bromur d'etidi.

En amplificar l'intró 2, el producte de PCR mateix ja ens dona els tres al·lels possibles segons el nombre de repeticions del fragment de 86pb:

Al·lel 1 802 pb
Al·lel 2 716 pb
Al·lel 3 630 pb

Per poder diferenciar els fragments es carrega el producte de PCR en un gel d'agarosa al 1.5% i es corre a voltatge constant de 100V durant 45min – 1h. Aleshores es tenyeix amb bromur d'etidi.

Per detectar el polimorfisme *KpnI* de l'exó III es digereix el producte de PCR amb aquest enzim de restricció (*Boehringer Mannheim*) a 37°C durant tota la nit. Es poden detectar dos al·lels:

Al·lel 1 (T)	152 pb
Al·lel 2 (C)	86 + 66 pb

Com en el cas dels polimorfismes de l'exó I, per detectar els diferents al·lels es carrega el producte de la digestió en un gel d'agarosa al 2% i es corre a voltatge constant de 100V durant 30min – 1h, tot seguit es tenyeix amb bromur d'etidi.

2.3. LA MUCOPOLISACARIDOSI II O MALALTIA DE HUNTER

Per l'estudi de la malaltia de Hunter s'han utilitzat totes les tècniques descrites en l'apartat 2.1. de tècniques generals i només detallarem els encebadors específics utilitzats per amplificar per PCR el gen *IDS*. També s'han utilitzat una sèrie de marcadors polimòrfics per fer estudis d'haplotips. Finalment s'ha inclòs el protocol utilitzat per fer Southern blot per detectar les grans delecions i reordenaments tan típics en aquesta malaltia.

2.3.1. ENCEBADORS I CONDICIONS PER AMPLIFICAR EL GEN DE L'IDS

Els encebadors utilitzats per amplificar els exons del gen *IDS* són els de la Taula 4. En tots els casos els encebadors són intrònics per poder amplificar els exons sencers així com les zones acceptores i donadores d'*splicing*. En el cas de l'exó IX, com que és molt gran, s'ha dividit en dos fragments de PCR sobreposats per què fos possible l'estudi per SSCP (Veure secció 2.1.2.1). Els encebadors han estat dissenyats segons la seqüència de DNA genòmic descrita al GDB nº L35485.

Les condicions de PCR són les descrites a la secció 2.1.1. pels exons I, II, III, IV, VI, VII i VIII, mentre que a la resta d'exons se'ls ha hagut d'afegir un tercer pas d'extensió de 30 seg. a 72°C.

Taula 4. Encebadors per amplificar el gen *IDS*

Exó	Seqüència dels encebadors (5'-3')	Mida (pb)	T°
I	D.- GCGGCTGCTAACTGCGCCAC R.- AGAGATGGCAGGGAGGGCGT	201	61°C
II	D.- TTAGTAACCTAGCACCTACC R.- CCATCTGACAATAGCTGAAG	303	58°C
III	D.- GCTGTGGCGATGCTTACCTCTG R.- AAGAGAACCCAGACTCTGGACA	250	55°C
IV	D.- GTGGGGTGTGAAAGACTCATC R.- TGGTATATAACCAGCTTCACAG	242	55°C
V	D.-TGTGTAGCCTTCATGGCTTC R.- CCCTCAACAAACAACACAGC	329	59°C
VI	D.- GAGTGACAACCTTTGTGGCTT R.- TGTCCAATACATCCCCAAAC	241	55°C
VII	D.- GGCAAGCATTATCTCTGTATGC R.- CACACCCATGTTTATGTCAATG	296	55°C
VIII	D.- GATGAGTTTCTACTTCCTCTGG R.- CTGGCTCCATCAACTGTGAGGC	290	55°C
IXA	D.- TGCCTGGCCATGGCAGGCTT R.- GGGATACTGGCTATAGGCAA	282	63°C
IXB	D.- TCCGTACCTCCCTGGTAATC R.- AGCACATCACATTTGCCATC	339	60°C

T°.- Temperatura d'anellament

2.3.2. ENCEBADORS I CONDICIONS PER AMPLIFICAR EL cDNA DEL GEN *IDS*

Els encebadors utilitzats per amplificar el cDNA del gen *IDS* són els de la Taula 5. En aquest cas s'han escollit encebadors de manera que el cDNA, que té 1650pb, s'hagi pogut amplificar en cinc fragments sobreposats.

