



**Departament de Biologia Cel·lular,
Fisiologia i Immunologia**



**Institut de Recerca
Oncològica**

ESTUDI CITOGENÈTIC-MOLECULAR DE LA SÍNDROME DE DOWN

Margarida Nadal i Sànchez

octubre del 2000

ESTUDI CITOGENÈTIC-MOLECULAR DE LA SÍNDROME DE DOWN

Memòria presentada per
Margarida Nadal i Sànchez
Per a optar al grau de
Doctor en Ciències Biològiques

Treball realitzat sota la direcció del Dr. Xavier Estivill i Pallejà, al
**Centre de Genètica Mèdica i Molecular de
l'Institut de Recerca Oncològica de Barcelona**

Tesi adscrita al Departament de Biologia Cel.lular, Fisiologia i Immunologia
de la Universitat Autònoma de Barcelona
sota la tutoria de la Dra. Rosa Miró i Ametller

Dr. Xavier Estivill

Dra. Rosa Miró

Margarida Nadal

octubre del 2000

Agraïments

Durant els darrers sis anys que he passat al Centre de Genètica Mèdica i Molecular de l'IRO, el nombre de persones que hi he conegut, des d'estudiants de doctorat, tècnics i administratius fins a investigadors i col·laboradors, ha estat enorme. A tots ells, als que han marxat també, els he d'agrair alguna cosa en concret, algun cop de mà, però sobretot, he d'agrair-los a tots la confiança que sempre han tingut en la tasca que ha suposat establir la citogenètica molecular en un àmbit en el qual no treballar habitualment fent PCRs, seqüències o *Southern*s és, si més no, una raresa. Per una raó estrictament d'espai, tothom no pot ser anomenat individualment, però el meu agraïment és igualment sincer.

L'oportunitat de fer aquest treball i la seva direcció, les he d'agrair al Dr. Xavier Estivill, treballador incansable, entusiasta de totes les idees noves per tirar endavant la recerca, i en el meu cas, sempre dialogant i pacient.

El vincle amb la Universitat he tingut el privilegi d'establir-lo a través de la Dra. Rosa Miró qui ha estat la tutora del treball aportant-hi bones crítiques i sobretot, contagiant el seu entusiasme pel, de vegades oblidat, món de la citogenètica.

El nostre Grup de recerca del cromosoma 21/Síndrome de Down es va consolidar l'any 1993 gràcies al finançament de la Marató de TV3/Fundació Catalana Síndrome de Down. Des d'uns inicis estrictament genòmics amb la cerca de marcadors microsatèl·lits i el clonatge de gens, el grup ha entrat en el que ara s'anomena la "post-genòmica" amb l'estudi funcional d'alguns dels gens clonats. Aquesta trajectòria ha estat possible gràcies a tots els integrants del grup, però he d'agrair especialment a la Dra. Melanie Pritchard el seu ajut i disponibilitats incondicionals i sobretot, la seva paciència. A la Dra. Mariona Arbonès, li agraeixo també la confiança i dedicació, especialment el seu altruisme per haver corregit aquest treball quan no era res més que un esborrany. Al món dels ratolins genèticament modificats, hi he entrat gràcies a la Dra. Cristina Fillat i al món de la conducta i de les peripècies que poden arribar a fer els ratolins, gràcies a la Dra. Mara Dierssen. D'estudis de proteïna en aquest treball no n'hi ha cap però entendre'l una mica m'ha estat possible gràcies a la tenacitat de la Dra. Susana de la Luna, qui a més, va ser el gran revulsiu quan les coses no ens acabaven d'anar bé. A tots els integrants del grup els agraeixo la seva confiança: a la Dra. Assumpció Bosch, al Dr. Jordi Guimerà, al Dr. Juanjo Fuentes, a la Dra. Mercè Pérez, a la Katy Casas, a la Vassiliki Fotaki, a l'Asun Solans, a la Lali Genescà i a en Carles Pucharcòs, l'Anna Domènech, en Xavi Altafaj i la Mónica Alvarez, els agraeixo l'ajut, moltíssimes bromes, també alguns desencisos compartits.

A altres companys amb els quals he tingut més tracte, per fer anys que treballem junts, els agraeixo també el seu ajut: a la Dra. Virginia Nunes per la seva confiança en mi, especialment en

els temps del mapatge del gen *rBAT*; la Dra. Núria Sala amb qui ens coneixem des de les èpoques de Sant Pau; als companys del grup del Pànic, amb qui els darrers anys hem treballat molt intensament i passat grans estones: la Mònica Gratacòs, el Dr. M. A. Pujana, en Lluís Armengol i la Marta Ribasés, i a la Dra. Anna Ruiz amb qui hem perseguit juntes YACs i un punt de trencament al 9p21. A aquells que un moment o altre hem compartit feina, especialment a l'Anna Puig, la Ruth Forner i l'Encarna Ulloa. Al Mariano Tarragó li agraeixo les bones estones compartides i la solució de totes les meves incompetències informàtiques.

Aquest treball tampoc no hauria estat possible sense la col.laboració directa de tots els metges que han fet els diagnòstics precisos, que han convençut les famílies per a col.laborar amb nosaltres: la Dra. Montse Milà i els equips de Genètica de l'Hospital Clínic de Barcelona i de Pediatria de l'Hospital del Mar; la Dra. Maria Antonia Ramos i l'equip de Genètica de l'Hospital Virgen del Camino de Pamplona; el Dr. Enric Sarret i la Dra. Teresa Vendrell i el Servei de Genètica de l'Hospital de la Vall d'Hebrón; el Dr. Cesar Guzman Vigo i al Servei de Genètica de la Universidade Federal de São Paulo; al Dr. Leopoldo Zelante i al seu equip del Servizio di Genetica Medica San Giovanni Rotondo, a Foggia. També agraeixo molt especialment a les famílies que han col.laborat en aquest estudi la paciència que tantes vegades ni ens adonem que els demanem. Al Dr. Jesús Flórez i al seu equip de la Universitat de Cantàbria els agraeixo l'hospitalitat, els coneixements que em van transmetre sobre el ratolí Ts65Dn i totes les mostres de teixits i de sang que m'han proporcionat.

Sense l'herència de determinats caràcters i la inculcació de determinats valors per part dels meus pares el resultat tampoc no hauria estat el mateix: al meu pare li agraeixo el sentit del rigor i la disciplina; li dec també el gust i disgust per a determinades estètiques però sobretot, li agraeixo l'esforç i la generositat amb què ha donat sempre suport a la meva carrera. A la meva mare li agraeixo sobretot, la seva incondicionalitat i la complicitat durant els vint-i-vuit anys que vam compartir, les lliçons de coratge davant l'adversitat; li agraeixo també que tots els records que ens va deixar siguin només bons.

Als meus germans Albert, Pocho, Lluís i Isa, Aina, Jordi, Jaume, Sílvia i Marga els agraeixo el costat que sempre m'han fet i els onze descendents que fan l'absència més suportable. Agraeixo també a la Beu la seva incondicionalitat i encoratjament constants. A en Pepe i la Chelo la seva generositat i estima immenses. A la Maite Pérez i la Mònica Hals els agraeixo l'amistat dels darrers tretze anys. A la Blanca Vilà li agraeixo la seva generositat, l'encoratjament en els moments més difícils d'aquesta singladura i haver volgut compartir Symi amb mi. A la Mònica Gratacòs també l'hi agraeixo la millor amistat dels darrers anys. Finalment, gràcies Teo per la paciència i la companyia!

Índex

<i>Presentació</i>	1
<i>Abreviatures</i>	5
<i>Introducció</i>	9
. SÍNDROME DE DOWN	11
. ASPECTES CLÍNICS DE LA SÍNDROME DE DOWN	12
. Retard mental	15
. Problemes auditius	16
. Aparell digestiu	17
. Anomalies cardíques congènites	18
. Sistema immunitari	20
. Malaltia d'Alzheimer	21
. TRISOMIA DEL CROMOSOMA 21	25
. Translocacions Robertsonianes	25
. Translocacions recíproques i no recíproques	26
. Trisomia del cromosoma 21 en mosaic	27
. NO-DISJUNCIÓ I EDAT MATERNA	29
. CROMOSOMA 21 HUMÀ	34
. MAPES GENÒMICS DEL CROMOSOMA 21	
. Mapes de punts de trencament	35
. Mapes d'híbrids de radiació	36
. Mapes de lligament genètic	36
. Mapes de clons solapats	37
. Mapes transcripcionals	38
. MAPA FENOTÍPIC DE LA SÍNDROME DE DOWN	38
. GENS I SEQÜÈNCIES DEL CROMOSOMA 21	42
. MODELS MURINS PER A L'ESTUDI DE LA SÍNDROME DE DOWN	
. RATOLÍ TRISÒMIC PER AL CROMOSOMA 16 MURÍ (Ts16)	49
. RATOLÍ TRISÒMIC PARCIAL Ts65DN	50
. RATOLÍ TRISÒMIC PARCIAL Ts108CJE	51
. RATOLINS TRANSGÈNICS DE SOBREEXPRESSION	52
. RATOLINS TRANSGENÒMICS O TRANSCROMOSÒMICS	53
. HIBRIDACIÓ <i>IN SITU</i> DE FLUORESCÈNCIA (FISH)	55

Objectius	59
Materials i mètodes	63
. RECURSOS EXTERNOS	
. YACS PROCEDENTS DEL CEPH/GÉNÉTHON	65
. LÍNIA CEL·LULAR D'HÍBRIDS SOMÀTICS WA17V	65
. PANNELL D'HÍBRIDS SOMÀTICS DE NIGMS	65
. MÈTODES GENERALS	
. PREPARACIÓ DE LES SONDES	66
. Creixement i obtenció de DNA de la línia WA17V	66
. Obtenció de DNA de YACs	67
. Reacció en cadena de la polimerasa (PCR): <i>Alu</i> -PCR	69
. Marcatge de les sondes amb nucleòtids biotinilats o digoxigenats	70
. PREPARACIÓ DEL SUBSTRAT D'HIBRIDACIÓ	
. Obtenció de cromosomes metafàsics a partir de sang perifèrica humana	72
. Obtenció de cromosomes metafàsics a partir de sang perifèrica de ratolí	73
. Bandes GTL	74
. Deshibridació de les extensions cromosòmiques	75
. HIBRIDACIÓ, DETECCIÓ I OBSERVACIÓ	
. Hibridació de les sondes	76
. Rentats i detecció dels senyals fluorescents	77
. Observació al microscopi de fluorescència i interpretació dels resultats	80
Resultats	83
. ESTUDI DEL QUIMERISME DELS YACS DEL CROMOSOMA 21	85
. MAPATGE DELS GENS <i>DYRK1A</i> I <i>DSCR1</i> AL CROMOSOMA 21	89
. Mapatge del gen <i>DSCR1</i> al cromosoma 21	91
. “ <i>Minibrain (MNBH)</i> is a single copy gene mapping to human chromosome 21q22.2”. <i>Cytogenet Cell Genet</i> 77:182-184 (1997)	95
. ESTUDIS DE FISH EN CASOS DE TRISOMIA PARCIAL DEL CROMOSOMA 21	97
. “YAC and cosmid FISH mapping of an unbalanced chromosomal translocation causing partial trisomy 21 and Down syndrome”. <i>Hum Genet</i> 98:460-466 (1996)	99

. “Down syndrome: characterisation of a case with partial trisomy of chromosome 21 owing to a paternal balanced translocation (15;21)(q26;q22.1) by FISH”. <i>J Med Genet</i> 34:50-54 (1997)	101
. “Clinical and cytogenetic characterisation of a case of Down syndrome due to a duplication 21q22.1 → qter”. <i>J Med Genet</i> (en premsa)	107
. Caracterització clínica i citogenètica d’un cas de síndrome de Down i trisomia parcial del cromosoma 21 deguda a una translocació (21p;21q)	109
. Caracterització citogenètica d’una duplicació 21q22.1→ qter en un cas de síndrome de Down adult	113
. Identificació mitjançant FISH d’una duplicació intersticial del cromosoma 21 en una pacient amb dos trets fenotípics de la síndrome de Down	117
. Compendi dels resultats	121
. ESTUDIS DE FISH EN MODELS MURINS DE LA SÍNDROME DE DOWN	
. Mapatge dels gens <i>Dscr1</i> i <i>Dyrk1A</i> al ratolí Ts65Dn	131
. Tipatge de ratolins Ts65Dn mitjançant el mètode de les empremtes de teixits. “ A new protocol to type the Ts65Dn mouse model for Down syndrome by FISH in newborn and embryo tissue imprints” <i>Technical Tips On Line</i> 1:78 (T01796) (1999)	135
. Estudi de la inserció de transgens en els models murins de sobreexpressió dels gens <i>Dyrk1A</i> i <i>Dscr1</i>	137
<i>Discussió</i>	145
. ESTUDI DEL QUIMERISME DE YACS DEL BRAÇ LLARG DEL CROMOSOMA 21	147
. DADES EPIDEMIOLÒGIQUES	150
. MAPA FENOTÍPIC DE LA SÍNDROME DE DOWN	153
. CONTRAST ENTRE DUES HIPÒTESIS PER A EXPLICAR EL FENOTIP DE LA SÍNDROME DE DOWN I LA TRISOMIA DEL CROMOSOMA 21	156
. VALIDESA DELS MODELS MURINS EN L’ESTUDI DE LA SÍNDROME DE DOWN	161
. PERSPECTIVES DE FUTUR EN ELS ESTUDIS DE LES TRISOMIES PARCIALES DEL CROMOSOMA 21	162
<i>Conclusions</i>	165
<i>Bibliografia</i>	167

Presentació

De totes les anomalies cromosòmiques, la trisomia del cromosoma 21 (HSA21) o síndrome de Down (SD) no és tan sols la més coneguda, sinó que és també la més estudiada. Les raons d'això són la seva elevada prevalença (1 de cada 700 nounats) i alhora el fet que en la seva causa genètica hi estigui implicat el cromosoma humà més petit, el cromosoma 21. Els esforços esmerçats en entendre l'origen de la trisomia 21, la varietat de conseqüències fenotípiques que comporta, així com la contribució de cadascun dels gens que s'han identificat en aquest cromosoma, han donat com a fruit la publicació de nombrosos treballs científics que abasten des de l'àmbit clínic, fins el molecular, genètic, bioquímic, etc. Malgrat tot, encara som molt lluny d'arribar a respondre moltes de les preguntes que, sobretot els pares dels nens amb SD, es fan. El que sí que s'ha aconseguit, però, ha estat una millora en la qualitat de vida i les expectatives de les persones amb SD, així com en el diagnòstic tan postnatal com, sobretot, prenatal.

Aquest treball és una contribució a l'estudi genètic de la SD en el qual s'ha posat a punt una eina de diagnòstic citogenètic molecular que ha permès si més no, poder oferir un assessorament genètic acurat a les famílies amb SD. En l'àmbit estrictament de la recerca, aquest treball ha volgut contribuir a l'estudi genètic de la SD mitjançant l'estudi de les trisomies parcials del HSA21 que, un cop caracteritzades, han d'aportar algunes respostes sobre la participació de determinats gens d'aquest cromosoma en el fenotip complex de la SD.

La *Introducció* consta de quatre parts: la primera recull algunes consideracions generals sobre els aspectes clínics de la SD, la trisomia del HSA21 en les seves diverses formes possibles i els seus possibles orígens. La segona part explica l'estat del coneixement molecular actual del HSA21. La tercera part exposa els avenços en els estudis de la SD en models murins. La *introducció* es conclou amb un petit apunt sobre la tècnica de la hibridació *in situ* de fluorescència (FISH) en la qual s'ha basat tot el treball que es presenta.

Els *Materials i mètodes* recullen tots aquells protocols que s'han utilitzat per a dur a terme aquest estudi, tant els que ja estan resumits en les publicacions incloses, com aquells que no s'hi inclouen, però que són igualment importants per dur a terme aquest treball.

La secció de *Resultats* consta de quatre parts. La primera part recull els resultats obtinguts en la posada a punt del catàleg de sondes que ens calia per a l'estudi que es presenta, bàsicament els YACs. La segona part recull els resultats dels mapatges al HSA21 dels primers gens d'aquest cromosoma que es van aïllar al nostre laboratori. La tercera part presenta tots els resultats dels estudis citogenètics-moleculars fets als pacients amb trisomia parcial del HSA21, tant els que han estat publicats com aquells que encara no ho estan. Finalment, es presenten tots aquells resultats dels estudis fets als models murins, tant el mapatge de gens ortòlegs del HSA21 al ratolí trisòmic Ts65Dn, com l'estudi de l'inserció de transgens als models murins de sobreexpressió generats al nostre laboratori. Tot i que no estan directament relacionats amb els estudis de pacients amb SD i trisomia parcial del HSA21, aquests resultats es presenten en aquest treball per considerar que constitueixen una contribució molt important a l'estudi de la SD al nostre laboratori

Finalment, la *Discussió* és una consideració global sobre el treball realitzat, on es comenten tots els resultats obtinguts i es contrasten amb els publicats per altres grups de recerca del mateix àmbit, s'exposen els pros i els contres de les hipòtesis vigents sobre la correlació genotip-fenotip en la SD i, finalment, es comenta quines són les perspectives de futur pels estudis de la SD.

Abreviatures

A β	proteïna β -amiloide
APECED	
ApoE	apolipoproteïna E
APP	proteïna precursora β amiloide (A4)
BAC	cromosoma artificial de bacteri
BSA	albúmina de sèrum de vedella (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
CEPH	<i>Centre d'Etudes des Polymorphismes Humains</i>
cM	centiMorgan
CIV	comunicació interventricular
cR	centiRay
cDNA	DNA complementari
DAPI	4',6-diamidino-2-fenolindol
DCC	defectes cardíacs congènits
DNA	àcid desoxirribonucleic
dNTP	deoxinucleòtid trifosfat
dTTP	2'deoxitimidina 5'trifosfat
D.O.	densitat òptica
EST	<i>Expressed Sequenced Tagged</i>
FAD	malaltia d'Alzheimer familiar
FBS	sèrum fetal boví (<i>Foetal Bovine Serum</i>)
FISH	hibridació <i>in situ</i> de fluorescència
FITC	isotiocianat fluoresceïna
FOP	foramen oval permeable
GDB	<i>genome database</i>
HSA21	cromosoma 21 humà (<i>Homo sapiens</i> autosoma 21)
ICE	efecte intercromosòmic (<i>InterChromosomal Effect</i>)
IP	iodur de propidi
kb	kilobase
Mb	megabase
MMU	<i>Mus musculus</i>

mRNA	àcid ribonucleic missatger
NIGMS	<i>Human Genetic Mutant Cell Repository</i>
NOR	<i>nuclear organising regions</i>
PAC	cromosoma artificial de P1
pb	parnell de bases
PBS	tampó fosfat salí (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PCR	reacció en cadena de la polimerasa
PFGE	electroforesi en gel de camps polsants
PHA	fitohemaglutinina
RFLP	fragment de restricció de longitud polimòrfica
RNA	àcid ribonucleic
Rob	Robertsionà
rpm	revolucions per minut
SAGE	<i>serial analysis of gene expression</i>
SD	síndrome de Down
SOD	superòxid dismutasa
TRITC	isotiocianat tetrametil rodamina
Ts16	ratolí trisòmic pel cromosoma 16
Ts65Dn	ratolí trisòmic parcial per un segment del cromosoma 16
Ts108Cje	ratolí trisòmic parcial per un segment del cromosoma 16
VNTR	repeticions en tàndem de nombre variable
YAC	cromosoma artificial de llevat

Introducció

SÍNDROME DE DOWN

La síndrome de Down (SD) va ser descrita per primera vegada com a entitat nosològica l'any 1866, però no va ser fins el 1959 que Lejeune a França i Jacobs al Regne Unit, van associar aquesta síndrome amb la trisomia del cromosoma 21 (HSA21). La terminologia síndrome de Down es dóna en honor al metge britànic J.H.L. Down, que va descriure per primera vegada aquest quadre, el 1866. La SD afecta un de cada 700 nounats i és la principal causa de retard mental i de defectes cardíacs congènits en humans. És potser per les característiques facials dels pacients amb SD i per la seva alta prevalença, l'alteració genètica més coneguda a nivell popular i una de les que es coneix millor a nivell genètic.

