

102. Hagerman RJ, Leehey M, Heinrichs W, Tassone F, Wilson R, Hills J, et al. Intention tremor, parkinsonism and generalized brain atrophy in older male carriers of fragile X. *Neurology* 2001; 57: 127-30.
103. Hagerman RJ, Greco C, Chudley A, Leehey M, Tassone F, Grigsby J, et al. Neuropathology and neurodegenerative features in some older male premutation carriers. 10th International Workshop on Fragile X Syndrome and X Linked Mental Retardation. Frascati, Italy. September 19-22, 2001.
104. Hagerman RJ. Medical follow-up and pharmacotherapy. In Hagerman RJ,

- Hagerman PJ, eds. *Fragile X syndrome: diagnosis, treatment and research*. 3 ed. (In press). Baltimore: Johns Hopkins University Press; 2002.
105. Scharfenaker S, O'Connor R, Stackhouse T, Noble L. An integrated approach to intervention. In Hagerman RJ, Hagerman PJ, eds. *Fragile X syndrome: diagnosis, treatment and research*. 3 ed. (In press). Baltimore: Johns Hopkins University Press; 2002.
106. Braden M. Academic interventions in fragile X. In Hagerman RJ, Hagerman PJ, eds. *Fragile X syndrome: diagnosis, treatment and research*. 3 ed. (In press). Baltimore: Johns Hopkins University Press; 2002.

EL SÍNDROME X FRÁGIL: UN MODELO DE LA RELACIÓN GEN-CEREBRO-CONDUCTA

Resumen. Introducción. La secuenciación del gen del retraso mental por X frágil y la medición de la proteína FMRP han hecho posible la cuantificación de proteínas de variaciones internas del gen FMR1 y la elaboración de correlaciones clínicas de la proteína FMRP. Desarrollo. Este artículo revisa nuestros conocimientos sobre la regulación de la expresión del gen FMR1 y la relación genotipo-fenotipo. La variabilidad clínica se relaciona con varios factores, donde se incluyen: 1. Variaciones moleculares en el FMR1 que generan una gama de niveles de FMRP; 2. El efecto combinado de genes de fondo que interaccionan directa o indirectamente con la FMRP, y 3. Factores del entorno que pueden potenciar o impedir el desarrollo y el grado de disfunción resultante. Conclusión. Los avances en neuroimagen, neurociencias y los ratones knock-out aportan nuevos datos que nos ayudan a entender la relación gen-cerebro-conducta en el síndrome X frágil. [REV NEUROL 2001; 33 (Supl 1): S51-7] **Palabras clave.** Conducta. FMRP. FMR1 mRNA. Síndrome X frágil.

A SÍNDROMA X FRÁGIL: UM MODELO DA RELAÇÃO GENE-CÉREBRO-COMPORTAMENTO

Resumo. Introdução. A sequenciação do gene do atraso mental por X frágil e a medição da proteína FMRP tornaram possível a quantificação de proteínas de variações internas do gene FMR1 e a elaboração de correlações clínicas da proteína FMRP. Desenvolvimento. Este artigo revê os nossos conhecimentos sobre a regulação da expressão do gene FMR1 e a relação genotipo-fenotipo. A variabilidade clínica está relacionada com diversos factores, entre os quais se incluem: 1. Variações moleculares no FMR1 que geram uma gama de níveis de FMRP; 2. O efeito combinado de genes de fundo que interagem directa ou indirectamente com a FMRP, e 3. Factores ambientais que podem potenciar ou impedir o desenvolvimento e o grau de disfunção resultante. Os avanços em neuroimagem, neurociências, e os ratos knock-out apresentam novos dados que nos ajudam a entender a relação gene-cérebro-comportamento na síndrome X frágil. [REV NEUROL 2001; 33 (Supl 1): S51-7] **Palavras chave.** Comportamento. FMRP. FMR1 mRNA. Síndrome X frágil.