Les condicions de PCR són les mateixes que les descrites a la secció 2.1.1. per tots els fragments excepte pel cDNA5, al qual se li ha afegit un tercer pas d'extensió d'un minut a 72°C.

Quan en algun pacient s'ha volgut analitzar el cDNA per SSCP, en ser els productes de PCR massa grans per entrar en el rang òptim de la tècnica, s'ha optat per digerir els productes amb un enzim de restricció que els divideixi en dos fragments de mides semblants i fer SSCP de la digestió.

Taula 5. Encebadors per amplificar el cDNA del gen *IDS*

Fragment	Seqüència dels encebadors (5'-3')	Mida (pb)	T°	E.R.
cDNA1	D.- GCCACCTGCTGCAGCCTGTC R.- TGAAGTCGTACAGGCGGGTG	370	59°C	BamHI
cDNA2	D.- GAGCCGCGTTTCTTTCCTTCA R.- CCAGGGGTTGTAGGCCACAG	544	55°C	TaqI
cDNA3	D.- TTGTATCCCTTGGAGAACAT R.- CTGTGAGGCGGAATCAA	446	55°C	ItaI
cDNA4	D.- CTGGAAGGACGGCTTCACTT R.- TATGGTGCGTATGGAATAGC	395	55°C	PstI
cDNA5	D.-ATTCTGACAAGCCGAGTTTA R.- AAGGGAGCACATCACATTTG	267	51°C	-

T°.- Temperatura d'anellament; E.R. Enzim de restricció utilitzat

2.3.3. ANÀLISI DE MARCADORS POLIMÒRFICS

En algunes famílies s'ha fet l'estudi d'haplotips per determinar el cromosoma portador de la malaltia. Els marcadors utilitzats són els de la Taula 6, la seva situació respecte el gen *IDS* es pot veure al mapa de l'apartat 4.4.1. de la Introducció, tots ells s'han aconseguit de la casa comercial *Research Genetics* i les condicions d'amplificació han estat les de l'apartat 2.1.1. amb alguna variació en el programa de PCR: s'han realitzat 24 cicles de dos passos, un minut a 94°C i un minut a 55°C.

Els marcadors s'ha analitzat carregant 5-7µl de producte de PCR i un 20% de tampó de càrrega en un gel de poliacrilamida al 12% d'acrilamida:bisacrilamida 29:1 o bé 19:1 amb TBEx1. El gel s'ha corregut durant tota la nit a voltatge constant de 100-200V i a temperatura ambient i s'ha tenyit per tinció amb nitrat de plata.

D'altra banda, també s'ha utilitzat un marcador polimòrfic intragènic de tipus RFLP que té diana de restricció per l'enzim *StuI* situat a l'intró 8 del gen. Els encebadors utilitzats han estat els D.-CCTGACTTGATCTGCCAGT, i R.-CAGGACATGCAGTGCACAAA, les condicions d'amplificació són les generals amb una temperatura d'anellament de 55°C. El fragment esperat és de 301pb (al·lel 1), que es manté si no hi ha la diana de restricció i que es converteix en 220 + 81pb (al·lel 2) si presenta la diana.

Aquest polimorfisme s'ha analitzat carregant el producte de la digestió barrejat amb un 20% de tampó de càrrega en un gel d'agarosa al 2%. L'electroforesi s'ha realitzat a 100V durant 1h-1h30min i, posteriorment, el gel s'ha tenyit amb bromur d'etidi.

Taula 6. Marcadors polimòrfics del cromosoma X estudiats (Dades segons *Research Genetics*)

Marcador	Tipus	Heterozigositat	Mida dels al·lels
DXS1215	dinucleòtid	0.61	248-250
DXS731	(CA) ₂₂	0.74	100
DXS1123	(CA) ₂₄	0.68	168-178
DXS1113	(TC) ₁₀ -(AC) ₂₁	0.75	154-178

2.3.4. TRANSFERÈNCIA I HIBRIDACIÓ DEL DNA

Aquesta tècnica s'ha utilitzat per la detecció de grans delecions i reordenaments en el gen de l'IDS. Aquest tipus de mutacions es presenta en un 20% dels pacients i per tant representa una tècnica molt útil en aquesta malaltia.