La trisomia del HSA21 pot ser total o parcial. La trisomia total del HSA21 es produeix per errors en la segregació equitativa dels cromosomes en la divisió meiótica (aquella que es produeix en les cèl.lules germinals per tal d'assegurar la conservació del nombre de cromosomes en la descendència). Aquesta segregació desigual s'anomena no-disjunció i comporta que les cèl.lules descendents d'aquesta cèl.lula germinal (materna o paterna) portin dues còpies del HSA21 enlloc d'una. La conseqüència de la no-disjunció és que en fer-se la fusió dels dos gàmetes per a donar lloc a l'embrió, es produeix una trisomia, en aquest cas, del HSA21 i les cèl.lules del nou individu tenen 47 cromosomes enlloc de 46. Aquest fenomen de no-disjunció s'ha trobat en més alta freqüència en les cèl.lules germinals femenines que en les masculines, de manera que el nombre anòmal de cromosomes, aneuploidia o en aquest cas trisomia del HSA21 és, majoritàriament, d'origen matern (Sherman i col., 1991; Petersen i col., 1991; Antonarakis i col., 1992).

La SD abasta un ventall molt ampli de manifestacions fenotípiques que comparteixen la majoria dels casos estudiats, així com una sèrie d'alteracions clíniques que es troben només en alguns dels casos. Com ja s'ha dit, la SD està associada a retard mental i a defectes cardíacs congènits, però també està associada a alteracions gastrointestinals, endocrines, múscul-esquelètiques, oculars, immunològiques i auditives. Aquestes manifestacions clíniques són una

preocupació constant en la SD, ja que si bé moltes poden estar absents en els primers mesos de vida, algunes aniran apareixent en el decurs del temps.

Gràcies als avenços en el coneixement biomèdic dels darrers 30 anys, les alteracions clíniques que es troben en la SD s'han anat caracteritzant a nivell clínic. Donada la diversitat fenotípica, una de les tasques en les quals els clínics han esmerçat més esforços ha estat en l'elaboració de protocols per a caracteritzar amb detall cadascun dels casos de SD. En aquest aspecte, cal esmentar la vigència dels protocols elaborats per Jackson (1976) i per Epstein (1991a). Gràcies als esforços per a caracteritzar al màxim la patogènia de totes les anomalies clíniques i malformacions de la SD, i al coneixement cada vegada més exhaustiu dels gens que es troben al HSA21 humà i de les seves funcions, ara es poden començar a establir correlacions entre el genotip i el fenotip, les quals han de contribuir substancialment, a un millor coneixement d'aquesta síndrome.

ASPECTES CLÍNICS DE LA SÍNDROME DE DOWN

Els trets clínics més evidents del quadre que caracteritza la SD inclouen diverses petites malformacions o trets dismòrfics que es poden reconèixer en el període neonatal i que, malgrat no estar sempre presents, constitueixen de manera conjunta un fenotip característic de la síndrome (Taula 1). En el període postnatal l'estatura és normal, però després el creixement és limitat (l'estatura mitjana d'una persona adulta amb SD no excedeix gairebé mai la d'un nen de deu anys sense SD) (Rarick i Seefeldt, 1977). El cap de les persones amb SD tendeix a ser petit, rodó i amb el front inclinat. El coll és curt (Fig. 1A); les orelles són ovals, d'implantació baixa i amb lòbuls petits (Fig. 1B) (Fischer-Brandies, 1988); els ulls són lleugerament oblicus cap amunt i enfora degut a la presència d'un plec epicàntic medial que cobreix parcialment l'angle de la fenedura palpebral (Fig. 1C). Són característiques les taques de Brushfield que constitueixen unes motes de depigmentació gris-blanquinoses a l'iris. També és molt característica la cataracta estrellada blava que apareix després dels 10 anys d'edat, així com la presència de blefaroconjuntivitis (Hestnes i col., 1991). El pont nasal és generalment absent o pobrament desenvolupat. La boca tendeix a mantenir-se oberta amb una llengua escrotal, grossa i protruïent. Les mans són grosses amb un plec transvers únic

(plec simià) (Reed, 1991); els dits són petits i sovint corbats cap endins (clinodactília) degut a una segona falange hipoplàsica; el dit cinquè és corbat i entre els dits primer i segon del peu, existeix una separació característica (Rex i Preus, 1982). La pell sol ser freda i mal irrigada.

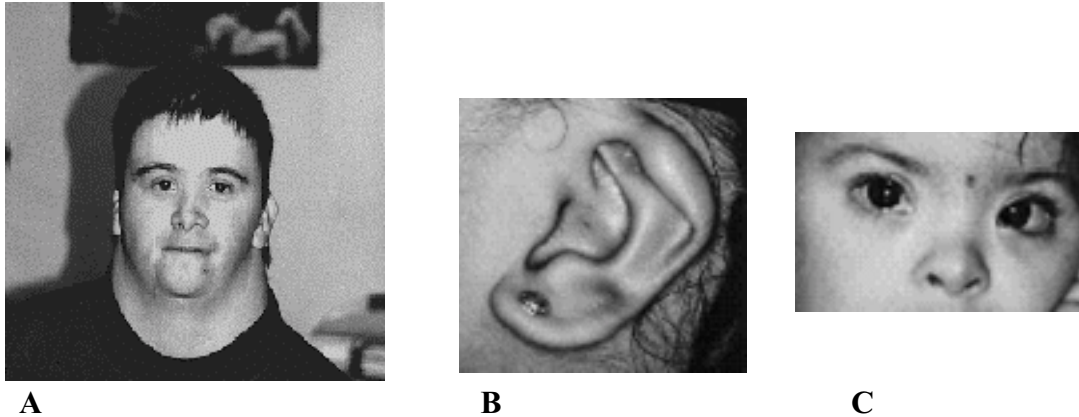


Figura 1. Aspectes del fenotip a nivell de cap i coll de persones amb SD. A/ Persona adulta amb SD: destaquen sobretot el coll curt i ample i les orelles d'implantació baixa. B/ Detall del pavelló auditiu d'una nena de 3 anys amb SD per a mostrar la mida disminuïda i el seu plegament. C/ Detall de l'epicant i del pont nasal absent de la mateixa nena.

Taula 1. Principals característiques físiques de la síndrome de Down

Tret	Percentatge (%)
Fenedures palpebrals oblíques (cap amunt)	82
Pell extensible a la base del coll	81
Paladar estret	76
Braquicefàlia	75
Hiperlaxitud articular	73
Pont nasal absent	68
Espai entre els dits 1er i 2n del peu	68
Mans curtes i amples	64
Coll curt	61
Dentició anòmala	61
Epicant	59
Dit petit de la mà curt	58
Boca oberta	57
Corbatura del dit petit	56
Llengua escrotal	55
Plec simià	53
Orelles plegades i displàstiques	50
Llengua protruïent	47

(Epstein, 1995)

El retard mental i la hipotonia estan sempre presents (Morris i col., 1982) i els defectes cardíacs congènits es donen en un 40% dels casos de SD. Les anomalies gastrointestinals (especialment l'atrèsia duodenal i la malaltia de Hirschsprung) es troben en un 5% dels casos (Knox i Benzel, 1972). La ratio de mortaldat és més alta durant els primers anys de vida i la mort se sol produir per infeccions respiratòries, malformació cardíaca (defectes del septe interventricular amb insuficiència) o leucèmia (Thase, 1982; Fryers, 1986). Dels pacients amb SD que sobrepassen la pubertat, molts viuen fins la vida mitja adulta (35 o 40 anys) i gairebé tots pateixen després una forma de degeneració cerebral o forma prematura de la malaltia d'Alzheimer (Motte i Williams, 1989; Mann i Esiri, 1989).

A la SD es dóna una gran variabilitat en les capacitats intel·lectuals i del desenvolupament psicomotor, els quals, en certa manera, poden estar influenciats per l'entorn o per altres factors genètics (Melyn i White, 1973). Les causes específiques per al retard mental encara no s'han trobat, però s'ha descrit una menor densitat de cèl·lules nervioses en regions concretes del cervell (Crome i col., 1966; Ferrer i Gullotta, 1990), canvis en la composició fosfolipídica de la mielina (Shah, 1979) i alteracions de determinades propietats electrofisiològiques d'algunes neurones (Marin-Padilla, 1976; Becker i col., 1986). En tots els pacients amb la SD després de la tercera dècada de vida apareixen les característiques de la malaltia d'Alzheimer així com un deteriorament progressiu de les facultats cognitives.

Els infants amb SD presenten un risc d'entre 15 i 20 vegades superior respecte la població general de desenvolupar leucèmia, especialment la leucèmia megacarioblàstica aguda dins dels casos de leucèmies agudes no limfocítiques (Robinson i Neglia, 1987). S'ha descrit que l'activitat d'alguns enzims dels eritròcits i dels granulòcits, que no estan codificats per gens del HSA21, estan incrementats; per altra banda, també es pot presentar hiperuricèmia (Pueschel, 1982).

Els homes amb SD són gairebé sempre infèrtils, mentre que les dones poden ser fèrtils (Johannisson i col., 1983). El creixement longitudinal està impedit i hi ha una major incidència de disfuncions tiroidees en els nounats (Fort i col., 1984). S'han trobat també anomalies cel·lulars en alguns teixits perifèrics que inclouen respostes elevades a interferó i agonistes β -adrenèrgics, i molt possiblement un

increment moderat en la sensibilitat a la radiació, als mutàgens químics i als carcinògens (Peeters i Poon, 1987).

La principal causa de mort en la SD són les infeccions, els defectes cardíacs congènits i el càncer. L'elevada susceptibilitat a les infeccions es pensa que pot ser deguda a alteracions en el sistema immunitari, especialment en la maduració i en la funció dels limfòcits T (Jacobs i col., 1978). Els darrers anys s'ha incrementat la longevitat de manera que l'esperança de vida dels individus amb SD sense defecte cardíac congènit pot arribar a ultrapassar els 60 anys.

No hi ha cap pacient amb SD que presenti tots els trets que s'han descrit. Un cas rellevant és el cas que van publicar Avramopoulos i col. el 1997 d'un pacient amb trisomia regular del HSA21 (en sang i en fibroblasts cultivats a partir d'una biopsia de pell) amb només dos trets (braquicefàlia i pont nasal absent) dels 25 proposats per Jackson. El cas invers, és el que van descriure Ahlbom i col. (1996) d'un pacient amb un fenotip indistingible, a nivell clínic, del de la SD i que no presentava trisomia 21 de cap mena.

Retard mental

De tots els trets associats al fenotip de la SD, potser el que causa més preocupació i és motiu d'un nombre més elevat d'estudis, és el retard mental, present, en més o menys grau, en tots els casos. El retard mental associat a la SD es caracteritza per un retard del desenvolupament, alteracions del llenguatge i de la memòria i defectes cognitius del processament auditiu-verbal (Flórez, 1991; Korenberg, 1995). El quocient intel·lectual de les persones amb SD varia des de valors inferiors a 20 fins a superiors a 60 en funció de l'edat, l'entorn de l'individu i també de factors genètics encara desconeguts. En general, el quocient intel·lectual en la SD comença a decaure a la infància i va disminuint durant l'adolescència i l'edat adulta (Hernández i Fisher, 1996). La conducta d'alguns nens amb SD és hiperactiva i de vegades es descriu com una conducta impulsiva (Pueschel i col., 1991).

Les primeres diferències entre el cervell amb SD i el normal ja es comencen a observar en la segona meitat del desenvolupament embrionari, però no és fins després del naixement que aquests canvis es fan molt més evidents (Wisniewski i col., 1990). A nivell macroscòpic, el pes del cervell amb SD és més petit, de l'ordre del 24% segons Flórez (1992) i en conjunt, hi ha una disminució de la seva mida. Freqüentment es detecta una hipoplasia dels lòbuls frontal i occipital i en la meitat dels casos, s'ha vist que hi ha una reducció de la mida dels lòbuls temporals, de l'hipocamp i del cerebel (Raz i col., 1995). Alguns autors (Logdberg i Brun, 1993; Wang i col. 1992) han descrit alteracions en la morfologia del lòbul frontal en la SD la qual cosa podria tenir una gran implicació en les dificultats d'aprenentatge i els problemes de conducta. A nivell histològic, s'ha descrit una disminució en el nombre de neurones i una alteració de la seva organització en l'escorça cerebral, l'hipocamp i el cervellet (Wisniewski, 1990; Hill i col., 1991), tot i que existeix una gran diversitat interindividual. S'han descrit també disminució en el nombre dels arbres dendrítics i en les terminacions sinàptiques (Wisniewski i col., 1996).

Aparell auditiu

Els problemes auditius en les persones amb SD són especialment importants pel desenvolupament del llenguatge i per tant, pel desenvolupament de les capacitats d'aprenentatge. A nivell de l'oïda externa i com ja s'ha comentat anteriorment, els infants amb SD tenen un pavelló auditiu marcadament més petit (fins a més de dues desviacions estàndard) que els nadons sense SD. Sovint també presenten (80% dels casos) un conducte extern molt reduït, que pot arribar a ser estenòtic. Aquest tret clínic és un dels signes diagnòstics més importants de la SD (Aase i col., 1973). Els infants amb SD presenten de manera característica un alt risc d'infeccions de les vies respiratòries superiors que també es tradueixen en otitis mitges que poden esdevenir cròniques. És probable que en l'etiopatogènia de les otitis mitges hi intervingui una certa disfunció de la trompa d'Eustaquí deguda a la braquicefàlia i a la hipotonia, juntament amb alteracions del múscul tensor del

paladar. Finalment, a nivell de l'oïda interna s'han descrit unes espirals coclears més curtes respecte els infants sense SD, que poden causar un efecte de distorsió en l'audició (Walby i Schuknecht, 1984). En alguns casos també s'han descrit malformacions estructurals del sistema vestibular (Harada i Sando, 1981).

Aparell digestiu

La incidència de les malformacions congènites de l'aparell digestiu en la SD s'ha estimat en el 10% (Carter, 1958). Les anomalies d'aquest sistema poden donar una simptomatologia que va des de vòmits crònics fins a restrenyiment també crònic. De vegades, els quadres es poden complicar si les alteracions gastrointestinals són múltiples. En un estudi retrospectiu de 12 anys, durant els quals es van estudiar 112 pacients amb SD, vint-i-set (14%) tenien alguna anomalia greu de l'aparell gastrointestinal: estenosi duodenal (9), reflux gastroesofàgic (5), anus imperforat (5) o malaltia de Hirschsprung (4) (Buchin i col., 1986).

L'anomalia gastrointestinal més freqüent en la SD és l'atrèsia o l'estenosi duodenal que afecta entre un 5 i un 8% dels infants i és, després de les anomalies cardíaques i les infeccions, la causa de mort més important en la SD (Knox i Benzel, 1972). L'estenosi es tradueix en una obstrucció del duodè que dona lloc a vòmits i deshidratació, produït finalment la mort del pacient si no és corregida quirúrgicament. Aquesta intervenció quirúrgica té un alt risc i s'han descrit sèries en les quals la supervivència total se situa en el 41%, el 38% dels quals tenien la SD (Puri i O'Donnell, 1981; Levy, 1991). L'elevada mortalitat en aquestes intervencions en pacients amb SD es pot explicar per la comorbilitat amb les anomalies cardíaques i per l'elevat risc d'infeccions que pateixen els infants amb SD (Buchin i col., 1986).

La malaltia de Hirschsprung o megacolon aganglionar, és una anomalia congènita deguda a l'absència de neurones entèriques (o ganglis) a la part distal del colon i del recte, que produeix la seva contracció permanent i que es manifesta durant la infantesa. L'absència de neurones es produeix per una fallida de la migració de les cèl.lules de la cresta neural fins el colon distal durant la gestació. La

contracció permanent del colon produeix una dilatació massiva abdominal, absència de moviments de l'intestí i una incapacitat per a nodrir-se deguda a l'obstrucció del colon. El 5,9% dels infants amb malaltia de Hirschsprung tenen SD (Garver i col., 1985).

Anomalies cardíques congènites

Els defectes cardíacs congènits (DCC) afecten l'1% de tots els nounats. Aproximadament la meitat dels DCC, els més complexos, comporten la mort durant els primers mesos de vida. La majoria d'infants afectes que arriben a l'edat adulta és gràcies a les intervencions mèdiques o quirúrgiques, o bé perquè l'alteració és ben tolerada.

Taula 2. Incidència de les 10 cardiopaties congènites més freqüents

	Nounats (%)	Nens grans i adults (%)
Comunicació interventricular (CIV)	30,5	17
Comunicació interauricular (CIA)	9,8	17,5
Persistència del conducte arteriós	9,7	14,5
Estenosi pulmonar	6,9	13
Coartació de Aorta	6,8	7
Estenosi aòrtica	6,1	5
Tetralogia de Fallot	5,8	15,5
Transposició de grans vasos	4,2	2
<i>Truncus arteriosus</i>	2,2	2
Atrèsia tricúspide	1,3	1
Altres	16,7	8,5

(Navarro-López, 1995)

Segons Friedman i Child (1982), els DCC són, en general, el resultat d'un mal desenvolupament embrionari d'una estructura normal o de la fallida d'una estructura de progressar més enllà d'un estadi embrionari inicial o del

desenvolupament fetal. Les malformacions cardíques són degudes a causes genètiques multifactorials o ambientals. Menys del 15% de totes les malformacions cardíques es deuen a anomalies cromosòmiques reconegudes o mutacions en gens concrets. De tota manera, una sola mutació en un gen pot ser causativa de determinades formes familiars de defecte del septe auricular, prolapse de la vàlvula mitral o defecte del septe ventricular, entre d'altres, i dels síndromes d'Ellis-van Creveld (Ruiz-Pérez i col., 2000) i de Kartagener (Witt i col., 1999). Els gens responsables de diversos defectes han estat mapats [ex. la síndrome del QT llarg (Russell i col., 1996) o la de Holt-Oram (Li i col., 1997; Basson i col., 1997)] o identificats [ex. síndrome de Marfan (Kainulainen i col., 1990) o la síndrome de Williams (Meng i col., 1998)]. Els defectes de gens contigus a la regió cromosòmica 22q11.2 probablement causen malformacions conotruncals en la síndrome de DiGeorge i la síndrome velocardiofacial (Burn i col., 1995; Wilson i col., 1996).

El 1894 Garrod va descriure per primera vegada la relació entre les anomalies cardíques congènites i la SD i, a partir del 1900, aquestes anomalies ja es van considerar dins del diagnòstic de la SD. Un gran nombre de cardiopaties que es troben en pacients amb SD, es deuen al mal desenvolupament embrionari dels coixinets endocàrdics, que són estructures implicades en la gènesi dels tabics entre els diversos compartiments cardíacs (Spicer, 1984). Als estudis publicats hi ha una gran variabilitat de percentatges d'afectació per cardiopaties en la SD (Taula 3), la qual depèn, en gran mesura, de la supervivència postnatal dels pacients. Tanmateix, els darrers estudis fets, tant en pacients com en teixits fetals, coincideixen a donar una incidència d'entre el 40 i el 50% de tots els casos amb SD (Fabia i Drolette., 1970; Gordon, 1990). Les comunicacions auriculo-ventriculars representen el 60% de tots els DCC en la SD, mentre que en la població general, són molt infreqüents. Això va portar al grup de Korenberg (Wilson i col., 1993) a buscar un possible gen causatiu dins del HSA21 en una família gran on la comunicació auriculo-ventricular es transmet clarament de forma dominant. Els seus resultats van excloure tota la regió entre els marcadors *D21S16* i *D21S56*, però no van trobar cap lligament.

Taula 3. Tipus de cardiopaties més freqüents en la síndrome de Down

	Rowe & Uchida (1961)	Gordon (1990)	Freeman* (1998)
Nº total de pacients	70	63	227
Percentatge de pacients afectes de:			
Defecte coixinets endocàrdics	36	33	-
Defecte tabic interventricular	33	32	80
<i>Ductus arteriosus</i>	10	13	16
Defecte tabic interauricular	9	10	102
Tetralogia de Fallot	1	1	10
Altres	11	11	3

* Aquests valors estan donats al treball original en forma de percentatge i han estat calculats per a mantenir les mateixes unitats dels altres dos treballs.