Metilación y expresión del gen FMR1

E. Pintado, F.J. Morón

METHYLATION AND EXPRESSION OF THE FMR1 GENE

Summary. Objective. In this paper we present a brief review on DNA methylation, the enzymes and proteins involved in the repression complex and the importance of methylation of FMR1 gene in fragile X syndrome. Development. Methylation status of control region in the genome plays a critical role in the regulation of gene expression. In susceptible genes containing CpG island in the promoter, cytosine methylation favors a repressive chromatin structure that prevents the binding of transcriptional activators to the promoter. The enzyme DNA methyltransferase transfers a methyl group from the S-adenosylmethionine to the 5 carbon of cytosine in the CG sequences. Several proteins have been described that recognize the methyl cytosine and recruit the co-repressor and the histones deacetylases. The loss of the acetyl groups produces the compacting of the chromatin. Fragile X syndrome is due, in the majority of the cases, to the expansion above a threshold of the CGG repeats in the first exon of FMR1 gene. These expansions are concomitant with the methylation of the promoter and the silencing of FMR1. Conclusions. DNA methylation is a tag that enables different phenotypic expression from an identical nucleotide sequence. Aberrant methylation is the cause of different pathologies including fragile X syndrome. The comprehension of the mechanisms by which methylation induces the silencing of the genes and the study of agents that could revert this process are important for the treatment of these diseases. [REV NEUROL 2001; 33 (Supl 1): S57-62] **Key words.** DNA methylation. FMR1 gene. Fragile X syndrome. Gene expression. Repressor complex. Trinucleotide repeats expansion.

INTRODUCCIÓN

El ADN puede modificarse de forma covalente sin que varíe el apareamiento de bases; la metilación de las citosinas en las secuencias CG constituye la modificación más frecuente. En procariontes, la metilación de algunas bases en los centros de restricción sirve para proteger el ADN de la digestión por sus propias nuclea-

sas de restricción. En eucariotas, y sobre todo en vertebrados, la metilación en citosina parece constituir un mecanismo importante para distinguir genes activos de los que no lo son [1-3].

Debido al funcionamiento de la vía de reparación del ADN, los residuos de citosina metilados del genoma tienden a eliminarse en el curso de la evolución. La desaminación accidental de una citosina

Recibido: 04.10.01. Aceptado: 08.10.01.

Departamento de Bioquímica Médica y Biología Molecular. Facultad de Medicina y Hospital Universitario Virgen Macarena. Sevilla, España.

Correspondencia: Dra. Elizabeth Pintado. Departamento de Bioquímica

Médica y Biología Molecular. Facultad de Medicina. Avda. Sánchez Pizjuán, 4. E-41009 Sevilla.

Agradecimientos. Al profesor López-Barneo por la lectura crítica de este manuscrito.

© 2001, REVISTA DENEUROLOGÍA

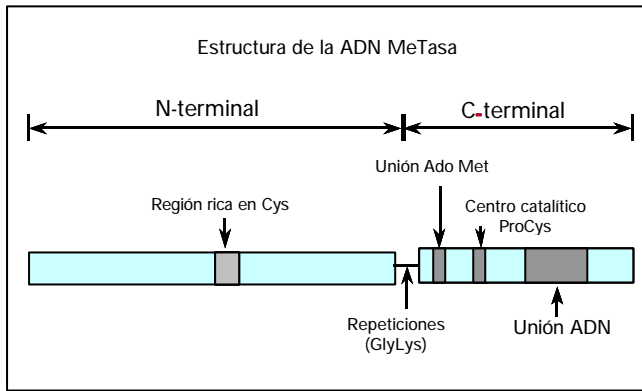


Figura 3. Estructura de la ADN metiltransferasa 1. En el extremo aminoterminar tiene una región rica en cisteínas. En el extremo carboxiloterminar se encuentra el centro catalítico (tomada de [16]).

Tabla. ADN metiltransferasas.

| Metiltransferasa | Función | Principal expresión | Ratón nulo | Mutaciones |
|------------------|----------------|---------------------|------------------------|------------|
| Dnmt1 | Mantenimiento | Embrión adulto | Muerte en útero | – |
| Dnmt3a | <i>De novo</i> | Embrión | Muerte a las 4 semanas | – |
| Dnmt3b | <i>De novo</i> | Embrión | Muerte en útero | ICF |

ICF: síndrome de inmunodeficiencia, inestabilidad centromérica y anomalías faciales.