2.3.4.1. Digestió del DNA genòmic i electroforesi en gel d'agarosa

S'han digerit 10µg de DNA amb 20U d'enzim de restricció en un volum final de 50µl i durant tota la nit. Els enzims utilitzats han estat l'EcoRI, el HindIII i el PstI (*Boehringer Mannheim*). Un cop feta la digestió, s'ha afegit un 20% de tampó de càrrega (veure secció 2.1.5) i s'ha carregat en un gel d'agarosa a l'1% amb TBEx1. El gel s'ha corregut durant 4-5 hores a 70V, fins que el blau de bromofenol ha arribat a 1 cm. del final del gel.

Es fa tinció en bromur d'etidi per comprovar la digestió de les mostres i es submergeix el gel en 500ml de solució A durant 30 min en agitació. Es repeteix canviant la solució durant 30 min més i tot seguit es fan dues incubacions més de 30 min cada una amb solució B.

Solució A

1.5M NaCl

0.5M NaOH

Solució B

0.5M TrisCl pH7.5

3M NaCl

2.3.4.2. Transferència del DNA (*Southern blot*)

S'ha seguit el protocol de transferència utilitzant una membrana de niló NY13N Nytran (*Schleicher & Schuell*)

Protocol

1. Preparar una safata amb 10xSSC, posar-hi un suport amb un pont de paper *Whatmann 3MM (Schleicher & Schuell)* moll de 10xSSC
2. Col·locar el gel sobre el pont evitant la presència de bombolles
3. Mullar el filtre de niló tallat a la mida del gel en 3xSSC i col·locar-lo sobre el gel sense que hi hagi bombolles
4. Col·locar a sobre 3 fulls *Whatmann 3MM* tallats a la mida del gel i molls de 3xSSC i 3 fulls més secs
5. Col·locar a sobre un plec de fulls de paper de filtre normal i un plec de mocadors de paper tipus *Kleenex*
6. Posar a sobre un pes de 0.5 a 1 Kg
7. Cobrir la safata amb paper transparent de plàstic per evitar l'evaporació
8. Deixar transferint tota la nit
9. L'endemà rentar el filtre de niló, un cop haguem marcat els pous, en 3xSSC
10. Deixar assecar sobre paper *Whatmann 3MM*
11. Guardar-lo en una bossa de paper de filtre i deixar-la en una estufa a 80°C durant 2.5h

20xSSC

3M NaCl

0.3M Citrat de sodi

Ajustar el pH a 7.0 amb HCl

2.3.4.3. Marcatge de la sonda amb digoxigenina

La sonda utilitzada ha estat el cDNA de l'IDS que ens va ser cedida pel Dr. W. Lissens (Brussel·les). Per al marcatge s'ha utilitzat el DIG DNA labelling kit (*Boehringer Mannheim*) i s'han seguit les instruccions donades pel subministrador.

Un cop marcada la sonda s'utilitza a una concentració de 25-35ng/ml, es dilueix en tampó d'hibridació i es guarda a -20°C en un tub de 50ml.

2.3.4.4. Prehibridació i hibridació del filtre

La prehibridació, hibridació i rentats s'han realitzat en cubetes de plàstic de mida el més semblant possible a la del filtre a hibridar.

Protocol

1. Col·locar el filtre a la cubeta i afegit uns 20ml de tampó d'hibridació
2. Deixar en bany agitant-se a 42°C durant 4 hores (prehibridació)
3. Desnaturalitzar la sonda just abans d'hibridar deixant-la 10min a 100°C i després clavar-la en gel durant 3min

4. Llençar la solució de prehibridació de la cubeta i afegir-hi la sonda desnaturalitzada
5. Incubar tota la nit a 42°C en agitació suau
6. L'endemà treure i guardar la sonda
7. Rentar el filtre amb 50ml de Solució de rentat 1 durant 5 min en agitació a temperatura ambient
8. Repetir el rentat
9. Rentar el filtre amb 50 ml de Solució de rentat 2 durant 15min a 65°C en agitació
10. Repetir el rentat
11. Es pot procedir a la detecció o bé assecat el filtre i guardar