** El sumatori dels % és superior a 100 donat que existeix la probabilitat que els pacients presentin més d'una patologia.

Sistema immunitari

Malgrat tots els avenços dels darrers deu anys en el camp de l'immunologia, les infeccions continuen sent la primera causa de mort de les persones amb SD (Ugazio i col., 1990). Els infants amb SD són molt més sensibles a les infeccions respiratòries i a les malalties infeccioses en general (Oster i col., 1975). Aquesta hipersensibilitat, així com el fet que la població SD sigui molt més susceptible a l'hepatitis B (Madden i col., 1976), encara no tenen una explicació. Els estudis publicats fins ara sobre els limfòcits B i T dels pacients amb SD demostren que hi ha una alteració en els limfòcits T (Seibel i col., 1984) i que la seva resposta a estimuladors de la divisió com la fitohemaglutinina, és inferior (Karttunen i col., 1984). Això podria explicar-se pel fet que el timus de les persones amb SD s'ha trobat més petit i amb anomalies histopatològiques i funcionals, la població de limfòcits T està disminuïda, hi ha uns límits corticomedul·lars desdibuixats, un

nombre més gran de corpuscles de Hassall i una reducció de l'hormona tímica (FTS), entre d'altres (Levin i col., 1987).

Els infants amb SD representen el 2% de tots els nens diagnosticats de leucèmia limfocítica aguda (LLA) i el 13% de tots els nens diagnosticats amb leucèmia mieloide aguda (LMA), la qual cosa representa que aquests infants tenen entre 10 i 20 vegades més risc de patir aquestes leucèmies respecte els nens sense SD (Krivit i Good, 1957; Robinson i Neglia, 1987; Slordahl i col., 1993). Dins de les leucèmies de tipus LMA, la meitat són del subtipus leucèmia aguda no-limfocítica (LANL) del tipus M7, la qual apareix majoritàriament durant els tres primers anys de vida i és molt poc freqüent en infants no trisòmics (Lie i col., 1996). A més a més, els nounats amb SD i els infants fenotípicament normals, però que són mosaics per a la trisomia del HSA21, tenen un risc quatre-centes vegades superior de desenvolupar una leucèmia transitòria (mielopoiesi anormal transitòria o MAT), la qual és extremadament rara en infants euploides (Zipurski i col., 1987). Per altra banda, el 20% dels casos de MAT desenvolupen una LNLA durant la infantesa (Shen i col., 1995). Una altra característica de les leucèmies en la SD és la seva mala resposta als tractaments quimioteràpics (especialment al metotrexat) (Peeters i Poon, 1987) i el seu mal pronòstic. L'associació entre la trisomia del HSA21 i les leucèmies també ve donada pel fet que un 14% dels infants amb un cariotip constitutiu normal que desenvolupen una leucèmia, tenen trisomia 21 en cariotip de moll d'os que desapareix amb la remissió de la leucèmia (Rowley, 1981).

Un estudi recent de Cavani i col. (1998) corrobora els estudis anteriors que descriuen, mitjançant l'anàlisi de marcadors polimòrfics de tot el braç llarg del HSA21, la prevalença gairebé exclusiva d'errors de meiosi tipus II i un increment de la homozigositat de marcadors de la regió pericentromèrica (Abe i col. 1989; Niikawa i col., 1991; Shen i col., 1995). A partir d'aquesta associació, Niikawa i col. (1991, 1996) van proposar un model per a explicar la prevalença tan alta de leucèmies als infants amb SD. Aquest model proposa que l'homozigositat disòmica d'un al·lel produïria la pèrdua de funció d'un gen supressor de tumors que hi hauria a la regió pericentromèrica 21q. Aquesta hipòtesi va ser corroborada per Cavani i col. (1998).

Malaltia d'Alzheimer

La malaltia d'Alzheimer (Alzheimer, 1907) és una síndrome neurodegenerativa que dona lloc a una demència progressiva, característicament més freqüent en dones que en homes. Com a mínim, un 15% dels casos es deuen a una mutació d'herència autosòmica dominant, però la majoria dels casos són esporàdics. Fins i tot els bessons univitel·lins poden presentar una gran discordança en l'edat d'aparició de la malaltia (Nee i col. 1987). Malgrat això, la malaltia d'Alzheimer presenta un espectre uniforme de trets clínics -deteriorament progressiu i global de les facultats intel·lectuals- que comença entre la meitat i l'últim terç de la vida, juntament amb pèrdua de cèl·lules neuronals determinades en estructures cerebrals com el nucli basal de Meynert (Price i col. 1986). Els primers símptomes de la malaltia d'Alzheimer són la pèrdua de memòria a curt termini i la desorientació temporo-espacial. A mesura que la malaltia avança, es produeix una incapacitat progressiva per al raonament. Des del punt de vista histopatològic, els cervells dels pacients amb la malaltia d'Alzheimer presenten característicament plaques neurítiques i capdells neurofibrilars. Les plaques neurítiques són lesions multicel·lulars que contenen dipòsits extracel·lulars de proteïna β -amiloide (β A), especialment a l'hipocamp, l'escorça cerebral i l'amígdala, amb neurites distròfiques, microglia activada i astroglià reactiva (Dickson, 1997). Els capdells neurofibrilars són lesions citoplasmàtiques intraneuronals que es generen per polimerització de la proteïna associada a microtúbuls, tau, que es troba hiperfosforilada (Goedert i col., 1992). Els dos esdeveniments són independents; l'acumulació de β A s'ha associat a l'activació local de microglia amb l'alliberament de citoquines i amb resposta inflamatòria generalitzada (Lue i col., 1996; Rogers i col., 1996), la qual podria causar la degeneració axonal i dendrítica, la mort neuronal que es detecta a l'escorça i que comporta pèrdues sinàptiques i conseqüentment, un dèficit en els processos de neurotransmissió els quals, finalment, comporten la pèrdua de memòria.

Un patró d'herència típicament autosòmic dominant es troba en la malaltia d'Alzheimer presenil (aquella que es desenvolupa abans dels 65 anys). Per a la malaltia d'Alzheimer que es desenvolupa a partir dels 65 anys, no s'ha trobat un

patró d'herència clar i es pensa que hi ha factors genètics i ambientals que influencien la penetració de la malaltia. L'Apolipoproteïna E (ApoE) es va identificar com un factor genètic de risc per a la malaltia d'Alzheimer, quan es va trobar en lesions cerebrals de pacients amb malaltia d'Alzheimer. L'ApoE es lliga amb una gran eficiència a la A β , fent-la menys soluble i conseqüentment, més fàcilment dipositable (Strittmatter i col., 1993). El gen de l'ApoE es troba al cromosoma 19 i se'n troben tres al·lels preferents: ϵ 2, ϵ 3 i ϵ 4, que es corresponen a tres isoformes diferents. L'al·lel ϵ 4 augmenta el risc per la malaltia d'Alzheimer tant en la forma presenil (van Duijn i col., 1994) com en la forma d'aparició tardana (Saunders i col., 1993) i el risc encara és més gran per als homozigots de l'al·lel ϵ 4. En canvi, l'al·lel ϵ 2 sembla que podria tenir un efecte protector i per tant, disminuiria el risc de patir la malaltia d'Alzheimer (Chartier-Harlin i col., 1994; Corder i col., 1994). Això és encara motiu de controvèrsia, ja que altres autors han trobat que aquest mateix al·lel ϵ 2 també representa un augment del risc de patir la malaltia d'Alzheimer (van Duijn i col., 1995).

Potser una de les claus per a entendre l'etiologia de la malaltia d'Alzheimer es troba en el fet que tots els pacients amb SD que viuen més de 30 o 40 anys desenvolupen alteracions neurològiques indistingibles, en essència, de la malaltia d'Alzheimer clàssica i alguns presenten demència (Olson i Shaw, 1969; Glenner i Wong, 1984; Wisniewski i col., 1988). La hipòtesi és doncs, aparentment senzilla: hi ha d'haver algun gen al HSA21, la sobreexpressió del qual sigui capaç de produir la malaltia d'Alzheimer. Per una banda, gairebé tots els malalts d'Alzheimer desenvolupen algun tipus de dipòsit amiloid en arribar a la senectud, possiblement idèntic al que es troba als pacients amb malaltia d'Alzheimer i a les persones amb SD. El 1987 quan els grups de Goldgaber, de Kang, de Robakis i de Tanzi van localitzar el gen de la Proteïna Precursora Amiloide (*APP*) al HSA21, es va establir el primer model específic per a lligar la malaltia d'Alzheimer i la SD. Dos fets posteriors van implicar encara més el gen *APP* com a candidat per a la malaltia d'Alzheimer: d'una banda, el fet que algunes famílies amb malaltia d'Alzheimer mostraven lligament al HSA21 (St. George-Hyslop i col., 1987), i de l'altra, que el gen *APP* es trobés sobreexpressat en la SD (Tanzi i col., 1987; Neve i col., 1988). El 1989, Rumble i col. van proposar que un augment de l'*APP* produïria una

sobreexpressió i un increment dels dipòsits de la A β , i que això es correlacionaria amb la clínica de la malaltia d'Alzheimer. Dos anys més tard, es va demostrar que mutacions al gen *APP* en membres afectes, cosegregaven amb la malaltia d'Alzheimer familiar (FAD) d'aparició temprana (Goate i col., 1991). Malgrat tot, no s'ha pogut establir mai que la trisomia del gen *APP* predisposi a la malaltia d'Alzheimer, entre altres raons pel fet que els casos de trisomia parcial del HSA21 amb SD que hagin arribat a la tercera o quarta dècada de la vida són molt rars. Només hi ha un cas a la literatura (Prasher i col., 1998), en el qual un pacient de 78 anys amb SD i trisomia parcial del HSA21 que no incloïa el gen *APP*, no presentava la malaltia d'Alzheimer. Malgrat tot, aquest estudi no és conclouent ja que aquest pacient era homozigot per l'al·lel $\epsilon 2$ de l'ApoE i l'absència de demència del pacient tampoc no es va poder associar a l'absència de l'al·lel $\epsilon 4$.

Un altre motiu per a pensar en l'implicació del HSA21 en la malaltia d'Alzheimer és el fet observat que les famílies en les quals hi ha una segregació autosòmica dominant de la malaltia d'Alzheimer tenen un nombre més elevat de descendents amb la SD (Heston i Mastri, 1977; Heston i col., 1981).

Cal esmentar també l'estudi que van publicar Rowe i col. (1989) en què van detectar la presència de cèl·lules trisòmiques pel HSA21 en sang perifèrica de pacients que havien desenvolupat la malaltia d'Alzheimer als quaranta anys. Aquests pacients mosaics per a la trisomia 21, no tenien cap dels trets clínics de la SD. Els mateixos autors van postular arran d'aquesta troballa, que potser l'edat d'inici de la malaltia d'Alzheimer es podria correlacionar amb el percentatge de cèl·lules trisòmiques. Potser, fins i tot, el mosaïcisme de cèl·lules trisòmiques pel HSA21 seria tan baix en alguns casos que no es podria ni detectar. A més a més, s'ha pogut constatar que el teixit que generalment s'estudia -els limfòcits en sang perifèrica- presenta un grau de mosaïcisme inferior respecte a altres teixits estudiats (Pagon i col., 1979; Ford i col., 1981). Finalment, cal parlar del model que va proposar Potter (1991) pel qual tant la forma familiar com l'espòrica de la malaltia d'Alzheimer es poden explicar per l'acumulació de cèl·lules trisòmiques pel HSA21 durant la vida del pacient. D'aquesta manera, les cèl·lules trisòmiques pel HSA21 s'anirien acumulant i desenvoluparien la malaltia a una edat més tardana degut a un efecte produït pel mosaïcisme.

Els darrers anys l'estudi de la malaltia d'Alzheimer ha demostrat que mutacions en dos altres gens, la presenilina 1 (PS1) i la presenilina 2 (PS2), localitzats als cromosomes 14 i 1 respectivament, són suficients per a causar la malaltia d'Alzheimer presenil (Sherrington i col., 1995; Levy-Lahad i col., 1995), però en cap d'aquests dos casos no hi ha alteracions cromosòmiques o reordenaments com en el cas de la hipòtesi de la proteïna A β . L'acumulació de l'A β al cortex cerebral és un esdeveniment invariable que es produeix aviat en la patogènia de la malaltia d'Alzheimer. El pas final en la generació de l'A β des de l'APP és, probablement, una proteolisi intermembranosa duta a terme per la γ -secretasa. Mutacions als gens de les presenilines 1 i 2 alteren l'activitat de la γ -secretasa, de manera que s'incrementa la producció de la isoforma A β 42, que és altament amiloidogènica.

TRISOMIA DEL CROMOSOMA 21

El 95% dels casos de SD es deuen a una trisomia total del HSA21 (trisomia regular), el 5% restant de casos són deguts a la presència en mosaïcisme de trisomia regular (1%), o a una trisomia ocasionada per una translocació desequilibrada (Robertsoniana o no Robertsoniana) (4%) (Taula 4). Dins del darrer grup s'hi inclouen les trisomies parcials del HSA21 que representen un percentatge mínim (inferior a l'1%), però gens menyspreable, dels casos de SD (Epstein, 1995).

Translocacions Robertsonianes

Les translocacions Robertsonianes (Rob) són aquelles que es donen quan hi ha una fusió de braços llargs sencers -a nivell de centròmer o de braços curts- entre dos cromosomes acrocèntrics. Aquest tipus de reordenaments són les

translocacions més freqüents en humans (1 de cada 1.000 nounats) (Therman i col., 1989).

Taula 4. Freqüències d'alteracions cromosòmiques i translocacions Robertsonianes que donen lloc a trisomia del cromosoma 21

Anomalia citogenètica	freqüència (%)
47,+21	89.3 - 93
47,+21/46 mosaic	1.0 - 3.7
Translocacions Rob	
46,-14,+ Rob(14;21)	1.5 - 3.4
46,-21,+ Rob (21;21)	1.6 - 2.1
46,-15,+ Rob (15;21)	0.2 - 0.6
46,-13,+ Rob (13;21)	0.1 - 0.6
46,-22,+ Rob (21;22)	0.1 - 0.3
Translocacions recíproques	0.2 - 0.3

(Thuline i Pueschel , 1982; Hook, 1982)

Segons Giraud i Mattei (1975), entre el 40 i el 50% de les translocacions Robertsonianes que es donen en la SD entre el HSA21 i un cromosoma del grup D (13, 14 o 15) són d'origen familiar, és a dir s'originen per la transmissió en desequilibri d'una translocació Robertsoniana parental equilibrada. Per una altra banda, només un 4% dels casos de translocacions Robertsonianes que impliquen un cromosoma acrocèntric del grup G (21 o 22), són d'origen familiar. De les deu combinacions possibles entre els 5 cromosomes acrocèntrics en humans que resulten en translocacions Robertsonianes no-homòlogues, n'hi ha dues que són molt més freqüents que les altres: Rob(13q;14q) i Rob(14q;21q) (Taula 4). Una possible explicació per a aquest fenomen la donen els estudis de punts de trencament a les regions centromèriques, els quals donen per a aquestes dues translocacions, un sol punt de trencament (Page i col., 1996). Finalment, cal esmentar que moltes de les translocacions considerades inicialment com a Robertsonianes (21q;21q) han hagut de ser requalificades com isocromosomes i(21q) *de novo*, originades per una mala divisió del centròmer. Això s'ha pogut

determinar mitjançant estudis de polimorfismes de DNA a les regions pericentromèriques (Antonarakis i col., 1990; Robinson i col., 1994).

Translocacions recíproques i no recíproques

Les translocacions no Robertsonianes recíproques o en equilibri del HSA21 són aquells intercanvis de material cromosòmic que es donen entre el HSA21 i qualsevol altre cromosoma, autosoma o cromosoma sexual. Aquestes translocacions poden no tenir cap conseqüència fenotípica, però en alguns casos, pot quedar interromput un gen a causa del reordenament la pèrdua de dosi del qual produeixi una alteració. Quan les translocacions recíproques es transmeten a la descendència és quan existeix la probabilitat de produir un desequilibri cromosòmic (una monosomia o una trisomia parcials). Això es produeix quan no es transmeten junts els dos cromosomes que han intercanviat el material. Les probabilitats de segregació de cadascun dels cromosomes translocats no és a l'atzar, sinó que depen de la formació dels quadrivalents en la fase de paquitè de la meiosi, condicionant la seva segregació a les cèl.lules filles. Segons els criteris de Jalbert (1980), això està íntimament relacionat amb la grandària dels fragments intercanviats, ja que el tipus de segregació que s'afavoreix és aquell que produeix un desequilibri més petit de material cromosòmic. Segons els estudis publicats sobre aquests reordenaments cromosòmics, quan són viables tenen conseqüències fenotípiques diverses, però la majoria dels casos presenten retard mental en un grau més o menys elevat (Fryns, 1979; 1986). Aquestes translocacions en desequilibri també es produeixen *de novo* per un mecanisme encara desconegut.

Trisomia del cromosoma 21 en mosaic

El mosaïcisme cromosòmic és el fenomen que es dona quan la dotació cromosòmica (estructural o numèrica) no és la mateixa en totes les cèl.lules d'un mateix individu.

La trisomia del HSA21 en mosaïcisme pot ser conseqüència d'una no-disjunció meiòtica o mitòtica. En el primer cas, la no-disjunció es produeix poc

després de la fecundació, de tal manera que es generen dues poblacions cel.lulars, una trisòmica i l'altra monosòmica (aquesta es perd, probablement durant el mateix desenvolupament embrionari). En el segon cas, el HSA21 extranumerari d'una cèl.lula, es perd poc després de la fecundació (Fig. 2). Segons Richards (1974), un 20% dels mosaics identificats fenotípicament, són d'origen mitòtic. També s'han trobat mosaics pels reordenaments cromosòmics que produeixen trisomia del HSA21.

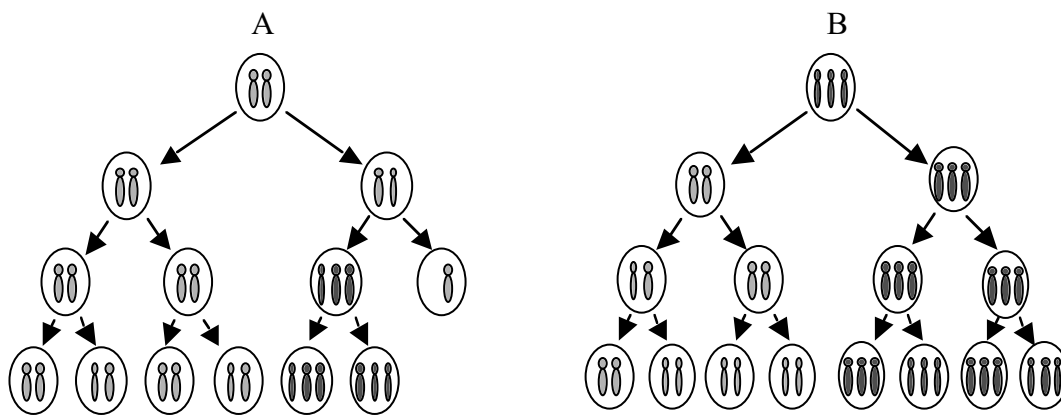


Figura 2. Representació esquemàtica de dos possibles mecanismes de generació de mosaïcisme de la trisomia del HSA21. A/ La no-disjunció mitòtica es produeix després de la fecundació i la línia cel·lular 45,-21 s'acaba perdent. B/ La no-disjunció és meiótica I i en les divisions posteriors, es produeix la pèrdua d'un HSA21 donant lloc a dues poblacions cel·lulars diferents.

Els casos de trisomia en mosaic s'identifiquen generalment per tres vies: 1/ Estudis citogenètics convencionals dels casos amb fenotip de SD; 2/ estudis citogenètics de pacients amb trets suggestius de SD, de pacients amb un retard mental lleu o pacients amb trets dismòrfics sense un diagnòstic clar; 3/ estudis citogenètics d'aquells pares que han tingut més d'un fill amb SD. Un problema important en el diagnòstic dels mosaics, especialment en aquells casos en què el nombre de cèl·lules trisòmiques és molt baix, és establir el llindar del mosaïcisme, ja que, no només el grau de mosaïcisme varia amb el temps (Taysi i col., 1970; Uchida i col., 1980; Wilson i col., 1980), sinó que en limfòcits de sang perifèrica sol ser inferior al de fibroblasts cultivats del mateix individu (Richards i col., 1974).