Las células madres embrionarias negativas para Dnmt3a o Dnmt3b son capaces de metilar ADN vírico introducido en las células, metilación que no ocurre cuando están ausentes ambas metilasas, lo que indica que ambas enzimas son capaces de metilar el ADN y que sus acciones son redundantes. Sin embargo, los fenotipos de los ratones nulos *oknockout* para Dnmt3a o Dnmt3b son diferentes. Los ratones nulos para Dnmt3a llegan a término, pero mueren cuatro semanas después del nacimiento, mientras que los nulos para Dnmt3b mueren a la mitad de la gestación (Tabla). Los ratones doble negativos para ambas metiltransferasas no pasan la fase de gástrula [8]. Se han obtenido sustancias, como 5-azacitidina, que inhiben las metiltransferasas y pueden revertir los efectos de la metilación [19].

Como se expondrá mas adelante, en células en cultivo de pacientes X frágiles se ha conseguido la reversión de la expresión del gen *FMR1* tratándolas con agentes desmetiladores [20]. En patologías tumorales, por efectos adversos de la hipermetilación, también se ha conseguido la reversión del tumor utilizando dichos agentes u oligos antisentido de la metiltransferasa 1 [21,22]. En nuestro laboratorio, hemos observado que la interleucina-1 (IL-1) produce en células RIN –células productoras de insulina– la represión del gen *FMR1* y otros genes con islas CpG por metilación del promotor. Hemos demostrado que este efecto está mediado por el óxido nítrico y que se debe probablemente a la activación de alguna de las metiltransferasas [23]. Tales observaciones nos animan a seguir investigando sobre posibles moléculas fisiológicas que puedan inhibir las metiltransferasas y revertir la expresión de genes, como *FMR1*, *FMR2* u antioncogenes con islas CpG, cuya hipermetilación aberrante causa diferentes patologías.

Recientemente se ha obtenido y caracterizado cinéticamente la Dnmt1 recombinante y se trabaja en el diseño de inhibidores

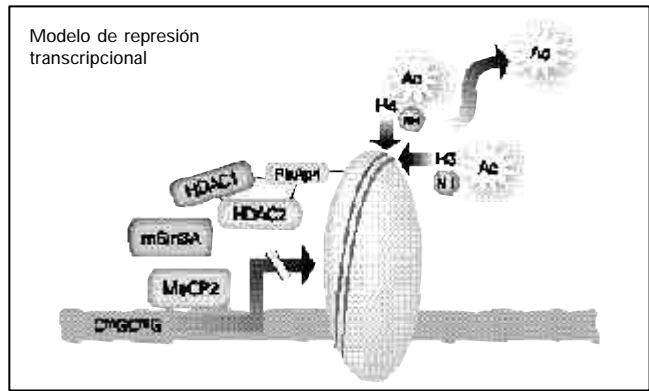


Figura 4. Formación del complejo represor. La proteína MeCP2 reconoce a las citosinas simétricamente metiladas en las secuencias CG y recluta al correpresor mSin3A y a las desacetilasas de las histonas HDAC1 y HDAC2. (Tomada de Razin A. EMBO J 1998).

específicos que reviertan los efectos adversos de la metilación [24-27]. Es interesante destacar que la metilación de las islas CpG es crucial para el normal desarrollo neuronal y que en el sistema nervioso central (SNC) hay un alto nivel de expresión de la Dnmt1 [28,29]. Asimismo, recientemente se ha descrito un raro síndrome de herencia autosómica recesiva, caracterizado por inmunodeficiencia, inestabilidad en los centrómeros y rasgos faciales dismórficos (ICF) por mutaciones en la Dnmt3b [30].