<u>Tampó d'hibridació</u>	<u>Solució de rentat 1</u>	<u>Solució de rentat 2</u>
25ml 20xSSC	100ml 20xSSC	2.5ml 20xSSC
50ml Formamida desionitzada	10ml SDS 10%	1ml SDS 10%
10ml lauroilsarcosine 1%	Aigua fins a 1l	Aigua fins a 1l
1.2ml SDS 10%		
5% agent bloqueig		
Aigua fins a 100ml		
Posar en un bany a 65°C per dissoldre-ho i agitar		

2.3.4.5. Detecció (Mètode quimioluminiscent)

Per a la detecció s'ha utilitzat un mètode quimioluminiscent amb el substrat CSPD® (*Boehringer Mannheim*) i anticòs contra la digoxigenina, Anti-digoxigenin-AP, Fab fragments (*Boehringer Mannheim*).

Protocol

1. Equilibrar el filtre durant 1-2min amb Solució de detecció 1 + Tween 20 al 0.3%
2. Incubar el filtre durant 30min en agitació suau amb Solució de detecció 2
3. Incubar 30 min en agitació amb la Solució de l'anticòs
4. Fer dos rentats de l'anticòs de 15min cada un amb Solució de detecció 1 + Tween 20 al 0.3%
5. Deixar 2-3min equilibrant amb Solució de detecció 3
6. Incubar 5 min amb la Solució de CSPD, tancar la cubeta amb paper de plata perquè el CSPD es degrada amb la llum
7. Assecat el filtre breument sobre Whatmann 3MM
8. Posar-lo dins una bossa de plàstic i segellar-la
9. Posar-lo en una caixa fosca i deixar durant 10-15min a l'estufa a 37°C
10. Col·locar dins d'un xassís en exposició amb un film Hyperfilm™-ECL (*Amersham*) i deixar mínim 2h o fins l'endemà
11. Revelar el film tal i com s'ha descrit a l'apartat 2.1.4.7

Solució de detecció 1

50ml TrisCl 2M pH7.5
30ml NaCl 5M
Aigua fins a 1l

Solució de detecció 2

Solució de detecció 1
0.5% reactiu de bloqueig
(Boehringer Mannheim)
Guardar a 4°C

Solució de detecció 3

20ml NaCl 5M
50ml MgCl₂ 1M
50µl TrisCl 2M pH7.5
350µl de HCl
Aigua fins a 1l

Solució de l'anticòs

2µl anticòs
20ml de Solució de detecció 2
Guardar a -20°C
Reutilitzar màxim 6 vegades

Solució de CSPD

500µl CSPD
Fins a 50ml de Solució de
detecció 3
Guardar en tub opac a 4°C
Aguanta màxim 15 dies

2.4. LA LEUCODISTRÒFIA METACROMÀTICA

Per l'estudi de la leucodistròfia metacromàtica s'han utilitzat totes les tècniques descrites en l'apartat 2.1. de tècniques generals i només detallarem els encebadors específics utilitzats per amplificar per PCR el gen *ARSA*. Per estudiar els marcadors polimòrfics no s'han utilitzat reaccions de PCR específiques, sinó que, al ser tots els marcadors estudiats als exons o en zones intròniques properes, s'han utilitzat els mateixos productes de PCR amplificats per l'estudi de mutacions.

2.4.1. ENCEBADORS I CONDICIONS PER AMPLIFICAR EL GEN *ARSA*

Els encebadors utilitzats per amplificar els vuit exons del gen *ARSA* són els de la Taula 7. En tots els casos els encebadors són intrònics per poder amplificar els exons sencers així com les zones acceptores i donadores d'*splicing*. En el cas de l'exó VIII, com que és molt gran, s'ha dividit en dos fragments de PCR sobreposats per què fos possible l'estudi per SSCP (Veure secció 2.1.2.1). Per detectar la mutació IVS2+1G→A, tot i que per SSCP del producte de PCR de l'exó II es pot veure, s'han utilitzat dos encebadors que amplifiquen tot l'intró 2 i s'ha realitzat digestió amb un enzim de restricció. Els encebadors han estat dissenyats segons la seqüència de DNA genòmic descrita al GDB n° X52150.