El fenotip associat al mosaïcisme del HSA21, és molt variable i les temptatives d'establir correlacions entre el retard mental i el grau de mosaïcisme en limfòcits o fibroblasts no han tingut èxit (Kohn i col., 1970; Fischler i col., 1974). El que encara no s'ha pogut estudiar és aquesta correlació en teixits com el cervell. El fenotip dels casos de mosaïcisme és extraordinàriament variable, des de casos "típics" de SD fins a casos amb petites dismòrfies i retard mental, no havent-se descrit casos de mosaïcisme amb defectes cardíacs congènits (Kohn i col., 1970). Agafats en conjunt, els casos de SD en mosaic tenen un coeficient intel·lectual entre 10 i 20 punts superior respecte als casos de SD no mosaics (Fishler i col., 1976). En el que sí que hi ha consens, és en què la presència de mosaïcisme no té valor prognòstic (Carlin i col., 1978). Un altre aspecte important del mosaïcisme per la trisomia 21 pot ser la que ja s'ha comentat anteriorment per a la malaltia d'Alzheimer, però aquest aspecte no està encara prou estudiat.

NO-DISJUNCIÓ DEL CROMOSOMA 21 I EDAT MATERNA

Les aneuploïdies poden tenir diversos orígens: no-conjunció, no-disjunció, defecte de la divisió del centròmer, una rèplica extra dels cromosomes, o una pèrdua d'un cromosoma. Tots aquests fenòmens, excepte la rèplica extra dels cromosomes, han estat demostrats en organismes experimentals. El fenomen fins ara més estudiat i que comporta la formació de zigots trisòmics, ha estat el de la no-disjunció.

S'ha descrit una gran influència de l'edat materna en els casos de trisomia del HSA21. La incidència de SD creix en un ordre de magnitud en dones majors de 37 anys, comparat amb les dones de 20 anys. De tota manera, gairebé el 80% dels infants amb SD neixen de mares més joves de 35 anys, ja que l'increment de la incidència amb l'edat es compensa per la taxa elevada de naixements de mares joves (Hook, 1983a). Ja des de l'any 1960 en què Polani i col. van postular que la no-disjunció podia resultar de la persistència del nuclèol durant la profase meiótica, cosa que comportaria el no aparellament dels cromosomes acrocèntrics petits en l'oòcit vell, s'ha intentat trobar una explicació per a l'efecte de l'edat materna en la

no-disjunció, però la majoria de les hipòtesis, inclosa la de Polani, han acabat sent rebutjades.

L'origen parental dels cromosomes es pot determinar mitjançant tècniques de genètica molecular de marcadors polimòrfics (estudi de microsatèl·lits, entre d'altres) i això ha permès estudiar l'origen dels tres cromosomes 21 en casos de SD. De la mateixa manera, s'ha pogut determinar que en el 95% dels casos, el fenomen de la no-disjunció és d'origen matern. Aquest mateix tipus d'estudis ha permès estudiar en quina fase de la divisió cel·lular (meiosi I, meiosi II o mitosi) s'ha produït la no-disjunció (Taula 5) i també s'ha pogut determinar que, dins dels errors de no-disjunció d'origen matern, el 77% dels casos es deuen a un error de no-disjunció en meiosi I (Sherman i col., 1994).

Taula 5. Origen parental i localització de l'error de no-disjunció en la divisió cel·lular d'individus amb trisomia 21 segons estudis de marcadors de DNA

Origen parental del HSA21 extranumerari	Localització de l'error	Número de casos	Edat parental (anys ± SD)	%
Controls	-	179	27,2 ± 6,0	-
Materns		571*		88
	MI	382	31,1 ± 6,1	
	MII	133	32,4 ± 6,8	
Paterns		51*		8
	MI	13	26,2 ± 6,0	
	MII	21	26,1 ± 5,7	
Mitòtics				20
	Matern	11	25,8 ± 4,0	
	Patern	9	29,9 ± 4,9	

(Lamb i col., 1996)

* Inclouen els casos en els quals la localització de l'error ha estat impossible de determinar

Aquesta taula posa de manifest que la majoria de no-disjuncions del HSA21 en la SD són d'origen matern i es produeixen en meiosi I. És en aquest estadi de la divisió cel.lular on s'ha demostrat la influència de l'edat materna en aquest fenomen de no-disjunció. Malgrat que encara no es coneix quina és la causa biològica que produeix aquest fenomen, les hipòtesis han estat moltes. Recentment, s'ha proposat que en molts casos de gàmetes femenins amb disomia del HSA21, hi ha una disminució global a tot el seu genoma de la recombinació (Brown i col., 2000).

L'estudi dels casos de no-disjunció d'origen matern i en meiosi I, ha permès trobar la primera correlació entre la no-disjunció de cromosomes humans i una recombinació anòmala. Lamb i col. (1997) van generar mapes de lligament genètic del HSA21 a partir de trisomies MI i MII d'origen matern i van trobar que el mapa de trisomia MI materna és substancialment més curt que el mateix mapa de dones normals, cosa que implica una reducció de la recombinació. Aquests autors també van veure que la distribució dels fenòmens de recombinació al llarg del braç llarg del HSA21 és anòmal en aquesta població. La reducció es troba, sobretot, a les regions proximals del cromosoma i la majoria dels intercanvis es localitzen a la regió del telòmer. Per altra banda, aquest grup també va trobar que el mapa MII matern és significativament més llarg respecte al de les dones normals i per tant, la recombinació en aquest cas s'incrementa sobretot prop del centròmer. Algunes configuracions quiasmàtiques doncs, semblaria que confereixen un major risc de no-disjunció. Aquestes configuracions s'inicien a MI i poden segregar malament tant a MI com fins a MII, fins i tot possiblement a totes dues divisions. Donat que en condicions normals la presència d'un sol quiasma (independentment de la seva localització) és suficient per a la segregació cromosòmica normal, existeix la hipòtesi que amb l'edat materna, l'ovari envelleix i pot donar-se un descens o falla de l'aparell meiótic (com poden ser un component del fus o una proteïna de cohesió de cromàtides) i destorbar el procés meiótic. Els resultats d'aquests mateixos autors indiquen que les tètades meiótiques susceptibles de no-disjunció estan associades a la distància entre el centròmer i l'intercanvi meiótic més proper.

Els intercanvis pericentromèrics sembla que predisposen la tètada cap a una no-disjunció de tipus MII mentre que si l'intercanvi més proper és prop del telòmer, s'estableix una susceptibilitat de no-disjunció MI. Existeixen diversos models per a explicar l'increment d'intercanvis proximals observats en cromosomes que segreguen en una no-disjunció de tipus MII. Possiblement quiasmes proximals predisposen a una incapacitat per a què se separi el bivalent i passi intacte a la placa metafàsica II de manera que a través de la divisió MII, el bivalent es divideix reduccionalment i resulta un gàmeta disòmic amb centròmers idèntics. Així, la recombinació proximal, un fenomen que es dona a MI, es resol i es visualitza com un error a MII. Un model alternatiu per a explicar el mateix fenomen, proposa que la resolució dels quiasmes proximals porten a una separació prematura de les cromàtides germanes just abans de l'anafase I (Koehler i col. 1996). La resolució d'un quiasma comporta l'alliberament de la cohesió de les cromàtides germanes, distal al lloc on s'ha produït l'intercanvi (Hawley i col. 1994). Els intents per a separar quiasmes molt propers al centròmer podrien resultar en una separació prematura de les cromàtides.

Sigui quin sigui el model autèntic, tots els autors coincideixen en què per a la no-disjunció es necessita la suma de determinats esdeveniments meiòtics abans que no es doni la no-disjunció. Malgrat que determinats patrons d'intercanvi siguin susceptibles de no-disjunció, aquests patrons per sí mateixos no són suficients per a resultar en una mala segregació cromosòmica. Algun tipus d'"agitació" meiòtica addicional com pot ser la formació anòmala del fus, l'alliberament prematur de la cohesió entre les cromàtides germanes o un desequilibri hormonal, és necessari per a la no-disjunció i és aquest factor el que depèn de l'edat materna.

Tanmateix, existeix un subgrup de població trisòmica amb un nombre de tètades i localització normal de quiasmes. En aquesta població, la no-disjunció es podria explicar per circumstàncies concretes en l'òocit, no relacionades amb la recombinació, i que podrien ser responsables d'una mala segregació cromosòmica. En aquest cas, cal esmentar el model d'Avramopoulos i col. (1996) que estudiant el possible paper de determinats al·lels de l'ApoE en el desenvolupament de l'òocit,

van trobar un augment en la freqüència de l'al·lel $\epsilon 4$ en mares joves amb una no-disjunció MII. Els portadors d'aquest al·lel tenen un nivell més alt de colesterol en plasma i això, per un efecte en cascada, portaria fins un canvi de pH intracel·lular de l'òocit que reduiria la mida del fus mitòtic la qual comportaria alhora, un desplaçament i una no-disjunció.

No s'ha descrit fins ara cap factor ambiental que influeixi en el fenomen de la no-disjunció. El diagnòstic prenatal és possible mitjançant estudis citogenètics en mostres de líquid amniòtic o de vellositats corials o amb la determinació dels nivells materns d' α -fetoproteïna, gonadotropina corial o d'estriol no conjugat.

Finalment, cal esmentar en aquest capítol els nombrosos estudis que s'han fet des de l'any 1963 quan Lejeune va suggerir que hi podia haver un efecte intercromosòmic (ICE, *Interchromosomal Effect*) en l'origen de la trisomia del HSA21 i en altres aneuploidies. Aquesta hipòtesi ha estat molt estudiada però els resultats no són encara concloents. Sembla que hi ha efectivament, un ICE en alguns casos determinats però que això dependria dels cromosomes implicats en el reordenament i de la mida dels fragments implicats (de la qual cosa depen directament la formació dels bivalents en la meiosi, del tipus de segregació cromosòmica que es donarà). Aquest tipus d'estudis han suposat un gran pas endavant amb l'aplicació de la tècnica de FISH en estudis de disomia (en aquest cas del HSA21) en caps d'espermatozoides d'individus portadors de translocacions recíproques, substituint així els estudis complicats de cariotips de cèl·lules germinals mitjançant fusions amb cèl·lules de hamster (Blanco i col., 1996, 1998).

CROMOSOMA 21 HUMÀ

El HSA21 és l'autosoma més petit del genoma humà; és acrocèntric, medeix 46 megabases (Mb), representa l'1,7% de tot el genoma haploid humà i es calcula que conté entre 250 i 400 gens. Es considera que és la sobreexpressió d'una fracció de gens del HSA21 la responsable dels trets fenotípics característics de la SD. Fins avui només es coneixen 127 d'aquests gens (Taula 7) i la seqüenciació d'aquest cromosoma ha estat recentment acabada (Hattori i col., 2.000), predint l'existència d'altres 98 gens. El coneixement de tots els gens del HSA21, ha de contribuir d'una manera eficaç a la comprensió de les alteracions clíniques de la SD i facilitar el desenvolupament de mesures terapèutiques per les malalties que conté.

El braç curt del HSA21 medeix entre 10 i 15 Mb (Morton, 1991) i acaba en una regió satèl.lit de mida variable. Prop del satèl.lit hi ha la constricció secundària que, com les regions organitzadores nucleolars (NOR), conté múltiples còpies de gens ribosomals (Henderson i col., 1972) i es tenyeix amb plata. El braç curt del HSA21 està fonamentalment constituït per seqüències repetitives ordenades en tàndem o distribuïdes de forma aleatòria (Choo i col., 1988; Greig i Willard, 1992; Vissel i Choo, 1992). Aquestes seqüències comparteixen un grau molt elevat d'homologia amb les regions p dels altres cromosomes acrocèntrics, concretament, l'homologia és altíssima amb 13p, de manera que la generació de sondes específiques d'aquestes dues zones cromosòmiques ha estat difícil. Donada l'absència de gens, l'interès en la caracterització genòmica d'aquesta regió ha estat escàs i molt pocs grups han construït mapes de la regió (Nizetic i col., 1994; Korenberg i col., 1995; Wang i col., 1999).

El centròmer és fonamental per a l'aparellament i segregació de les cromàtides germanes durant la mitosi en la metafase. Com tots els centròmers dels cromosomes humans, està format per seqüències de DNA repetides en tàndem (Choo, 1990). Aquestes seqüències repetitives del HSA21 estan formades per DNA satèl.lit dels tipus I, II i III. Es creu que aquestes famílies de seqüències repetitives, poden estar implicades en l'associació de les regions satèl.lit dels cromosomes acrocèntrics durant la mitosi i en la formació dels nuclèols durant

l'interfase (Matsumoto i col., 1989). Ha estat motiu de controvèrsia científica el postulat que un fenomen d'aquest tipus (associació de satèl.lits) podria contribuir a la no-disjunció meiótica i que en pares de nens amb SD, hi ha una freqüència més elevada de cromosomes acrocèntrics amb NOR dobles (dNOR) (Hansson i col., 1978; Jackson i col., 1985).

Tots els gens coneguts fins ara al HSA21 (tret dels ribosomals) es localitzen al braç llarg (q), que té el seu patró de bandes característic. Les translocacions Robertsonianes que comporten la pèrdua del braç curt d'un dels cromosomes translocats, no tenen cap efecte fenotípic.

MAPES GENÒMICS DEL CROMOSOMA 21

En el decurs de l'estudi del HSA21, s'han generat una sèrie de mapes obtinguts per diferents tècniques, tots amb la finalitat de caracteritzar al màxim el contingut del HSA21 i de poder ordenar els gens que s'han anat identificant. El mapa final suposa la integració de tots els mapes que s'han generat. Per al HSA21 els mapes que s'han generat són els de punts de trencament, d'híbrids de radiació, de lligament genètic, de clons solapats, de gens i de fenotips.

Mapa de punts de trencament

Un dels primers mapes del HSA21 que es van generar va ser el de punts de trencament (també anomenat mapa d'híbrids somàtics) que consisteix en la generació d'híbrids somàtics que contenen segments del HSA21, provinents d'aberracions cromosòmiques identificades citogenèticament. Aquests híbrids permeten la localització de qualsevol fragment de DNA del HSA21. El gran inconvenient d'aquest tipus de mapa és que durant el creixement de les línies cel.lulars híbrides es poden produir reordenaments que causin la pèrdua de l'alteració (Patterson, 1993). Pel HSA21 existeix un pannel de línies cel.lulars híbrides que delimiten prop de 30 intervals del cromosoma (Gardiner i col., 1988; Patterson, 1991).

Mapa d'híbrids de radiació

Aquest mapa està basat també en l'obtenció d'híbrids somàtics que contenen segments del HSA21 generats, en aquest cas, per la radiació prèvia del cromosoma. Es tracta de subclonar els diferents segments generats (entre 8 i 10 Mb) per la radiació en diferents línies híbrides de manera que es tingui un conjunt de línies amb tot el cromosoma representat. Aquests mapes utilitzen per a mesurar la distància l'unitat anomenada centiRays (cR), la qual depèn de la dosi de radiació que han rebut els cromosomes i de la mida dels fragments retinguts en els híbrids. El mapa d'híbrids de radiació té el mateix inconvenient que l'anterior, el reordenament del material genètic de les línies cel·lulars, però també cal tenir en compte que la radiació pot haver produït mutacions als segments del HSA21. El mapa de radiació del HSA21 medeix 650 cR on 1 cR equival a 68 kb (Cox i col., 1990; Burmeister i col., 1991).

Mapes de lligament genètic

Són mapes que es basen en la recombinació meiótica. Com més propers estan dos marcadors, més elevada és la probabilitat de que segreguin junts després de la recombinació meiótica. Aquests mapes, indiquen la distància que hi ha entre dos loci determinats. Com més polimòrfics siguin els marcadors que s'estudien, més senzilla és la seva localització, ja que la informativitat és més elevada i les recombinacions es poden detectar més fàcilment. La unitat de distància que utilitzen aquests mapes és el centiMorgan (cM), on 1 cM equival a una freqüència de recombinació de 0,01 i a una distància física mitjana de 1 Mb. L'equivalència entre distància física i genètica depèn de cada cromosoma i de cada regió cromosòmica, ja que existeixen punts calents (*hot spots*) de recombinació on la distància genètica és força més gran que la física. Mentre que la distància física és la mateixa entre homes i dones, la distància genètica és variable. Els cromosomes femenins tenen més recombinació que els masculins excepte als telòmers, on el fenomen succeeix a l'inrevés. Les bases moleculars d'aquests fenòmens encara no es coneixen (Laurie i Hulten, 1985). Els mapes de lligament genètic han estat molt útils, ja que han permès la localització de gens implicats en malalties abans que

aquests no fossin identificats, facilitant l'estudi genètic de les malalties i l'assessorament genètic. S'han construït molts mapes de lligament del HSA21 (McInnis i col., 1993; Bosch i col., 1994; Buetow i col., 1994; Gyapay i col., 1994; Cox i col., 1994), essent el més complet el de Cox i col. (1994).

Mapes de clons solapats

Per a la seqüenciació de tot el genoma i en concret del HSA21, és indispensable disposar de tot el DNA genòmic en fragments contigus i solapats (*contigs*). Per a clonar fragments grans de DNA genòmic s'han utilitzat els YACs (cromosomes artificials de llevat, *yeast artificial chromosomes*), els quals poden contenir inserts de 100 a 2.000 kb i tenen el gran avantatge que permeten obtenir un mapa sencer amb molt pocs clons, si es compara amb els plasmidis i els cosmidis (Nizetic i col., 1991). El mapa de YACs del HSA21 més complet és el que va construir el CEPH/Généthon a partir d'una línia d'híbrids somàtics que contenia com a únic cromosoma humà el 21. Per a aïllar els clons específics del HSA21 es van utilitzar les seqüències repetitives *Alu* que són específiques del genoma humà i estan altament representades (cada 4 kb com a mitjana). Mitjançant aquesta estratègia es va construir el primer mapa de clons solapats del HSA21 (Chumakov i col., 1992a) i, juntament amb el mapa del cromosoma Y, van ser els dos primers mapes cromosòmics sencers d'aquestes característiques. El gran inconvenient del clonatge en YACs és l'alta freqüència de clons que contenen fragments de DNA inserit no contigus (YACs quimèrics) o que tenen reordenaments produïts durant el seu creixement reiterat (Schlessinger, 1990). Per aquest motiu, s'han generat posteriorment altres vectors de clonatge per a fragments de DNA, que sense ser tan grans com els YACs, són més estables: els PACs (cromosomes artificials de P1, *P1 artificial chromosomes*) i els BACs (cromosomes artificials bacterians, *bacterial artificial chromosomes*). Aquests darrers vectors també han facilitat la tasca de subclonar els YACs en vectors més petits, de manera que els mapes han pogut ser cada vegada més precisos i detallats. També han estat de gran importància els mapes de cosmidis que han facilitat l'estudi de regions específiques del cromosoma (Nizetic i col., 1994; Guimerà i col., 1997).

Mapes transcripcionals

Aquests són els mapes de creació més recent ja que estan basats en el progrés en la identificació de gens i la seva localització en els mapes esmentats anteriorment. Els mapes transcripcionals es basen en la identificació de seqüències codificants mitjançant diverses estratègies: la selecció de DNA complementari (*cDNA selection*) (Lovett i col., 1991), captura d'exons (*exon trapping*) (Buckler i col., 1991), la identificació d'illes CpG (*CpG islands*) (Estivill i Williamson, 1987; Sargent i col., 1990) o l'amplificació d'exons mitjançant *Alu*-PCR (Fuentes i col., 1995, 1997). Les seqüències codificants (ESTs, *Expressed Sequenced Tagged*) que s'han identificat al HSA21 mitjançant aquestes tècniques superen el miler. De tota manera, encara és necessari disposar de tota la seqüència del HSA21, ja que facilitarà la identificació de tots els gens del HSA21, directament o mitjançant els programes d'ordinador per a la predicció de gens, estratègia que es coneix amb el nom de *in silico*.