FORMACIÓN DEL COMPLEJO REPRESOR

Hasta hace relativamente poco tiempo no se ha comprendido la relación entre la metilación del ADN y la represión de la expresión genética. En la actualidad se sabe que la metilación del ADN se asocia a un estado de la cromatina inaccesible a los factores de transcripción, la heterocromatina, que puede inducir el silencio de un grupo más o menos extenso de genes; la inactivación del cromosoma X en mamíferos constituye el paradigma de la represión en bloque. Aunque la simple extrusión del grupo metilo podría dificultar el acceso de algunos factores de transcripción, se ha descrito un conjunto de familias de proteínas que reconocen las citosinas metiladas y reclutan a su vez a otras proteínas, formándose lo que se conoce como complejo represor (Fig. 4). La consecuencia final de esta asociación de proteínas es el agrupamiento y activación de las desacetilasas de las histonas HDAC1 y HDAC2, que catalizan la pérdida del grupo acetilo y exponen las cargas positivas de las histonas. Las interacciones electrostáticas con las cargas negativas del ADN provocan el empaquetamiento de la cromatina [31-33]. Se han clonado hasta ahora cinco proteínas con dominios homólogos de unión a las citosinas metiladas –en inglés, *methyl binding domain* (MBD)–, que se denominan MBD1, MBD2 (a y b), MBD3, MBD4 y MeCP2 [8]. Todas ellas, excepto MBD4 –que es una enzima de reparación–, son represores transcripcionales que difieren en las características de unión con el ADN, aunque comparten el reclutamiento del correpresor Sin3A, la activación de las desacetilasas y el remodelamiento de la cromatina. Recientemente se ha descrito la estructura del factor humano de regulación de la transcripción MBD1; se ha observado una secuencia de cinco aminoácidos hidrofóbicos muy conservados, que forman un lazo sobre el ADN [34].

MeCP2 es un represor global que se une a una secuencia CpG metilada simétricamente y flanqueada por seis pares de bases de secuencia no específica. Tiene una región de unión a la citosina

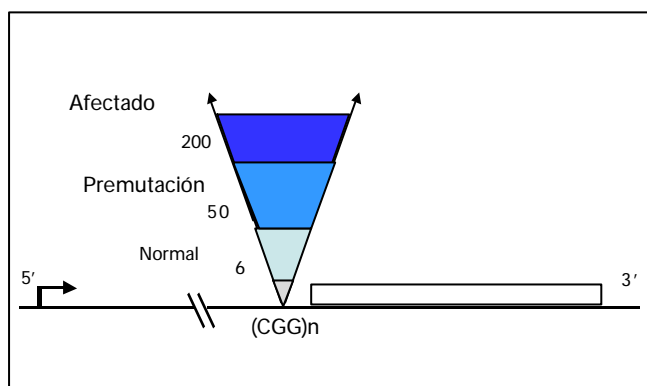


Figura 5. Expansiones de los CGG en la zona 5' no codificante del primer exón del gen *FMR1*, responsables del síndrome X frágil.

metilada (MBD) y una región responsable de la represión de la transcripción—en inglés, *transcription repression domain* (TRD)—[8]. Esta región inmunoprecipita con el correpresor Sin3A y las desacetilasas de las histonas. La represión causada por MeCP2 puede contrarrestarse con inhibidores de las desacetilasas, como la tricostatina A (TSA). Sin embargo, los ratones deficientes en MeCP2 no presentan expresión bialélica de los genes con impronta ni activación ectópica del cromosoma X, como sucede con los ratones deficientes en Dnmt1, lo que indica la existencia de otras proteínas con dominios MBD que pueden sustituir algunas de sus acciones. En humanos, MeCP2 se localiza en el cromosoma X; se ha descrito un número elevado de mutaciones en dicha proteína que conducen al síndrome de Rett, un trastorno progresivo del desarrollo neuronal y una de las principales causas de retraso mental en mujeres [35,36].