Les condicions de PCR són les descrites a la secció 2.1.1. per tots els exons excepte per l'intró 2 que s'ha afegit un tercer pas d'extensió d'un minut a 72°C. En

alguns exons, però, s'ha hagut d'utilitzar una concentració de $MgCl_2$ diferent de 1.5 mM per millorar la reacció, en d'altres s'hi ha afegit un 10% de DMSO (vegeu Taula 7)

Taula 7. Encebadors per amplificar el gen ARSA

Exó / intró	Seqüència dels encebadors (5'-3')	Mida (pb)	T°	MgCl ₂ (mM)	DMSO
I	D.- CTGCTGGAGCCAAGTAGCCC R.- TGCAATCCATTGGGAGGAAA	339	55°C	1	-
II	D.- GACTCTGTGACTTGTCCC GC R.- GCTGAGGGCCCCGGGTGGTTC	287	55°C	1	-
Intró 2	D.- TCGATTTCTAGGCATCCCGT R.- GTCACAGCCACCGTCGCAAG	208	55°C	1	10%
III	D.- ACCTGCCAGCCCAGCCCTCA R.- TTGGGCCAAGATCACTTAC	217	55°C	1	-
IV	D.- CTAAGTCCAGTCTTTGCCCC R.- GCCGGAGCACCCAGCTG	224	55°C	1.5	10%
V	D.- GCTCATGAGCGCCTCCTGTG R.- GGGTTCCAAGGAGAGGGCCTGCGGACTGA	180	55°C	1	-
VI	D.- CTTGATGGCGAACTGAGTGAC R.- AAGGATCTGGGATCAGGGGT	202	55°C	1	-
VII	D.- CACGTCCAGGGCCTCCCACC R.- GGGGTCAGCAGGTTCCGGGGG	237	55°C	0.75	10%
VIIIA	D.- TTGCCCTGTGCACAGAATTG R.- CTGTTTCAGGGCTTGCAGCAC	203	55°C	1.5	-
VIIIB	D.- GAAACAGCTTCAGCTGCTCA R.- GCCATCACATGCCAGGCCA	189	55°C	1.5	-

T°.- Temperatura d'anellament

2.4.2. DETECCIÓ DE LA MUTACIÓ IVS2+1G→A

Tot i que per anàlisi per SSCP de l'exó II la mutació IVS2+1G→A crea un patró anòmal i per tant es pot detectar, s'ha utilitzat una digestió amb un enzim de restricció. L'enzim utilitzat ha estat el BstNI de la casa comercial *New England Biolabs*. S'ha digerit el producte de PCR que ha resultat d'amplificar l'intró 2 en les condicions descrites a l'apartat 2.1.3.1. a 37°C durant tota la nit, tenint en compte que en aquest cas, cal afegir BSA a la reacció. Els fragments obtinguts són:

Al·lel normal	176 + 32 pb
Al·lel IVS2+1G→A	208 pb

La digestió s'ha comprovat per electroforesi en gel d'agarosa al 2% durant tres quarts d'hora a 100V. La tinció s'ha fet en bromur d'etidi.

2.4.3. DETECCIÓ DE L'AL·LEL ARSAPD

Per fer l'estudi de l'al·lel ARSAPd, ha calgut identificar les dues mutacions presents en aquest al·lel: la N350S i la polyA-.

La mutació N350S està situada a l'exó VI del gen ARSA, i el canvi no crea ni destrueix diana per cap enzim de restricció. La detecció s'ha realitzat a partir del patró anòmal d'SSCP que la mutació crea quan s'aplica aquesta tècnica al producte de PCR de l'exó VI. Després de seqüenciar el patró i comprovar que realment fos aquest el canvi, s'ha utilitzat la mostra seqüenciada com a control en les posteriors caracteritzacions de pacients i de controls. La condició d'SSCP ideal per la detecció de la mutació és en gel de poliacrilamida al 12%, sense glicerol, a temperatura ambient i a 400V durant tota la nit.

La mutació polyA-, com que afecta la senyal de poliadenilació, està situada fora de la zona codificant i els fragments de PCR per amplificar l'exó VIII no l'agafen, s'han dissenyat, doncs, uns nous encebadors per detectar la mutació. Com que aquesta no crea ni destrueix diana per cap enzim de restricció, s'ha utilitzat el mètode descrit per Chabás i col. (1993), en el qual per un dels encebadors (en aquest cas el revers) introdueix una diana per l'enzim de restricció *RsaI* en el cas de que la mutació hi sigui present (és el que es diu un *mismatched primer*). Els encebadors utilitzats han estat:

D.- CCTGCAGATCTGCTGTCATC

R.- GCAAGTCTCCACTGGTGGTA

La G subratllada de l'encebador revers és la base desaparellada que introdueix la diana si la mutació PolyA- és present a l'al·lel.