MAPA FENOTÍPIC DE LA SÍNDROME DE DOWN

Les trisomies parcials del HSA21 inclouen les duplicacions intersticials d'aquest cromosoma, les translocacions que impliquen només el HSA21 i les translocacions entre el HSA21 i qualsevol dels altres cromosomes humans. Aquests reordenaments cromosòmics es tradueixen en la presència per triplicat de determinats segments del HSA21. Aquest tipus de trisomia del HSA21 ha permès la definició de regions del HSA21 associades a determinats trets fenotípics de la SD. Les trisomies parcials del HSA21 impliquen que determinats gens han de ser els responsables directes de determinats trets clínics de la SD. Aula i col. (1973), en les descripció dels primers casos van proposar que la part distal del HSA21 en trisomia és indispensable per a produir el fenotip de la SD, mentre que les regions més proximals en trisomia, s'associen a alteracions clíniques que mostren molts, però no tots, els trets de la SD i un retard mental més lleu. En una publicació d'un

cas de trisomia parcial del HSA21 i SD, Niebuhr (1974), va proposar que la banda 21q22 en trisomia era “patogènica” per a la SD i la va anomenar Regió Crítica per a la Síndrome de Down (*Down Syndrome Critical Region* o DSCR). Posteriorment, aquesta hipòtesi va ser defensada, entre d’altres, per Summitt el 1981, qui demostrava que la presència en trisomia de la banda 21q22 resultava en un fenotip compatible amb la SD. El 1989 McCormick i col.laboradors, mitjançant la utilització de polimorfismes i/o l’anàlisi de dosi en 16 pacients estudiats citogenèticament, amb o sense trisomia parcial del HSA21, amb o sense un fenotip de SD, van postular que la regió entre els marcadors *D21S13* i *D21S58* podia quedar exclosa de la participació en el fenotip final de la SD i que la regió que realment contribuïa al fenotip era la regió compresa entre el marcador *D21S55* i el telòmer. Delabar i col. (1993) van descriure el primer mapa fenotípic del HSA21 (tot i que el terme no va ser introduït fins més tard), construït a partir de l’estudi de 10 pacients amb la SD i trisomia parcial del HSA21 (Fig. 3). Aquest estudi refermava la hipòtesi de l’existència i importància de la regió crítica i la definia entre els marcadors *D21S55* i el marcador *MX1*. De manera inversa, excloïa les regions proximal (del pter fins el marcador *D21S54*) i distal (des del marcador *PFKL* fins *S100B*) de qualsevol participació en el fenotip final de la SD. Un any més tard, Korenberg i col. (1994) van descriure per primera vegada un mapa fenotípic de la SD basat en 16 casos de SD deguts a diferents trisomies parcials del HSA21. Aquest estudi sobre les trisomies parcials, realitzat mitjançant les tècniques de *Southern blot* i FISH, així com l’anàlisi de 25 trets fenotípics típics dels pacients, va qüestionar seriosament la hipòtesi formulada per Niebuhr (1974). Aquests autors van determinar que els trets fenotípics: facies característica, microcefàlia, estatura baixa, hipotonia, dermatoglfis anòmals i retard mental, estaven fora de la regió crítica i que per tant, hi hauria una contribució important de gens fora de la regió crítica al fenotip de la SD. Aquest estudi també va qüestionar seriosament el treball publicat per Delabar i col. (1993), argumentant que 9 dels 10 pacients estudiats per Delabar i col. presentaven una trisomia parcial que incloïa el marcador *D21S55* (Fig. 3).

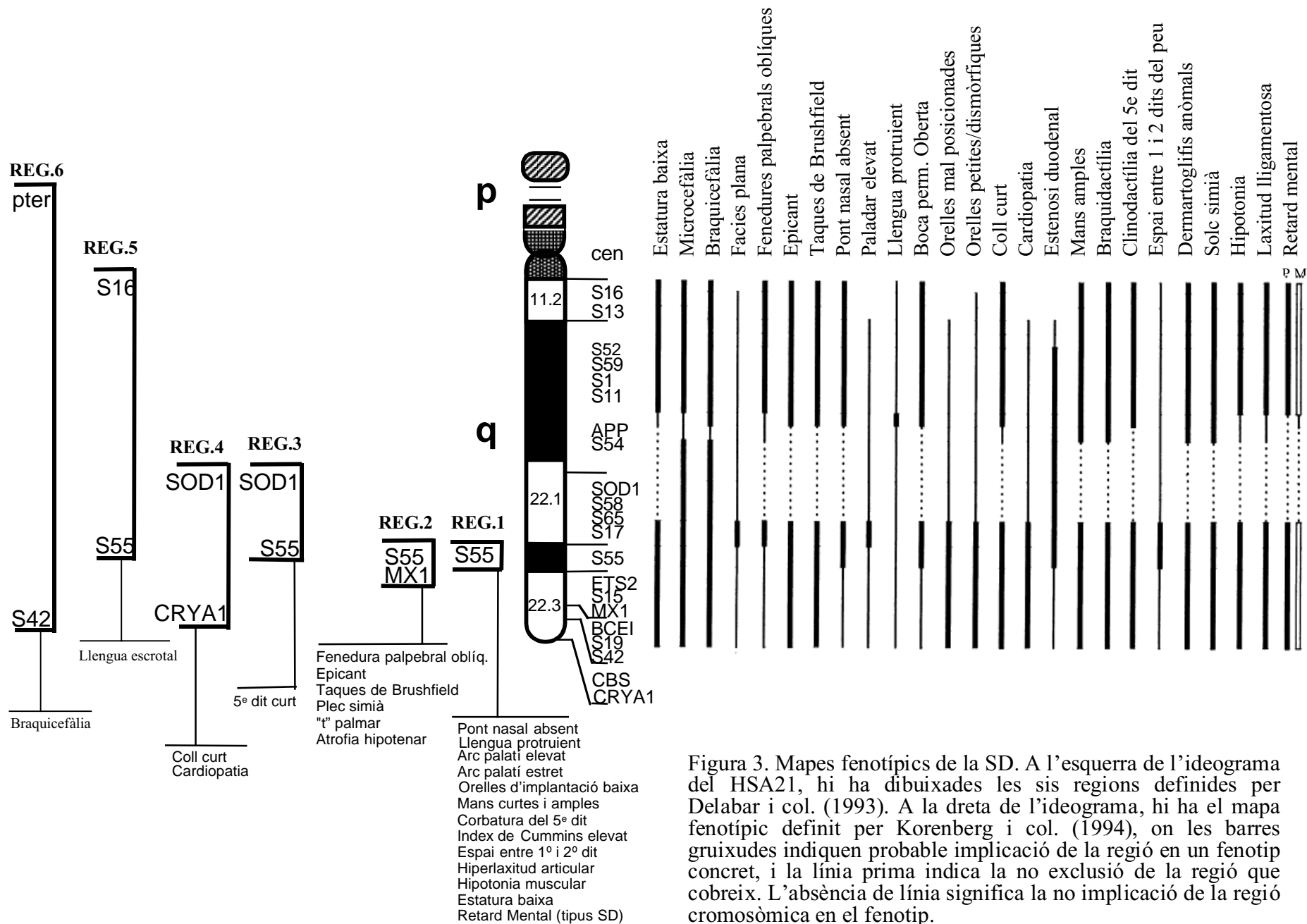


Figura 3. Mapes fenotípics de la SD. A l'esquerra de l'ideograma del HSA21, hi ha dibuixades les sis regions definides per Delabar i col. (1993). A la dreta de l'ideograma, hi ha el mapa fenotípic definit per Korenberg i col. (1994), on les barres gruixudes indiquen probable implicació de la regió en un fenotip concret, i la línia prima indica la no exclusió de la regió que cobreix. L'absència de línia significa la no implicació de la regió cromosòmica en el fenotip.

El terme “regió crítica de la SD” ha quedat, probablement obsolet. L’únic punt en el qual hi ha un acord total és en descartar que la trisomia parcial del braç curt del HSA21 tingui cap conseqüència fenotípica.

Actualment es coneixen a tot el món una cinquantena de casos de trisomies parcials del HSA21, de les quals només una minoria impliquen exclusivament el HSA21. El 1996 J. Delabar va crear una base de dades (<http://www.infobiogen.fr/services/aneu21/>) amb l’objectiu de recollir tots els casos descrits d’aneuploïdies parcials del HSA21, tant les monosomies com les trisomies parcials. Aquesta base de dades posa a l’abast de tothom la caracterització clínica i molecular, segons uns paràmetres molt concrets (els primers basats en el protocol d’Epstein del 1991) de casos de SD deguts a trisomies parcials del HSA21. Iniciatives com aquesta han de permetre establir les correlacions entre el fenotip i el genotip, i arribar a la definició estricta de la contribució de cadascun dels gens del HSA21 al fenotip de la SD. Actualment aquesta base de dades recull 52 casos, 34 dels quals són trisomies parcials del HSA21.

L’estudi de les trisomies parcials i les possibles correlacions genotip-fenotip ha dividit l’opinió dels científics del camp en dos grups. Un grup defensa que el fenotip de la SD no depèn de la sobreexpressió dels gens del HSA21, sinó que depèn del desequilibri que produeix la presència de material genètic en excés durant el desenvolupament (hipòtesi de la “*amplified developmental instability*”). El segon grup defensa que la sobreexpressió de cadascun dels gens del HSA21 és directament i individual responsable del fenotip final de la SD (hipòtesi del “*gene dosage effect*”).

GENS I SEQÜÈNCIES DEL CROMOSOMA 21

El projecte de seqüenciació del HSA21 ha estat recentment acabat (Hattori i col., 2.000). Aquesta tasca ha estat duta a terme bàsicament per dos grups de recerca, el consorci alemany amb base a Jena (també inclou el centre Max Planck de Berlin) i el grup japonès de Tokio (Keio). Aquests dos grups es van repartir la

seqüenciació del HSA21 en les regions que s'indiquen a la figura 4. D'acord amb les previsions que es van fer a l'últim congrés internacional del HSA21 (Israel, juny de 1.999), s'ha acabat gairebé tota la seqüenciació i només queden alguns forats. D'altra banda, la cerca de gens al HSA21 s'ha accelerat molt gràcies a la seqüència dipositada a les bases de dades, que permet la predicció de gens *in silico* i a les noves tècniques de clonatge de gens. Inicialment, es va fer una predicció de 500 a 1.000 gens ubicats a 21q. A mesura que ha anat avançant el coneixement molecular del HSA21 s'ha vist que la previsió s'havia fet en base a una densitat gènica alta, que no es dona al llarg de tot el HSA21. S'ha arribat finalment a un consens entre els valors més alts que prediuen al voltant de 700 gens i les previsions més baixes que donen un valor de 250. Actualment, hi ha recollits 127 gens, 3 pseudogens i 4 gens putatius a la base de dades del GDB (Genome DataBase, <http://www.gdb.dkfz-heidelberg.de>) (Taula 6). La predicció feta pel Consorci de seqüenciació del HSA21 és de 127 gens, 59 pseudogens i 98 gens predits (Hattori i col., 2000), el que implica un total de 225 gens.

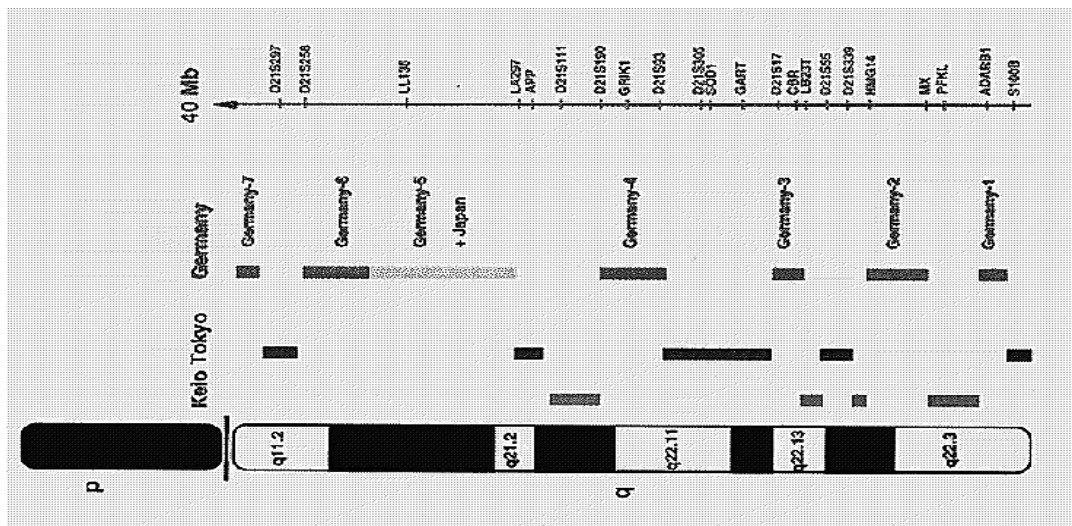


Figura 4. Repartiment de les regions per seqüenciar del HSA21 entre els grups japonès i alemany.

Taula 6. Gens identificats al cromosoma 21, segons el *Genome Database***Genes on Chromosome 21**

Last Updated: Sun Aug 30 23:35:02 EDT 2000

* after the Cytogenetic Location indicates HUGO approval

Symbol	Aliases	Accession ID	Cytogen. Location
ABCG1	ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 1/ WHITE1/ white (Drosophila) homolog 1, ATP binding cassette transporter superfamily/ ABC8/ WHITE	GDB:717078	21q22.3-21q22.3*
ACTL5	ACTFIB/ actin-like 5	GDB:135326	21q-21q*
ADARB1	adenosine deaminase, RNA-specific, B1 (homolog of rat RED1)	GDB:3929206	21q22.3-21q22.3
AIRE	APECED/ autoimmune regulator (autoimmune polyendocrinopathy candidiasis ectodermal dystrophy)/ autoimmune polyendocrinopathy candidiasis ectodermal dystrophy/ PGA1	GDB:567198	21q22.3-21q22.3*
APP	Hs.74600/ AD1/ amyloid beta (A4) precursor protein (protease nexin-II, Alzheimer disease)	GDB:119692	21q21.2-21q21.2*
ASNSL2	asparagine synthetase-like 2	GDB:119708	21pter-21q21*
ATP5O	Hs.76572/ OSCP/ ATPO/ ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F1 complex, O subunit (oligomycin sensitivity conferring protein)	GDB:545472	21q22.1-21q22.2*
B3GALT5	UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,3-galactosyltransferase, polypeptide 5	GDB:9956292	21q22.3-21q22.3
BACE2	Asp1/ beta-site APP-cleaving enzyme 2	GDB:9989909	21q22-21q22.3
BACH1	BTB and CNC homology, basic leucine zipper transcription factor 1	GDB:9836135	21q22.1
BAS	Beta-adrenergic stimulation, response to	GDB:9954614	21pter-21qter
BTG3	ANA/ abundant in neuroepithelium area	GDB:9958636	21q11.2-21q21.1
C21ORF1	chromosome 21 open reading frame 1	GDB:9032971	21q22.3
C21ORF2	chromosome 21 open reading frame 2	GDB:9083506	21q22.3
C21ORF5	KIAA0933/ chromosome 21 open reading frame 5	GDB:9958546	21q22.2
C21orf3	chromosome 21 open reading frame 3	GDB:9834783	21q22.3
C21orf4	chromosome 21 open reading frame 4/ chromosome 21 open reading frame 1	GDB:9834785	21q22.1
CBFA2	Hs.99914/ AML1/ PEBP2A2/ core-binding factor, runt domain, alpha subunit 2 (acute myeloid leukemia 1; aml1 oncogene)/ Hs.99862	GDB:128313	21q22.1-21q22.2* 21q22.3
CBR1	CBR/ carbonyl reductase 1/ Hs.88778/ carbonyl reductase (NADPH)	GDB:126610	21q22.3* 21q22.12
CBR3	carbonyl reductase 3	GDB:9785817	21q22.2
CBS	Hs.84152/ cystathionine-beta-synthase	GDB:119754	21q22.3-21q22.3*
CHAF1B	CAF1A/ CAF1A-LSB/ chromatin assembly factor 1, p60	GDB:728461	21q22.3*

	subunit7 CAF1P60		
CHD2	chromodomain helicase DNA binding protein 2	GDB:9837217	15q26-15q26 21pter-21qter
CNN2	calponin 2	GDB:3789433	21q11.1
COL18A1	Hs.78409/ collagen, type XVIII, alpha 1	GDB:138752	21q22.3*
COL6A1	Hs.3283/ collagen, type VI, alpha 1	GDB:119065	21q22.3*
COL6A2	Hs.628/ collagen, type VI, alpha 2	GDB:119793	21q22.3*
COLOT1	KGC1/ collagen (type VI, alpha 1), overlapping transcript 1	GDB:9957699	21q22.3
CRYAA	Hs.81923/ CRYA1/ crystallin, alpha A	GDB:119074	21q22.3*
CRYZL1	crystallin, zeta (quinone reductase)-like 1	GDB:9958502	21q22.1
CSTB	STFB/ EPM1/ cystatin B (stefin B)/ CST6/ PME/ epilepsy, progressive myoclonic 1 (Unverricht-Lundborg type)	GDB:5215249	21q22.3
CTBP2	C-terminal binding protein 2	GDB:6837517	21q21.3
D21S2056E	DNA segment on chromosome 21 (unique) 2056 expressed sequence/ NNP-1/ NOP52	GDB:9964096	21q22.3-21q22.3
DCR	Down syndrome chromosome region/ DSCR	GDB:125354	21q22.2-21q22.3*
DCRA	Down syndrome critical region protein A	GDB:9956261	21q22.2
DCRB	Down syndrome critical region protein B	GDB:9955858	21q22.2
DSCAM	Down syndrome cell adhesion molecule/ CHD2-42/ CHD2-52	GDB:6887019	21q22.2-21q22.3
DSCR1	Down syndrome candidate region 1/ near DSCR proline-rich protein	GDB:731000	21q22.1-21q22.2*
DSCR2	LRPC21/ C21-LRP/ Down syndrome critical region gene 2	GDB:9956047	21q22.3
DYRK1A	DYRK/ DYRK1/ MNBH/ dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation regulated kinase7 MNB/ minibrain (Drosophila) homolog/ Hs.103125	GDB:1297921	21q22.1-21q22.2
ERG	v-ets avian erythroblastosis virus E26 oncogene related	GDB:119884	21q22.2* 21q22.3
ETS2	Hs.85146/ v-ets avian erythroblastosis virus E2 oncogene homolog 2	GDB:119888	21q22.3*
FDXP2	ferredoxin pseudogene 2	GDB:128220	21pter-21qter*
FPDMM		GDB:9954610	21q22.1-21q22.2
GABPA	GA-binding protein transcription factor, alpha subunit (60kD)/ Hs.78/ E4TF1A/ E4TF1-60	GDB:138476	21q21-21q22.1* 21q21.2
GART	Hs.82285/ PGFT/ PRGS/ phosphoribosylglycinamide formyltransferase, phosphoribosylglycinamide synthetase, phosphoribosylaminoimidazole synthetase	GDB:119487	21q22.1*
GPXP2	GPXL2/ glutathione peroxidase pseudogene 2	GDB:120629	21pter-21qter*
GRIK1	GLUR5/ glutamate receptor, ionotropic, kainate 1	GDB:131462	21q22.1-21q22.2*
HLCS	Hs.79375/ HCS/ holocarboxylase synthetase (biotin-[propionyl-Coenzyme A-carboxylase (ATP-hydrolysing)] ligase)	GDB:392648	21q22.1* 21q22.2
HMG14	high-mobility group (nonhistone chromosomal) protein 14	GDB:118809	21q22.3*