De las proteínas anteriormente mencionadas que tienen dominios de unión a citosinas metiladas, MBD2 constituye un componente del complejo MeCP1, descrito con anterioridad [37]. Este complejo requiere de múltiples secuencias CG para unirse y su afinidad es mucho menor que la de MeCP2, por lo que suele asociarse con la represión transitoria [37]. En el modelo propuesto, la secuencia del proceso de represión transcripcional comienza con la activación de la metiltransferasa, la metilación de la citosina en las secuencias CG, la unión de las proteínas con dominios específicos (MBD) y el reclutamiento de las proteínas que forman el complejo represor. Sin embargo, se ha descrito recientemente que la Dnmt1 se asocia directamente con las desacetilasas de las histonas porque precipitan con la HDAC1 [38]. Un escenario alternativo al expuesto anteriormente es que la actividad desacetilasa resulta necesaria para remodelar la cromatina y llevar a cabo la metilación del ADN. Se requeriría esta interdependencia entre metilación y desacetilación para la generación de un estado epigenético estable [39].

METILACIÓN ABERRANTE DEL GEN *FMR1*

La falta de expresión del gen *FMR1* es la causa principal del SXF, el retraso mental hereditario más frecuente, con una incidencia de aproximadamente un caso por 5.000-6.000 nacidos [40]. Además del retraso mental que lo tipifica, el síndrome se caracteriza por algunos rasgos dismórficos más evidentes en varones [40,41]. El gen *FMR1* tiene un tamaño de 38 kb, con 17 exones, y es un gen de mantenimiento con una isla CpG en el promotor [42]. En la región 5' no codificante del primer exón contiene una región polimórfica de repeticiones CGG con una distribución normal entre 6 y aproximadamente 50 triplete, y una frecuencia máxima de 29 repeticiones

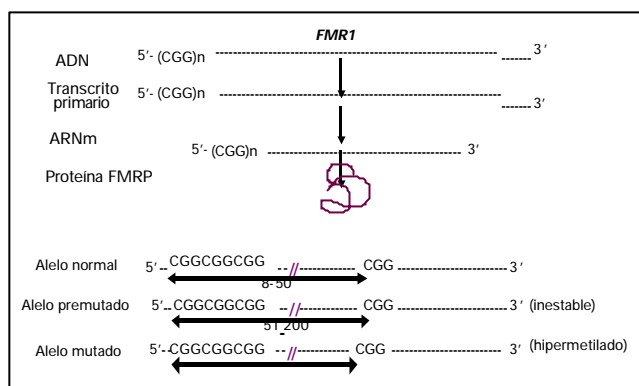


Figura 6. Expresión del gen *FMR1*. Los alelos premutados son inestables, pero se expresan porque el promotor se encuentra sin metilar. Los alelos mutados se asocian a hipermetilación del promotor y falta de expresión de la proteína FMRP.

[43,44]. En los pacientes con SXF, el número de triplete se eleva a más de 200, y puede alcanzar los 1.000 (Fig. 5). Estas expansiones se acompañan de la metilación aberrante del promotor, con el consiguiente silenciamiento del gen. La falta de expresión de la proteína FMRP codificada por el gen *FMR1* causa los síntomas característicos de este síndrome [43,45]. La función de esta proteína no se conoce con exactitud, pero se sabe que tiene dominios muy conservados de unión a ARN y que se expresa en casi todos los tejidos, aunque más abundantemente en el cerebro [46].

En los portadores de premutación, el tamaño de las repeticiones varía de 50 a 200; son inestables, con tendencia a expandirse en las siguientes generaciones si el alelo se transmite por vía materna. En las premutaciones, la isla CpG del promotor no se metila y no suele aparecer sintomatología (Fig. 6). No se conoce el mecanismo de la metilación *de novo* del promotor, a consecuencia de la expansión de los triplete por encima de unos 200, pero se propone que las estructuras en horquilla que forman las secuencias largas de CGG constituyen buenos sustratos para la Dnmt1 [47]. También se especula con un mecanismo defensivo para mantener en silencio el ADN repetitivo [12]. Como se ha expuesto anteriormente, las células de pacientes con X frágil en cultivo revierten la expresión del gen *FMR1* cuando se incuban con un agente desmetilante, como 5-azacitidina [20]; sin embargo, el uso exclusivo de agentes desacetilantes no devuelve la expresión del gen, pero tienen un efecto sinérgico cuando se utilizan con agentes desmetilantes [48,49].