Les condicions de PCR són les generals descrites a l'apartat 2.1.1. i la concentració de MgCl₂ és de 1.5 mM.

El producte de la reacció de PCR (que fa 189pb) es digereix amb l'enzim de restricció *RsaI* (*Boehringer Mannheim*) seguint les condicions generals descrites a l'apartat 2.1.3.1. a 37°C durant tota la nit. Els fragments obtinguts són:

Al·lel normal	189 pb
Al·lel polyA-	170 + 19 pb

La digestió s'ha comprovat en electroforesi d'agarosa i d'agarosa NuSieve™GTG™ (FMC Bioproducts) al 2% de cada una, durant una hora a 90V. La tinció s'ha fet amb bromur d'etidi.

En els portadors s'ha establert que les mutacions N350S i polyA- estaven al mateix al·lel comprovant la fase als pares. En controls, com que són tots no relacionats escollits a l'atzar i no es tenen els pares, quan un control s'ha trobat heterozigot per cada una de les mutacions, s'ha donat per suposat que estaven en fase en vistes als estudis de lligament de les dues mutacions realitzats per altres autors (veure apartat 5.12. de la Introducció), tot i sabent que es podia donar el cas de passar per alt al·lels amb la mutació PolyA- sola, però la incidència d'aquest al·lel sol és tan extremadament baixa que s'ha optat per aquesta assumpció.

2.4.4. ESTUDI DE POLIMORFISMES DEL GEN *ARSA* PER DIGESTIÓ AMB ENZIMS DE RESTRICCIÓ

S'han estudiat cinc marcadors polimòrfics, tres dels quals ja estaven descrits: G842T, C2161G i C2213G, i dos de nous: C2033T i C2059T (veure resultats). Tots ells s'han pogut estudiar per digestió amb un enzim de restricció específic (taula 8), a excepció del marcador C2059T que no afecta cap diana de restricció. Els tres marcadors C2033T, C2161G i C2213G, s'han analitzat digerint amb l'enzim de restricció el producte de PCR resultant d'amplificar l'exó VII.

En tots els casos, l'electroforesi s'ha realitzat en gel d'agarosa al 2% i s'ha tenyit amb bromur d'etidi.

Taula 8. Enzims de restricció i condicions per la detecció dels polimorfismes del gen ARSA

Polimorfisme	Exó / intró	Enzim	T°	Fragments (pb)
G842T	III	BglI	37°C	AN.- 136 + 121 + 20 AP.- 257 + 20
C2033T	In6	AluI	37°C	AN.- 237 AP.- 207 + 30
C2161G	VII	Bsrl	65°C	AN.- 163 + 74 AP.- 237
C2213G	In7	BamHI	37°C	AN.- 209 + 28 AP.- 237

T°.- Temperatura òptima per la digestió; AN.- Al·lel normal; AP.- Al·lel polimòrfic

2.4.5. ESTUDI D'HAPLOTIPS

Com que els polimorfismes C2033T (intró 6), C2059T (intró 6), C2161G (exó VII) i C2213G (intró 7) es poden estudiar alhora amplificant l'exó VII i les zones intròniques del voltant (veure taula 7), l'estudi d'haplotips respecte aquests quatre marcadors s'ha vist molt facilitat en no haver d'establir fases de forma indirecte.

Els quatre haplotips, A, B, C i D, que s'ha identificat en població control com a combinació d'aquests quatre marcadors (veure resultats, Capítol III), han estat estudiats en pacients per patrons d'SSCP després d'haver estat seqüenciats. Els patrons obtinguts en controls i que han servit per a establir haplotips en pacients són els de la figura 2 del Capítol III.

Les condicions d'SSCP són en gels de poliacrilamida al 12%, sense glicerol, corregut a temperatura ambient (uns 20°C) durant tota la nit a 400V.

El marcador G842T situat a l'exó III també s'ha tingut en compte a l'hora d'establir els haplotips sencers dels pacients. La fase amb els marcadors de l'exó VII i rodalies s'ha establert analitzant els pares dels malalts.