HRMT1L1	HMT1 (hnRNP methyltransferase, <i>S. cerevisiae</i>)-like 1/ PRMT2	GDB:3929213	21q22.3
HSPA3	heat shock 70kD protein 3	GDB:120060	21pter- 21qter*
HTOR	5-hydroxytryptamine (serotonin) oxygenase regulator	GDB:119324	21pter- 21qter*
IFNAR1	IFRC/ IFNAR/ interferon (alpha, beta and omega) receptor 1	GDB:120078	21q22.1*
IFNAR2	interferon (alpha, beta and omega) receptor 2/ Hs.86958/ IFNABR	GDB:568494	21q22.1*
IFNGR2	IFNGT1/ interferon gamma receptor 2 (interferon gamma transducer 1)	GDB:142306	21q22.1 21pter- 21qter*
IL10RB	CRFB4/ interleukin 10 receptor, beta/ Hs.46437/ CRF2-4/ cytokine receptor family II, member 4	GDB:138168	21q22.1- 21q22.2*
ITGB2	integrin, beta 2 (antigen CD18 (p95), lymphocyte function- associated antigen 1; macrophage antigen 1 (mac-1) beta subunit)/ MF17/ CD18/ LFA-1	GDB:120574	21q22.3- 21q22.3*
ITSN	SH3D1A/ SH3 domain protein 1A/ SH3P17	GDB:6054184	21q22.2*
KCNE1	potassium voltage-gated channel, Isk-related family, member 1/ minK/ ISK	GDB:127909	21q22.1
KCNE2	LQT5/ LQT6/ MIRP1/ potassium voltage-gated channel, Isk- related family, member 2	GDB:9958562	21q22.2
KCNJ15	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 15/ Kir4.2/ Kir1.3/ KCNJ14-PEN	GDB:6275865	21q22.1* 21q22.2
KCNJ6	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 6/ KCNJ7/ GIRK2/ KATP2/ BIR1/ Kir3.2/ Hs.11173	GDB:547949	21q22.3
KNP-I	D21S2048E/ HES1/ GT335/ Keio novel protein-I/ ES1 (zebrafish) protein, human homolog of/ ES1/ KPNI	GDB:5887108	21q22.3*
LSS	lanosterol synthase (2,3-oxidosqualene-lanosterol cyclase)/ OSC	GDB:642229	21pter- 21qter*
MACSL1	myristoylated alanine-rich protein kinase C substrate (MARCKS, 80K-L)-like 1	GDB:128136	21-21
MCM3AP	NONE/ MAP80/ KIAA0572/ minichromosome maintenance deficient (<i>S. cerevisiae</i>) 3-associated protein	GDB:9957540	21q22.3*
MX1	Hs.76391/ IFI-78K/ myxovirus (influenza) resistance 1, homolog of murine (interferon-inducible protein p78)/ MxA	GDB:120206	21q22.3*
MX2	Hs.926/ myxovirus (influenza) resistance 2, homolog of murine	GDB:120207	21q21- 21q21
NCAM2	neural cell adhesion molecule 2	GDB:6053726	21q22
NDUFA6	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 6 (14kD, B14)/ B14	GDB:3842946	21q22.3
NDUFV3	NADH dehydrogenase (ubiquinone) flavoprotein 3 (10kD)	GDB:383640	21pter- 21qter*
NF1L1	neurofibromin 1-like 1	GDB:216191	21q11- 21q11.2
NRIP1	nuclear receptor interacting protein 1/ RIP140	GDB:9900364	21q22.3*
PCNT	PCN/ pericentrin	GDB:555937	21q22.2- 21q22.3
PCP4	Purkinje cell protein 4/ PEP-19	GDB:6233541	21q22.3
PDXK	PKH/ pyridoxal (pyridoxine, vitamin B6) kinase	GDB:9955650	21q22.3*
PFKL	Hs.100005/ phosphofructokinase, liver	GDB:120276	21q22.3

PKNOX1	PBX/knotted 1 homeobox 1/ PREP1	GDB:5914719	21pter-21qter*
PNY1	protein spot in 2-D gels (82kD)	GDB:119500	21pter-21qter*
PNY2	protein spot in 2-D gels (65kD)	GDB:119501	21pter-21qter*
PNY3	protein spot in 2-D gels (33kD)	GDB:119502	21pter-21qter*
PNY4	protein spot in 2-D gels (72kD)	GDB:119503	21pter-21qter*
PNY5	protein spot in 2-D gels (40kD)	GDB:119504	21pter-21qter*
PRKCM	Hs.2891/ PKCM/ protein kinase C, mu	GDB:330794	21q21-21q21*
PRSS7	protease, serine, 7 (enterokinase)/ Hs.3113	GDB:384083	21q22.3
PWP2H	PWP2 (periodic tryptophan protein, yeast) homolog/ PWP2/ EHOc-17	GDB:1220218	21-21
RACK17	protein kinase C-binding protein	GDB:9955713	21p12-21p12*
RNR4	RNA, ribosomal 4	GDB:119558	21q22.3*
S100B	S100 calcium-binding protein, beta (neural)	GDB:120360	21pter-21qter*
S14	surface antigen (chromosome 21)	GDB:119584	21q22.3
SH3BGR	SH3 domain binding glutamic acid-rich protein	GDB:4164549	21q22.2*
SIM2	SIM/ single-minded (Drosophila) homolog 2	GDB:642106	21q22.3*
SLC19A1	Hs.84190/ FOLT/ solute carrier family 19 (folate transporter), member 1/ homologue of mutant Chinese hamster cell methotrexate uptake deficiency/ REFC/ Reduced Folate Carrier/ RFC1/ CHMD	GDB:454112	21q22-21q22
SLC5A3	solute carrier family 5 (inositol transporter), member 3/ SMIT	GDB:373217	21q-21.22.3
SMT3H1	SMT3 (suppressor of mif two 3, yeast) homolog 1/ SMT3A	GDB:5752861	21q22.1*
SOD1	Hs.75428/ ALS/ ALS1/ superoxide dismutase 1, soluble (amyotrophic lateral sclerosis 1 (adult))	GDB:119596	21q22.1-21q22.2*
SON	Hs.92909/ DBP-5/ SON DNA-binding protein	GDB:331317	21q11.1*
STCH	stress 70 protein chaperone, microsome-associated, 60kD	GDB:358960	21q11.2
TAM	MST/ Myeloproliferative syndrome, transient (transient abnormal)	GDB:9958709	21q22.3*
TFF1	D21S21/ Hs.1406/ BCEI/ HPS2/ trefoil factor 1 (breast cancer, estrogen-inducible sequence expressed in)	GDB:119722	21q22.3
TFF2	SML1/ trefoil factor 2 (spasmolytic protein 1)/ spasmolytic protein 1	GDB:128989	21q22.3
TFF3	trefoil factor 3 (intestinal)/ Hs.82961/ HITF	GDB:629964	21q22.1*
TIAM1	Hs.3205/ T-cell lymphoma invasion and metastasis 1	GDB:386213	21q22.3
TMEM1	transmembrane protein 1/ EHOc-1	GDB:1320385	21q22.3
TMPRSS2	transmembrane protease, serine 2/ PRSS10	GDB:6065016	21q11-21q11
TPTE	transmembrane phosphatase with tensin homology	GDB:9835136	21q22.2
TTC3	tetratricopeptide repeat domain 3/ TPRD/ TPRDI/ DCRR1/ TPRDII/ TPRDIII	GDB:9834163	21q22.3*
U2AF1	U2AF35/ RNU2AF1/ U2(RNU2) small nuclear RNA auxillary	GDB:392758	21q22.3

	factor 1 (non-standard symbol)		
UBE2G2	ubiquitin-conjugating enzyme E2G 2 (homologous to yeast UBC7)/ UBC7	GDB:9597646	21pter-21qter
UBE3AP2	ubiquitin protein ligase E3A pseudogene 2	GDB:6276489	21q21-21q21
USP16	UBP-M/ ubiquitin specific protease 16	GDB:9957973	10q22-10q22 21pter-21qter
VDAC2	voltage-dependent anion channel 2/ Hs.78902	GDB:138281	21q22.3
WRB	tryptophan rich basic pteoin	GDB:6380716	

Recentment, el nostre grup ha identificat dos gens del HSA21 que encara no figuren en la base de dades de la taula 6. Els gens que caldria afegir són: *ADAMTS1* (K. Casas, comunicació personal) i *G3P* (A. Solans, comunicació personal).

MODELS MURINS PER A L'ESTUDI DE LA SÍNDROME DE DOWN

No existeix cap model animal que reproduïxi exactament els processos de desenvolupament i malalties que es donen als humans. Els models de mamífers són aquells que comparteixen més similituds biològiques amb els humans i en aquest aspecte, serien els més escaients. S'han trobat primats amb un equivalent genètic i clínic de la trisomia del HSA21 i de la SD (McClure i col., 1969; Andrieu i col., 1979), però aquests animals presenten gairebé les mateixes limitacions que els estudis en humans pel que fa als objectius de la recerca. El ratolí s'ha convertit així, en el model animal triat, ja que es manipula fàcilment, se'n pot fer un control genètic i presenta similituds amb els processos humans de morfogènesi, probablement en la funció del sistema nerviós central, així com en els aspectes neurobiològics i potser fins i tot psicològics (Epstein, 1995). Per altra banda, malgrat els reordenaments del genoma de mamífers, determinades regions cromosòmiques resten intactes i estructuralment semblants entre el ratolí i l'home (Nadeau i col., 1984). Però els models murins també tenen les seves limitacions, ja que reordenaments que impliquen un gran desequilibri de material genètic, solen ser inviables després del naixement. També s'ha de considerar que la valoració dels aspectes cognitius és diferent en l'home que en el ratolí, essent impossible definir un retard mental, ja que aspectes com el llenguatge no són valorables. Existeixen diverses estratègies per a modelar la SD al ratolí: 1/ els models trisòmics que contenen tot o part del MMU16 en trisomia i que constituïran el model més complet de la síndrome. Aquests models són útils per a dur a terme assajos terapèutics o per a l'aplicació d'estratègies sostractives. 2/ Els models transgènics que sobreexpressen un únic gen. No es poden considerar estrictament un model de SD però permeten en alguns casos, la dissecció de la participació d'aquest gen en el fenotip de SD. 3/ Llibreries *in vivo* que permeten determinar el paper de la sobreexpressió conjunta d'un grup de gens (Smith i col., 1995).

RATOLÍ TRISÒMIC PER AL CROMOSOMA 16 MURÍ (Ts16)

El cromosoma 16 de ratolí (MMU16) no és totalment homòleg al HSA21 humà, entre d'altres raons perquè és força més llarg que l'humà (un 35% més llarg) i perquè gens del cromosoma 16 de ratolí estan localitzats en altres cromosomes humans (el 3, el 8, el 16 i el 22). A més, no tots els gens del HSA21 humà mapen al cromosoma 16 de ratolí (Davisson i col., 1990), sinó que també hi ha gens al MMU17 i al MMU10 (Fig. 5). D'aquesta manera, la trisomia del cromosoma 16 del ratolí, no és només una possible rèplica de la trisomia del HSA21 humà, sinó que representa un desequilibri genètic més extens que en la trisomia 21 humana. Aquests ratolins trisòmics pel MMU16 es generen a partir de mascles portadors d'una translocació Robertsoniana heterozigota del cromosoma 16. Generalment, aquests animals comencen a morir *in utero* a partir del catorzè dia de gestació, però n'hi ha que sobreviuen més enllà, però sense arribar a terme. El fenotip d'aquests ratolins presenta alguns trets que són característics de la SD. La meitat dels fetus estudiats presenten coixinets endocàrdics i defectes de l'arc aòrtic, també mostren retard del desenvolupament del cervell i alteracions craniofacials, entre d'altres. Els defectes immunològics i de les cèl.lules mare totipotents, són, en el cas del ratolí Ts16, molt més greus que en l'humà. A nivell del cervell destaquen la sobreexpressió de l'App i de Gap-43. S'han realitzat estudis de transplantaments de neurones d'aquest ratolí en cervells de ratolí normal, en els quals s'ha trobat que les neurones trisòmiques sobreviuen fins a mesos (Davisson i col., 1990).

Per tal d'evitar el problema que suposa en els estudis fenotípics la mort perinatal del ratolí Ts16, s'han generat ratolins quimèrics, que serien el model murí per als mosaics trisòmics humans. Aquestes quimeres poden contenir fins a un 70% de cèl.lules trisòmiques al cervell, però la representació de la trisomia en altres teixits com el limfàtic, és baixíssima (Cox i col., 1984; Gearhart i col., 1991). Els estudis fets en aquests ratolins han demostrat alteracions conductuals (Epstein i col., 1991b), absència d'anomalies cardíques (Cox i col., 1984; Gearhart i col., 1991), i anomalies neuroquímiques (Gearhart i col., 1991).

RATOLÍ TRISÒMIC PARCIAL Ts65Dn

El 1993 el grup de Davisson i col., van generar un model murí de SD anomenat Ts(17¹⁶)Dn o Ts65Dn. Aquest model, que conté 41 cromosomes enlloc dels 40 normals, es va aconseguir mitjançant la irradiació dels testicles de ratolins normals amb l'objectiu d'aconseguir reordenaments cromosòmics del tipus translocacions que donessin lloc a una descendència trisòmica (mitjançant no-disjunció meiótica) per a algun dels segments genòmics reordenats. La translocació o intercanvi cromosòmic que va donar lloc a aquest model és entre els cromosomes 16 i 17 i es transmet a la descendència en forma de trisomia parcial de la part distal del MMU16. Aquest model de ratolí per a la SD conté en trisomia des de l'equivalent del gen *APP* fins el *MX1* (Fig. 5) i té el gran avantatge, respecte el model Ts16, que és totalment viable i que una gran proporció dels animals viu fins la vellesa. Els estudis que s'han fet fins ara d'aquest ratolí han demostrat que les anomalies macroscòpiques típiques de la SD no es reproduïen en aquest model a nivell cardíac (Montero i col., 1996) o neuropatològic (Megías i col., 1997), però sí que s'ha trobat un dèficit cognitiu (Escorihuela i col., 1995; Reeves i col., 1995; Holtzman i col., 1995, 1996) i alteracions en la memòria de referència i de treball (Escorihuela i col., 1998). El Ts65Dn està essent estudiat a tots els nivells per diversos grups de recerca. Fins ara s'han descrit alteracions en la funcionalitat de les vies de senyalització intracel·lular: adenil ciclasa i fosfolipasa C (Dierssen i col., 1997) i del nombre de neurones al gir dentat de l'hipocamp (Insausti i col., 1998), entre d'altres.

RATOLÍ TRISÒMIC PARCIAL Ts108CJE

Aquest ratolí parcialment trisòmic per al cromosoma 16 murí es va generar espontàniament quan s'intentava obtenir un ratolí mutant per al gen *Sod1* (Sago i col., 1998). Aquest ratolí conté una regió trisòmica més petita que el Ts65Dn, que inclou des de *Sod1* fins *Mx1* i implica una translocació entre els cromosomes murins 12 i 16, i és euploide (Fig. 5). Aquests ratolins també sobreviuen fins l'edat adulta i tampoc no presenten alteracions macroscòpiques. Els estudis conductuals d'aquests ratolins han demostrat que, al contrari dels Ts65Dn, no són

hiperactius i la dificultat d'aprenentatge no és tan marcada com en el Ts65Dn (Sago i col., 1998).

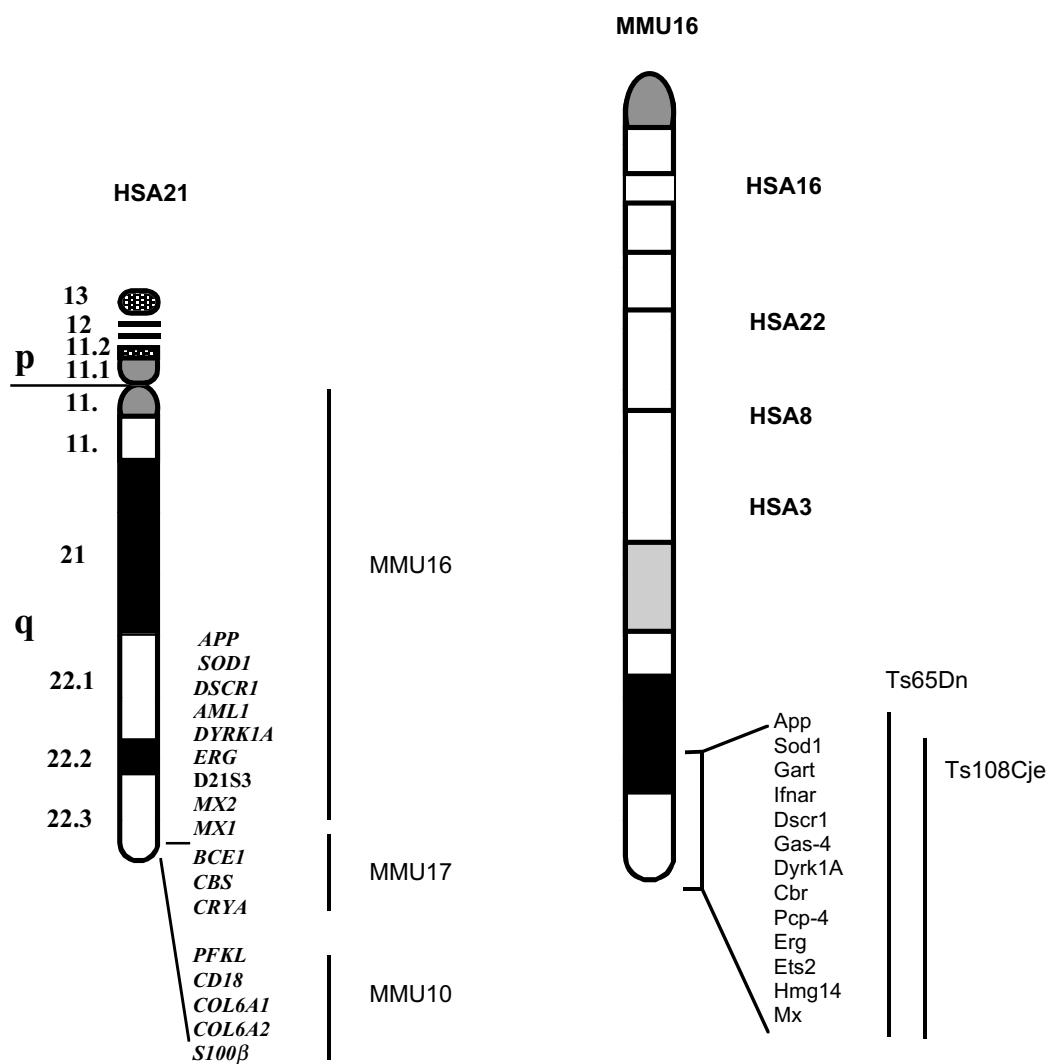


Figura 5. Representació esquemàtica del cromosoma 21 humà (HSA21) i del cromosoma 16 de ratolí (MMU16). S'indiquen les regions de sintènia entre tots dos cromosomes, així com les regions cromosòmiques que abasten els ratolins trisòmics Ts65Dn i Ts108Cje.

RATOLINS TRANSGÈNICS DE SOBREEXPRESSION

La introducció d'un gen (bé sigui amb les seves pròpies regions reguladores, bé amb seqüències promotores heteròlogues que promouen l'expressió en determinats teixits) al genoma del ratolí mitjançant transgènesi, permet avaluar les conseqüències de la seva sobreexpressió *in vivo*. Malgrat que els ratolins transgènics de sobreexpressió de gens individuals no són un model complet de SD, sí que permeten estudiar l'efecte d'aquesta sobreexpressió i la contribució que aquesta té a la fisiopatologia de la SD. Altres limitacions d'aquesta estratègia són la integració a l'atzar del transgen i el nombre de còpies que s'integren. La integració a l'atzar pot causar la interrupció d'un gen endògen i produir un fenotip que no tingui res a veure amb la sobreexpressió del transgen. Generalment, la integració es dona en tàndem, en un nombre variable de còpies i en un locus únic, però en alguns casos es pot produir la integració en dos loci, els quals s'hauran de segregar posteriorment a base de creuaments. Per tal d'evitar aquests problemes, cal produir diverses línies transgèniques per a cada gen.