El gen *FMR1* es ubicuo y su condición de gen de mantenimiento hace que se exprese de forma permanente en la célula; sólo se observa su ausencia en el cromosoma X inactivo de las mujeres o en los pacientes con SXF. Sin embargo, en nuestro laboratorio hemos observado que en determinadas circunstancias el óxido nítrico, cuyo papel en la regulación de la expresión genética se ha revisado recientemente [50], puede reprimir de forma total, aunque transitoria, la expresión del *FMR1* mediante el mecanismo que parece ser la activación de la metiltransferasa [23]. Estos hallazgos permiten especular con la posibilidad de encontrar reguladores fisiológicos de dicha enzima que inhiban su actividad para, de forma no tóxica, poder revertir la expresión del gen.

Debido a la importancia de la metilación de la isla CpG en las manifestaciones del SXF y de otras patologías asociadas a la represión de genes por metilación aberrante de sus promotores, un gran número de laboratorios trabajan sobre los distintos aspectos de la metilación del genoma y su relación con la estructura silente de la cromatina.

BIBLIOGRAFÍA

- Bird AP. CpG islands and the function of DNA methylation. *Nature* 1986; 321: 209-13.
- Razin A, Cedar H. DNA methylation and gene expression. *Microbiol Rev* 1991; 55: 451-8.
- Bird A. The essentials of DNA methylation. *Cell* 1992; 70: 5-8.
- Bird AP. Gene number, noise reduction and biological complexity. *Trends Genet* 1995; 11: 94-9.
- Razin A. CpG methylation, chromatin structure and gene silencing – a three-way connection. *EMBO J* 1998; 17: 4905-8.
- Brandeis M, Frank D, Keshet I, Siegfried Z, Mendelsohn M, Nemes A, et al. Sp1 elements protect a CpG island from de novo methylation. *Nature* 1994; 371: 435-8.
- Antequera F, Bird A. Number of CpG island and genes in human and mouse. *Proc Natl Acad Sci* 1993; 90: 11995-9.
- Newell-Price J, Clark AJL, King P. DNA methylation and silencing of gene expression. *TEM* 2000; 11: 142-7.
- Jacobsen SE, Meyerowitz EM. Hypermethylated Superman epigenetic alleles in arabidopsis. *Science* 1997; 277: 1100-3.
- Smith SS. Gilbert's conjecture: the search for DNA (cytosine-5) demethylases and the emergence of new functions for eukaryotic DNA (cytosine-5) methyltransferases. *J Mol Biol* 2000; 302: 1-7.
- Lewin B. The mystique of epigenetics. *Cell* 1998; 93: 301-3.
- Robertson KD, Wolffe AP. DNA methylation in health and disease. *Nat Rev* 2000; 1: 11-9.
- Bhattacharya SK, Ramchandani S, Cervoni N, Szyf M. A mammalian protein with specific demethylase activity for mCpG DNA. *Nature* 1999; 397: 579-83.
- Ramchandani S, Bhattacharya SK, Cervoni N, Szyf M. DNA methylation is a reversible biological signal. *Proc Natl Acad Sci* 1999; 96: 6107-12.
- Bestor TH, Verdine GL. DNA methyltransferases. *Curr Opin Cell Biol* 1994; 6: 380-9.
- Bestor TH. Activation of mammalian DNA methyltransferase by cleavage of a Zn binding regulatory domain. *EMBO J* 1992; 11: 2611-7.
- Glickman JF, Pavlovich JG, Reich NO. Peptide mapping of the murine DNA methyltransferase reveals a major phosphorylation site and start of translation. *J Biol Chem* 1997; 272: 17851-7.
- Okano M, Xie S, Li E. Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nat Genet* 1998; 19: 219-20.
- Jüttermann R, Li E, Jaenisch R. Toxicity of 5-aza-2'-deoxycytidine to mammalian cells is mediated primarily by covalent trapping of DNA methyltransferase rather than DNA demethylation. *Proc Natl Acad Sci* 1994; 91: 11797-801.