El primer ratolí transgènic que es va generar per a l'estudi de la SD va ser per al gen *SOD1* humà, el qual codifica una proteïna que està implicada en els processos metabòlics oxidatius dels radicals lliures (Epstein i col., 1987). Aquest ratolí, si bé a nivell macroscòpic és normal, presenta alguns trets típics de la SD, com són anomalies en les unions neuromusculars i nivells plasmàtics disminuïts de serotonina (revisat en Groner, 1995). S'han generat ratolins transgènics per a altres gens del HSA21 humà: *Ets2* que presenta anomalies esquelètiques (Sumarsono i col., 1996), *APP* (Games, 1995; Hsiao i col., 1996; Sturchler-Pierrat i col., 1997), *PFKL* (Elson i col., 1994a), *S100 β* (Gerlai i col., 1994), *Sim2* (Ema i col., 1999), *DSCR1* (Grup de Recerca de la SD-IRO, dades no publicades) i *Dyrk1A* (Grup de Recerca de la SD-IRO, dades no publicades). S'han generat altres models transgènics mitjançant l'utilització de YACs com a transgens, estratègia que té l'avantatge de poder introduir el gen amb les seves seqüències reguladores i que se sol integrar en un nombre més reduït de còpies que els transgens més curts, encara que suposa una certa dificultat mecànica per a introduir i integrar un fragment molt gran de DNA. S'han generat el que

s'anomenen llibreries *in vivo* utilitzant YACs solapats de la regió 21q22.2 (Smith i col., 1995). L'estudi fenotípic ha revelat fins ara, una alteració cognitiva (aprenentatge i memòria) en el transgènic del YAC 152f7 que conté el gen *DYRK1A* i en el transgènic del YAC 230e8 (Smith i col., 1997).

RATOLINS TRANSGENÒMICS O TRANSCROMOSÒMICS

Els esforços per a generar models animals per a la SD també s'han concentrat en soques de ratolí que incorporin segments de HSA21 humana obtingut de línies d'híbrids somàtics (Tomizuka i col., 1997). Més recentment, s'han generat ratolins trisòmics parcials pel HSA21 a partir de segments generats per radiació i introduïts en les cèl·lules totipotents embrionàries (Hernández i col., 1999). El gran avantatge d'aquesta estratègia és que els ratolins expressen gens humans.

Els diferents models murins per a la SD s'han de caracteritzar a tots els nivells per tal de poder extreure conclusions més fermes sobre la correlació genotip-fenotip. D'altra banda, s'han de realitzar creuaments entre models trisòmics i models amb el gen anul·lat (*knockout*). Serà molt interessant veure si les funcions dels gens anul·lats poden ser rescatades gràcies a la sobreexpressió d'aquests mateixos gens en els ratolins trisòmics i transgènics. Per altra banda, els fenotips deguts a la trisomia podran ser rescatats mitjançant creuaments amb ratolins heterozigots per a disrupcions en gens específics. Aquests models i creuaments permetran estudiar el problema de la penetració diferent de la trisomia per a gens específics.

HIBRIDACIÓ *IN SITU* DE FLUORESCÈNCIA (FISH)

La tecnologia de FISH es va desenvolupar a mitjans dels anys 80 (Pinkel, 1986) i és una metodologia intermitja entre la citogenètica clàssica (estudis de cariotips construïts a partir de les mides dels cromosomes i del seu patró de bandes G o R) i la genètica molecular. Aquesta tècnica consisteix a marcar amb molècules de biotina o digoxigenina (o directament amb un nucleòtid conjugat a un fluorocrom) un fragment de DNA de la regió genòmica que es vol estudiar i hibridar-lo sobre cromosomes, nuclis interfàsics o teixits, aprofitant l'afinitat de les cadenes de DNA entre elles, després d'un procés de denaturació per calor. Mitjançant incubacions amb anticossos o haptens conjugats a fluorocroms que s'uneixen amb alta afinitat a les molècules incorporades al DNA en el procés del marcatge, s'arriba a l'observació al microscopi de fluorescència. D'aquesta manera es pot localitzar el senyal fluorescent generat per la sonda marcada i hibridada (Fig. 6). L'eficiència de la FISH depèn de factors estrictament tècnics, com són l'astringència dels rentats, el bloqueig de les seqüències repetitives, la mida de la sonda, etc. Aquesta tècnica, a més a més del mapatge cromosòmic de qualsevol tipus de sonda, permet detectar pèrdues o guanys de DNA, reordenaments cromosòmics per petits que siguin i arribar fins el punt de trencament d'aquests reordenaments, amb una eficiència i fiabilitat altíssimes. La FISH ha suposat un gran avenç pel diagnòstic genètic i ha establert el lligam entre dues disciplines històricament distants, la citogenètica i la genètica molecular.

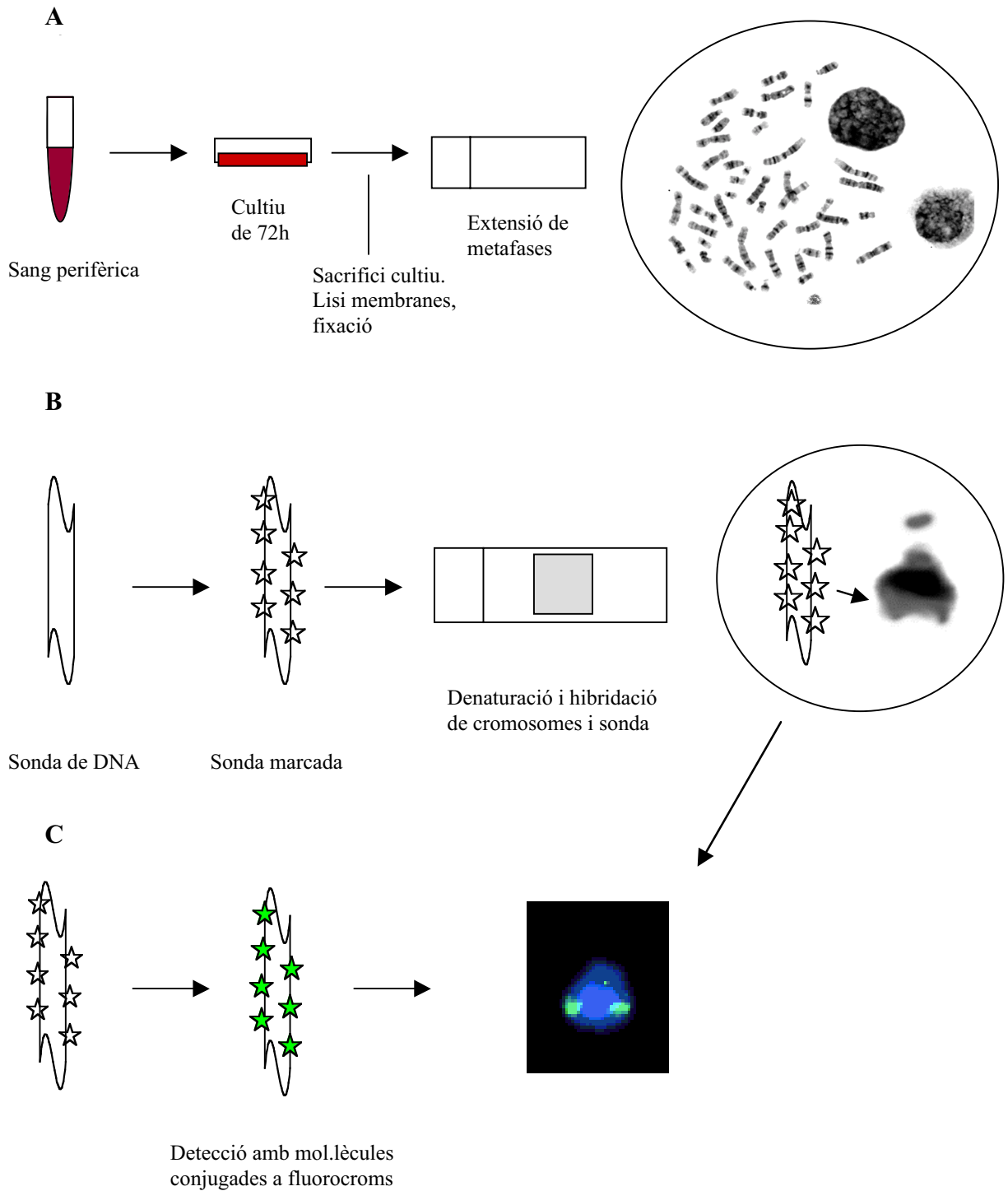


Figura 6. Esquema del procés de FISH des de l'obtenció de metafases a partir de sang perifèrica (A), el procés paral·lel de marcatge de la sonda que es vol estudiar fins la hibridació (B) i la seva detecció (C).

Objectius

L'objectiu principal d'aquest treball ha estat la caracterització dels punts de trencament del HSA21 en pacients amb SD deguda a trisomia parcial d'aquest cromosoma, per a intentar establir una correlació entre el genotip i el fenotip, i contribuir així, al mapa fenotípic de la SD. També ha estat objectiu d'aquest treball utilitzar la FISH per a l'estudi d'alguns models murins de la SD. Els objectius concrets del treball han estat:

1. Selecció de YACs del braç llarg del HSA21 procedents de la col·lecció del CEPH i determinació del seu quimerisme mitjançant FISH.
2. Mapatge dels gens del HSA21 identificats al laboratori en cromosomes humans.
3. Identificació de persones amb SD i cariotip normal o reordenament desconegut i detecció de trisomies parcials del HSA21.
4. Localització dels punts de trencament al HSA21 de les trisomies parcials identificades.
5. Estudi clínic dels pacients amb trisomies parcials del HSA21 segons els protocols d'Epstein i col. (1991) i establiment de les possibles correlacions entre el genotip i el fenotip.
6. Mapatge dels gens del HSA21 identificats al laboratori en cromosomes del ratolí trisòmic parcial Ts65Dn.
7. Aplicació de la FISH al tipatge d'embrions, nounats i teixits del ratolí Ts65Dn.
8. Estudi de la inserció cromosòmica de transgens a les línies de ratolins transgènics de sobreexpressió generats al laboratori.

Materials i mètodes

RECURSOS EXTERNOS

YACS PROCEDENTS DEL CEPH/GÉNÉTHON

El Centre d'Études des Polymorphismes Humains (CEPH)/Généthon posa a l'abast públic un contigu de clons de DNA genòmic clonat en cromosomes artificials de llevat (YAC), que en el seu dia van ser ordenats al braç llarg del HSA21 mitjançant l'estudi de marcadors altament polimòrfics o microsatèl·lits (Bosch i col., 1996) i que prèviament havien estat ordenats els uns respecte els altres mitjançant estudis de lligament (Chumakov i col., 1992a; 1992b).

LÍNIA CEL·LULAR D'HÍBRIDS SOMÀTICS WA17V

Aquesta línia cel·lular de fibroblasts híbrida entre rosegador i humans, que conté com a únic cromosoma humà el HSA21 (Raziuddin i col., 1984), ha estat utilitzada per a generar sondes que cobreixen tot el HSA21 o sondes de pintat cromosòmic.

PANNELL D'HÍBRIDS SOMÀTICS DEL "HUMAN GENETIC MUTANT CELL REPOSITORY" (PANNELL DE NIMGS)

Aquest pannel pos a l'abast de tothom un conjunt de línies cel·lulars (o els seus DNAs) somàtiques híbrides rosegadors/humans cadascuna de les quals conté un (o màxim dos) cromosomes humans (Drwinga i col., 1993). Aquest pannel s'ha fet servir per a amplificar el DNA de cromosomes sencers humans mitjançant el mètode *Alu*-PCR amb l'objectiu de generar sondes de pintat cromosòmic.

MÈTODES GENERALS

PREPARACIÓ DE LES SONDES

Creixement i obtenció de DNA de la línia WA17

Aquesta línia es fa créixer a 37°C i 5% de CO₂ en medi de cultiu DMEM (GIBCO, 41966-029) suplementat amb 10% de sèrum fetal boví (FBS). Les cèl.lules són adherents i es tripsinitzen quan arriben a la confluència.

Extracció de DNA

Un cop s'ha tripsinitzat el cultiu confluent, es compten les cèl.lules en una càmera de Neubauer i a continuació, el protocol que es segueix és de tractament amb proteïnasa K (Sigma) per a trencar les membranes, extracció de proteïnes mitjançant fenol/cloroform (Sigma) i precipitació en etanol. El protocol detallat és el que es dona a continuació:

- Es resuspenen les cèl.lules tripsinitzades en PBS estèril
- Es centrifuga a 1730xg durant 5 min
- El sediment es resuspen en 1ml de SET 1X per cada 5 milions de cèl.lules
- S'afegeixen 20 µl/ml de proteïnasa K (10 mg/ml) i s'incuba 2 h a 60°C amb agitació
- S'afegeixen 20 µl/ml de 5 M NaCl. Es barreja
- S'extreu el DNA amb fenol/cloroform
- Les dues fases es separen centrifugant a 1730xg durant 30 min. Es recull la fase superior
- Es precipita amb d'etanol absolut
- Es centrifuga a 1730xg durant 20 min
- Es resuspen el sediment en TE 1h a 37°C
- Es llegeix la concentració a l'espectrofotòmetre (D.O.₂₆₀>1.5)

SET 10X

100 mM Tris-HCl, pH 7.8

10% (p/v) SDS

50 mM EDTA, pH 8

S'ajusta el pH a 7.8 i la solució es guarda a temperatura ambient

PBS

10 mM tampó fosfat a pH 7.4

2.7 mM KCl

137 mM NaCl

Obtenció de DNA de YACs

Per tal d'obtenir el DNA dels YACs, s'ha fet servir una modificació del mètode descrit per Overhauser i Radic (1987) pel qual el DNA del YAC s'encapsula en boletes d'agarosa.

Els YACs del CEPH es sembren a partir d'un cultiu sòlid o de glicerol en una placa de petri amb medi AHC i s'incuben a 30°C durant 48 h. Els llevats que contenen el cromosoma artificial tenen una tonalitat rosada en aquest medi. Un cop han crescut les colònies es procedeix així:

- Es pica una colònia rosada i s'inocula en 200 ml de medi de cultiu líquid AHC i s'incuba altre cop 48 h a 30°C en agitació fins que el medi pren un color vermell tèrbol ($D.O_{.600} > 1.5$)
- Es centrifuguen les cèl.lules 5 min a 1730xg i es resuspenen en 10 ml de SE
- El punt anterior es repeteix dues vegades i finalment es resuspenen les cèl.lules en 3 ml de SE
- S'escalfa la sol.lució a 45°C en un bany humit
- Prèviament cal haver preparat agarosa de baix punt de fusió (LMP) a l'1% en SE i haver-la posat també a 45°C, oli mineral i en un erlenmeyer s'hauran posat 70 ml de SE en agitació sobre gel
- S'afegeixen 3 ml de l'agarosa preparada a les cèl.lules que continuen a 45°C
- Després s'afegeixen 15 ml d'oli mineral i es barreja amb força fins que es formi una emulsió (tot això cal fer-ho encara dins del bany de 45°C)
- Es decanta la solució anterior en l'erlenmeyer que conté els 70 ml de SE en gel i s'agita amb un imant durant 5 min
- Es transfereix la solució a tubs falcon
- Es centrifuga 10 min a 1730xg i es decanta l'oli mineral

- El pas anterior es repeteix dues vegades per tal d'eliminar tot l'oli (si cal, es pot fer servir una pipeta pasteur o un tovalló de paper)
- S'afegeixen 500 µl de β-mercaptoetanol i 500 µl de liticasa (10 mg/ml), i s'ajusta el volum final fins a 10 ml amb SE. Es barreja bé i s'incuba 2 h a 37°C
- Es centrifuga 5 min a 1730xg i es resuspèn suaument en 20 µl de 1% (p/v) sarcosil/25 mM EDTA
- Es torna a centrifugar 5 min a 1730xg i es resuspèn en 20 µl de solució sarcosil/EDTA amb 50 mg/ml de proteïnasa K
- S'incuba 48 h a 50°C
- Es centrifuga 5 min a 1730xg
- Es renta tres vegades amb 20 µl de 0.1xTE i es guarda a 4°C

Per a les amplificacions s'utilitza 1 µl de la preparació.

Medi de cultiu AHC (ura-, trp-):

0.2% de base nitrogenada de llevat (DIFCO) lliure d'aminoàcids i de (NH₄)₂SO₄

38 mM (NH₄)₂SO₄

1% de caseïna hidrolitzada lliure de sals i vitamines (DIFCO)

50 mg (per al medi líquid) o 10 mg (per a les plaques) C₅ H₅N₅.1/2 H₂SO₄ (Sigma)

S'ajusta el pH a 5.8, s'autoclava i s'afegeixen 50 ml de glucosa estèril al 20% (p/v). Per a les plaques, s'afegeixen 10 g d'agar abans d'autoclavar per a la solidificació. El medi preparat es guarda a 4°C i té una durada de 6 setmanes.

Tampó SE:

75 mM NaCl

25 mM EDTA

Es tampona a pH 8

Reacció en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Mètode *in vitro* que es basa en l'amplificació selectiva de regions de DNA delimitades per encebadors específics (Saiki i col., 1988). Aquesta tècnica consisteix en cicles continus de denaturació del DNA, hibridació dels encebadors a les cadenes senzilles de DNA i extensió de les cadenes mitjançant la còpia del motllo per la incorporació de nucleòtids que promou la Taq-polimerasa. Aquests cicles continus produeixen un nombre exponencial de còpies de el DNA motllo i genera una quantitat de DNA que deixa de ser limitant en els estudis de genètica.

Condicions de la PCR inter-*Alu*

Si s'utilitzen com a encebadors específics fragments de seqüències consensus dels elements repetitius *Alu* (Tagle i Collins, 1992; Chumakov i col., 1992a), que estan altament repetides a tot el genoma d'humans, es poden obtenir fragments de DNA humans de diferents mides, en funció de la distribució d'aquestes seqüències.

Per a l'amplificació d'aquests fragments, s'han utilitzat els següents encebadors (Chumakov i col., 1992b; Tagle i Collins, 1992):

A33: 5'-CGCGTCGACCACTGCACTCCAGCCTGGGCG-3'

A44: 5'-CGCGTCGACGGGATTACAGGCG-3'

Condicions de la PCR inter *Alu*:

94°C 3 min

94°C 1 min		30 cicles
56°C 1 min		
74°C 2 min		

74°C 10 min

Es fan dues reaccions de PCR de 50 µl cadascuna i després s'ajunten els dos productes, es corre un gel d'agarosa a l'1% per tal de veure si hi ha productes, i finalment es fa una precipitació en etanol i es resuspen en 40 µl d'H₂O.

Aquest mètode ha estat emprat tant per a la generació de sondes de YACs com per a les sondes de pintat cromosòmic.

Marcatge de les sondes amb nucleòtids biotilats o digoxigenats

S'han descrit diversos mètodes per al marcatge de les sondes que s'han de fer servir en FISH com són per exemple el marcatge directe de la sonda durant la reacció de la PCR, mitjançant la incorporació de nucleòtids marcats bé sigui amb biotina bé amb digoxigenina o alternativament, el mètode del *random priming*. Tanmateix, el mètode més utilitzat és el mètode de la *nick translation* i és aquest mètode el que s'ha fet servir preferencialment al nostre laboratori donada la seva alta eficiència.

La reacció de *nick translation* aprofita la doble activitat de la polimerasa I d'*E. coli*: per un costat afegeix nucleòtids a l'extrem 3' que es genera quan en una fibra de DNA de doble cadena s'hi fa un *nick* (interrupció en una de les dues cadenes de DNA); per l'altre costat, aquest enzim té una activitat 5'→3' exonucleolítica que li permet treure nucleòtids de l'extrem 5' del *nick*. L'eliminació simultània de nucleòtids de l'extrem 5' i l'adició de nucleòtids a l'extrem 3' resulta en un moviment del *nick* al llarg del DNA (*nick translation*) (Kelly i col., 1970). La substitució dels nucleòtids preexistents per nucleòtids marcats amb biotina o digoxigenina (biotina-16-2'-desoxiuridina-5'-trifosfat o bio-16dUTP; digoxigenina-11-2'-desoxiuridina-5'-trifosfat o dig-11dUTP), permet que, mitjançant la hibridació in situ i els processos de detecció posterior, es puguin detectar les sondes per mètodes fluorescents.

Reacció de *nick translation*

DNA	2 µg
bio-16dUTP (Boheringer-Manheim, 1 mM)	2 µl
(dig-11dUTP; Boheringer-Manheim, 1 mM)	
1 mM dTTPs (Farmacia)	3 µl
Tampó NT	10 µl
DNAsa I (Sigma, 2 ng/ml)	10 µl
DNA Pol I (New Engl. Biolabs, 10 U/µl)	2 µl
dH ₂ O fins a 100 µl de reacció	

La reacció s'incuba 2 h a 16°C després de les quals s'atura la reacció amb 5 µl 500 mM EDTA (pH 8) durant 5 min a 65°C.

Tampó de la reacció:

1 M Tris-HCl pH 7.8	5 ml
2.5 M MgCl ₂	200 µl
β-mercaptoetanol	7 µl
dATP (Pharmacia, 100 mM)	50 µl
dCTP (Pharmacia, 100 mM)	50 µl
dGTP (Pharmacia, 100 mM)	50 µl
dH ₂ O fins a 10 ml	

El tampó es filtra amb xeringa i filtre de 0.22 µm i es guarda a -20°C.

L'activitat específica de la reacció de marcatge depèn de l'activitat específica dels dNTPs i del reemplaçament dels nucleòtids al motllo. Això es pot controlar mitjançant la concentració de la DNAsa I. La concentració de la DNAsa I que s'ha fet servir de manera sistemàtica és de 2 µg/ml però en el cas dels YACs de més de 500 kb, s'ha fet servir una concentració de 1 µl/ml segons les suggerències de Selleri i col. (1991).

Per tal de comprobar l'eficiència del marcatge (s'espera una incorporació del 30%), s'agafen 5 µl de la reacció i s'hi afegixen 1 µCi de α³²P-dCTP (3000 Ci/mmol), s'incuba 2 hores a 16°C. Després es para la reacció igual que la de *nick translation* i s'apliquen 1.5 µl en dos filtres DE81. Els filtres s'aixuguen a 65°C durant 15 min. Els filtres estan carregats positivament i retenen fortament els àcids nucleics marcats (els no marcats s'elueixen en els rentats dels filtres amb fosfat sòdic).

Per a comprobar la mida dels fragments obtinguts, es corren 8 µl de cada mostra en un gel d'agarosa a l'1%. La mida òptima dels fragments és d'entre 200 fins a 600 pb (parells de bases).

Finalment, per tal d'eliminar els nucleòtids no incorporats, es passen les mostres per una columna de Sephadex G-50 (gelfiltració).

Per a la hibridació, les sondes es preparen de la manera següent:

400 ng de DNA (20µl de la reacció de marcatge) es precipiten en etanol absolut i presència de 3 µg de *Cot1* DNA (GIBCO), de 2 µg de DNA d'esperma de salmó, 10 µl de 1 M NaCl.

Els sediments es resuspenen en una barreja de 50% de formamida deionitzada en 2XSSC i 6% dextran sulfat. La barreja ja està preparada per a hibridar.

PREPARACIÓ DEL SUBSTRAT D'HIBRIDACIÓ

Obtenció de cromosomes metafàsics a partir de sang perifèrica humana

Per tal d'obtenir un substrat cromosòmic per a l'estudi de FISH, s'ha partit de mostres de sang perifèrica dels pacients i familiars extreta en tubs d'heparina sòdica. El protocol emprat per a obtenir els cromosomes metafàsics es basa en la inhibició de la formació del fus acromàtic quan la cèl.lula entra en divisió, la lisi de les membranes per xoc hipotònic i la seva fixació. El protocol detallat és el següent:

- 0.7 ml de la capa limfocítica del tub de sang es sembren en un flascó de 25 cm² en presència de 10 ml de medi de cultiu RPMI-1640 (GIBCO) amb 10% de sèrum fetal boví (FBS), penicilina/Streptomycina (100 U/ml) i 200 µl de fitohemaglutinina (PHA) (GIBCO)
- S'incuben els flascons durant 72 h a 37°C en 5% de CO₂
- S'afegeixen 0.4 ml del Colcemid (GIBCO) (concentració final de 0.04 µg/ml)
- S'incuba 20 min a 37°C
- Es recull el cultiu en un tub cònic de 12-15 ml i es centrifuga a 370xg
- Es decanta el sobrenedant i es resuspèn bé el sediment abans d'afegir-hi 10 ml (gota a gota) de solució hipotònica
- S'incuben els tubs amb la solució hipotònica durant 20 min a 37°C (per tal de produir un xoc hipotònic i trencar les membranes)

- Abans de centrifugar 8 min a 190xg, s'afegeixen 2 ml de solució fixadora i s'inverteix el tub un parell de vegades per tal de parar la reacció hipotònica
- Es decanta el sobrenedant, el sediment es desenganxa amb petits copets fins que queda homogeni i s'afegeixen gota a gota (per tal d'evitar la formació d'agregats) 10 ml en solució fixadora
- Es deixa a temperatura ambient durant 20-30 min i es centrifuga a 190xg 8 min
- Es decanta el sobrenedant i s'afegeixen 4 ml de solució fixadora freda
- Es centrifuga 8 min a 190xg
- Els dos darrers passos es repeteixen tres vegades fins que el sediment queda ben blanc
- Es guarden els tubs a 4°C durant almenys 24 h abans de fer les extensions (si cal fer-les el mateix dia, es pot posar el tub a -20°C durant dues hores)
- Els sediments de cèl.lules fixades es poden guardar en solució fixadora a -20°C per un període de temps gairebé indefinit

Solució hipotònica:

KCl 75 mM

Es guarda a temperatura ambient i prescriu després de 15 dies

Solució fixadora:

Metanol:àcid acètic (3:1)

Es fa el mateix dia i es guarda a 4°C

Obtenció de metafases a partir de sang perifèrica de ratolí

El protocol que s'ha fet servir en aquest cas és una modificació del que van descriure Davisson i col. (1987). El principi és el mateix que el del protocol descrit per a la sang perifèrica humana.

- S'extreuen una o dues gotes de sang perifèrica de la vena de la cua del ratolí i es recullen en un tub que conté 50 µl d'heparina sòdica (1.000 U/ml) i 50 µl de medi de cultiu RPMI1640 (GIBCO). Es recullen dos tubs per cada ratolí.
- Es sembren 150 µl de la barreja de sang i medi d'extracció en un tub que conté 1.350 µl medi de cultiu suplementat
- S'incuba el tub en un bany a 37°C amb agitació durant 41 h
- Després de les 41 h, s'afegeixen 50 µg/ml de colxicina al tub i s'incuba 20 min a 37°C per tal d'aturar la divisió cel.lular en metafase
- S'ajunta el contingut dels dos tubs en un de sol i es centrifuga a 430xg 10 min
- Al sediment se li afegeixen 2-3 ml de solució hipotònica i s'incuba a 37°C durant 20 min
- Es centrifuga a 550xg durant 10 min
- Al sediment se li afegeixen 3-4 ml de solució fixadora i es torna a centrifugar 10 min a 550xg
- Es repeteixen els dos darrers passos dues vegades i es guarda finalment a 4°C fins el moment de fer l'extensió en un porta objectes

Medi de cultiu suplementat:

RPMI1640 amb glutamina i hepes (GIBCO).
7.5 µg/ml fitohemaglutinina (PHA) (Murex)
50 µg/ml lipopolisacàrid (LPS) (Sigma)
10 mg/ml gentamicina (Sigma)

Bandes GTL (Giemsa Tripsina Leishman)

Les bandes G es produeixen per un pretractament amb sals o enzims proteolítics seguit d'una tinció amb un dels colorants de Romanowski (Giemsa, Wright's o Leischmann's).

Per tal d'obtenir un patró de bandes G (són les regions cromosòmiques que repliquen tard en la fase S, que són riques en seqüències A+T i que contenen pocs gens actius), s'ha fet servir el protocol de les bandes GTL que consisteix en:

- S'envelleixen les extensions de cromosomes a 55°C tota la nit abans de la tinció

- Es summergeix el portaobjectes en una solució de tripsina a 37°C durant 1 a 5 s (cal fer diverses proves per a trobar el temps òptim per a cada preparació)
- Es renta el portaobjectes en 2% FBS per parar l'efecte de la tripsina
- Es posen 4 ml de solució de Leishman sobre del portaobjectes durant 1 min i 30 s
- Es renta el portaobjectes dues vegades en H₂O destil.lada i ja es pot fer l'observació en un microscopi de camp clar

Solució de tripsina:

Trypsin-EDTA (GIBCO) en 100 ml de PBS (sense Ca⁺² i Mg⁺²).

Aquesta solució reconstituïda es pot guardar a 4°C durant un mes.

Solució Leishman's:

Solució mare: 0.15% de Leishman's (Sigma) en metanol pur.

Solució de treball: solució Leishman's: tampó fosfat Gurr's (BDH) a pH 6.8 (1:3)

Deshibridació de les extensions cromosòmiques

Sobretot per als mapatges, sovint és convenient hibridar les extensions cromosòmiques més d'una vegada (per exemple hibridacions simultànies amb sondes control i la sonda que es vol mapar). En aquest cas s'ha fet servir el protocol descrit per Heslop-Harrison i col. (1992) que consisteix en:

- Es summergeix el porta-objectes tres vegades en la solució de: 0.1% Tween 20 en 4XSSC durant 30 min-1 h
- Per tal d'eliminar tot l'excés de medi de muntatge i la primera sonda, es summergeixen els portes dues vegades en 2XSSC durant 5 min
- Deshidratació en una sèrie d'etanols
- Es torna a aplicar sonda i es segueix el protocol d'hibridació normal

També pot ser necessària una deshibridació en el cas en què calgui fer unes bandes G en les mateixes metafases que s'han analitzat per FISH. En aquest cas, s'ha fet el bandeig després de l'estudi de FISH ja que l'ordre invers ha donat resultats menys satisfactoris. Per a deshibridar l'extensió cromosòmica s'ha fet servir el protocol que consisteix en els següents passos:

- 1 min xilol 100%
 - 1 min xilol/etanol absolut (1:1)
 - 5 min solució fixadora (metanol: àcid acètic, 3:1)
 - S'assequen a temperatura ambient i es guarden fins el moment de la hibridació
- Just abans d'hibridar:
- 10 min 3.7% paraformaldèid en PBS
 - 2x5 min PBS
 - Assecat

Deshidratació en una sèrie d'etanols

HIBRIDACIÓ, DETECCIÓ I OBSERVACIÓ

Hibridació de les sondes

Per a la hibridació de les sondes, s'han d'envellir prèviament les extensions cromosòmiques a 55-60°C durant una hora o durant un dia 37°C (els temps d'envelliment varien en funció de la duresa dels cromosomes o el temps que fagi que les extensions són fetes -a més temps, menys temps d'envelliment-).

El protocol que s'ha fet servir per a la hibridació és una mica diferent del que generalment es descriu als protocols de FISH en els quals cromosomes i sondes es denaturen de manera independent. De manera sistemàtica, s'han denaturat cromosomes i sondes conjuntament, és a dir després de la deshidratació de les extensions a través d'una sèrie d'etanols, s'ha aplicat la barreja d'hibridació (que conté la sonda i el DNA d'esperma de salmó i de *Cot 1*) sobre el portaobjectes, s'ha cobert amb un vidret i s'ha segellat tot amb cola. Llavors, les extensions es posen en una estufa a 80°C durant 8 min per a denaturar tant

la sonda com els cromosomes. Cal esmentar també que si bé inicialment es feien uns tractaments previs de les extensions cromosòmiques amb RNAsa i amb pepsina, aquests dos passos han estat eliminats del nostre protocol de rutina degut a la manca de diferències en els resultats. També perquè no s'han observat diferències de resultats, no es fa una prehibridació a 37°C. El protocol específic que s'ha fet servir doncs és el següent i és el mateix per a tot tipus de sondes (cosmidis, cDNAs, productes de PCR, YACs, BACs, PACs o fags):

- Envelliment de les extensions cromosòmiques
- Deshidratació de les extensions en una sèrie d'etanols (70, 80, 90 i 100%) durant un minut en cada solució
- Aplicació de 10 µl de la barreja d'hibridació, aplicació d'un vidret de 22x22 mm i segellat de les vores amb cola de sabater
- 8 min a 80°C
- Incubació de 10 a 12 h en una cambra humida a 37°C

A partir d'aquí comencen els rentats i les incubacions amb els anticossos o molècules de detecció.

Per a la hibridació de més d'una sonda, s'han fet servir dues opcions: bé la co-precipitació de les sondes (400 ng de cadascuna d'elles) o bé l'aplicació de 7 µl (70 ng) de cadascuna de les sondes a l'àrea d'hibridació. Entre tots dos mètodes tampoc no s'han observat diferències però sí que la co-precipitació resulta millor quan s'han d'hibridar més de dues sondes alhora ja que sinó el volum de barreja d'hibridació sobre l'àrea de 22 mm² és massa gran.

Rentats i detecció dels senyals fluorescents

Per a la detecció dels senyals, s'aprofita la gran afinitat que de les molècules d'avidina i biotina. En el cas de la digoxigenina, es fan servir anticossos monoclonals contra la digoxigenina. Tant les molècules d'avidina com els anticossos contra la digoxigenina estan

conjugats a fluorocroms. Els fluorocroms que s'han fet servir per aquest treball (s'han de triar en funció dels filtres amb els quals estigui equipat el microscopi de fluorescència) han estat l'IsoTioCianat Fluoresceïna (FITC) d'espectre d'emissió de 523 nm (s'excita a 494 nm i dóna una fluorescència verda) o la rodamina o TRITC (Tetrametil Rodamina IsoTioCianat) que emet a una longitud d'ona de 615 nm (s'excita a 596 nm i dóna una fluorescència vermella). Si les sondes són més petites de 10 kb (productes petits de PCR o cDNAs), cal fer una segona ronda d'incubació amb les molècules conjugades amb fluorocroms per tal de poder-les detectar al microscopi de fluorescència (Fig. 7). El protocol és el següent:

- 3x5' 50% formamida deionitzada en 1xSSC a 42°C
- 3x5' 2xSSC* a 42°C
- 15' solució bloquejadora a 37°C
- 20-30' avidina-FITC** i/o sheep- α -dig-FITC** a 37°C
- 3x5' 4xSSC/0.1% Tween-20 a 37°C
- 20-30' α -avidina biotinilada i/o rabbit- α -sheep a 37°C
- 3x5' 4xSSC/0.1% Tween-20 a 37°C
- 20-30' avidina-FITC** i/o α -rabbit-FITC **
- 3x5' 4xSSC/0.1% Tween-20 a 37°C
- Rentat amb aigua destil.lada
- Muntatge de les preparacions amb solució DAPI/antifade

* Pels YACs es fan aquests rentats més astringents, amb 0.1xSSC

** Els mateixos anticossos o molècules d'alta afinitat es poden fer servir conjugades a TRITC

20xSSC:

300 mM Citrat trisòdic

3 M NaCl

Aquesta solució s'ajusta a pH7 amb HCl

Solució bloquejadora:

5% de *Blocking Reagent* (Boehringer Mannheim) en solució TN

S'escalfa al microones fins que la pols s'ha dissolt totalment i després es filtra amb un filtre de 0.45 µm i es guarda fins a 15 dies a 4°C.

Solució TN:

1 M Tris-HCl/1.5 M NaCl

Molècules conjugades i anticossos:

Totes les molècules conjugades (Avidina-FITC, α-digoxigenina-FITC, Avidina-rodamina i α-digoxigenina-rodamina) es fan servir en la primera incubació a una dilució de 1:100 en solució bloquejadora. En la darrera incubació es fa servir una dilució 1:500 per tal de reduir al màxim el soroll de fons. Les molècules o anticossos intermitjos (α-avidina, “rabbit α-sheep”, “α-rabbit TRITC” i “α-rabbit FITC”) es fan servir a una dilució 1:100 en tots els casos.

Solució DAPI/”Antifade”:

Per tal d'aconseguir un patró de bandeig dels cromosomes que es pugui estudiar al mateix temps que els senyals fluorescents al microscopi de fluorescència, es fa servir una tinció DAPI o 4',6-diamidino-2-fenilindol (és un intercalador del DNA que s'uneix amb especial afinitat a les regions riques en AT i que emet a 450 nm i dóna una fluorescència blava) que es visualitza amb llum ultraviolada. Una alternativa a la tinció DAPI és la tinció amb iodur de propidi (PI) però aquesta no produeix cap patró de bandes la qual cosa pot dificultar la interpretació d'alguns resultats, especialment per al mapatge de sondes en cromosomes del grup C o D.

La solució *antifade* que es fa servir per a evitar que el senyal fluorescent s'esvaeixi en ser il.luminat, és una solució comercial (Vector) però també es pot fer servir una solució de glicerol i DABCO. Les concentracions finals de contratinció que es fan servir són: 150 ng/ml de DAPI i 0.5 mg/ml de IP.

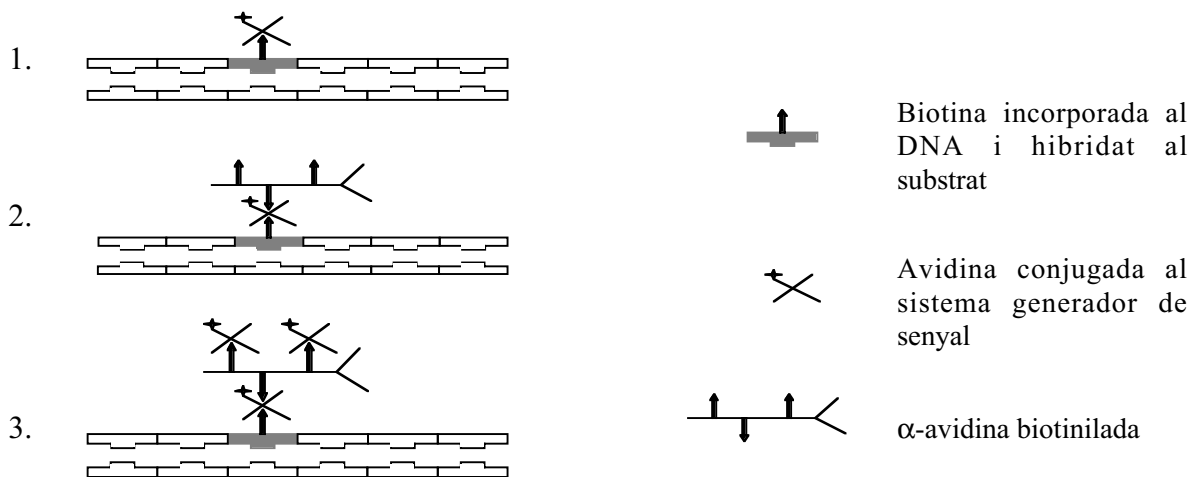


Figura 7. Representació esquemàtica del procés de detecció dels senyals fluorescents del sistema biotina-avidina (Leicht i col., 1994): 1. Conjugació de la molècula d'avidina a la cadena de DNA marcada amb biotina per *nick translation*. 2. El senyal s'amplifica mitjançant l'addició d'anti avidina biotilada. 3. Una altra capa d'avidina conjugada a un sistema generador de senyal.

Observació al microscopi de fluorescència i interpretació dels resultats de FISH

Els resultats de FISH d'aquest treball s'han interpretat íntegrament en un microscopi de fluorescència (model VANOX d'Olympus) que està equipat amb un joc de filtres de: ultraviolat senzill (emissió a 365 nm) per a visualitzar el DAPI, un filtre doble (emissió a 490 nm) per a visualitzar el IP i el FITC i un filtre (emissió a 546 nm) per a visualitzar el TRITC.

En qualsevol estudi de FISH cal tenir sempre en compte l'eficiència de cada sonda abans de donar cap resultat. L'eficiència de cada sonda varia principalment en funció de la seva mida (com més petita, menys senyals es poden comptar), però els resultats d'un estudi de FISH poden dependre també d'altres factors com poden ser la concentració de sonda a la

qual s'està treballant, de l'astringència dels rentats o fins i tot de l'estat de la preparació cromosòmica. En aquest estudi. La mitjana de l'eficiència de les sondes que s'han fet servir, ha voltat el 90%.

Per a la interpretació dels resultats de FISH d'aquest treball el criteri ha estat el mateix que s'accepta als laboratoris de citogenètica convencional, és a dir, l'estudi de 20 metafases per a cada sonda. Si hi ha cap resultat discrepant o sospita de mosaïcisme, s'estudien 50 metafases i es compten com a mínim 100 nuclis interfàsics. Per als estudis de mapatge cromosòmic, s'han comptat 100 cromosomes de 50 metafases.