- Chiurazzi P, Pomponi MG, Willemsen R, Oostra BA, Neri G. In vitro reactivation of the *FMR1* gene involved in fragile X syndrome. *Hum Mol Genet* 1997; 7: 109-13.
- Laird PW, Jackson-Grusby L, Fazeli A, Dickinson SL, Jung WE, Li E, et al. Suppression of intestinal neoplasia by DNA hypomethylation. *Cell* 1995; 81: 197-205.
- Ramchandani S, MacLeod AR, Pinard M, von Hofe E, Szyf M. Inhibition of tumorigenesis by a cytosine-DNA methyltransferase, antisense oligodeoxynucleotide. *Proc Natl Acad Sci* 1997; 94: 684-9.
- Hmadcha A, Bedoya J, Sobrino F, Pintado E. Methylation-dependent gene silencing induced by interleukin 1 via nitric oxide production. *J Exp Med* 1999; 190: 1595-603.
- Pradhan S, Bacolla A, Wells RD, Roberts RJ. Recombinant human DNA (cytosine-5) methyltransferase. I. Expression, purification, and comparison of the novo and maintenance methylation. *J Biol Chem* 1999; 274: 33002-10.
- Bacolla A, Pradhan S, Roberts RJ, Wells RD. Recombinant human DNA (cytosine-5) methyltransferase. II. Steady-state kinetics reveal allosteric activation by methylated DNA. *J Biol Chem* 1999; 274: 33011-9.
- Fournel M, Sapieha P, Beaulieu N, Besterman JM, MacLeod AR. Down-regulation of human DNA-(cytosine-5) methyltransferase induces cell cycle regulators p16 and p21 by distinct mechanism. *J Biol Chem* 1999; 274: 24250-6.
- Bacolla A, Pradhan S, Larson JE, Roberts RJ, Wells RD. Recombinant human DNA (cytosine-5) methyltransferase. III. Allosteric control, reaction order, and influence of plasmid topology and triplet repeat length on methylation of the fragile X CCG-CCG sequence. *J Biol Chem* 2001; 18605-13.
- Tucker KL. Methylated cytosine and the brain: a new base for neuroscience. *Neuron* 2001; 30: 649-52.
- Inano K, Suetake I, Ueda T, Miyake Y, Nakamura M, Okada M, et al. Maintenance-type DNA methyltransferase is highly expressed in postmitotic neurons and localized in the cytoplasmic compartment. *J Biochem* 2000; 128: 315-21.
- Xu GL. Chromosome instability and immunodeficiency syndrome caused by mutations in a DNA methyltransferase gene. *Nature* 1999; 402: 187-91.
- Roundtree MR, Bachman KE, Baylin SB. DNMT1 binds HDAC2 and a new co-repressor, DMAP1, to form a complex at replication foci. *Nat Genet* 2000; 25: 269-77.
- Wolffe AP, Uemov FD, Guschin D. Co-repressor complexes and remodeling chromatin for repression. *Biochemical Society* 2000; 28: 379-86.
- Cheung WL, Briggs SD, Allis CD. Acetylation and chromosomal functions. *Curr Opin Cell Biol* 2000; 12: 326-33.
- Ohki I, Shimotake N, Fujita N, Jee J, Ikegami T, Nakao M, et al. Solution structure of the methyl-CpG binding domain of human MBD1 in complex with methylated DNA. *Cell* 2001; 105: 487-97.
- Van den Veyver IB, Zoghbi HY. Methyl-CpG-binding protein 2 mutations in Rett syndrome. *Curr Opin Genet Dev* 2000; 10: 275-9.
- Couvert P, Bienvenu T, Aquaviva C, Poirier K, Moraine C, Cendro C, et al. MECP2 is highly mutated in X-linked mental retardation. *Hum Mol Genet* 2001; 10: 941-6.
- Feng Q, Zhang Y. The MeCP1 complex represses transcription through preferential binding, remodeling, and deacetylating methylated nucleosomes. *Genes Dev* 2001; 15: 827-32.
- Fuks F, Burgers WA, Brehm A, Hughes-Davies L, Kouzarides T. DNA methyltransferase Dnmt1 associates with histone deacetylase activity. *Nat Genet* 2000; 24: 88-91.
- Selker EU. Trichostatin A causes selective loss of DNA methylation in Neurospora. *Proc Natl Acad Sci* 1998; 95: 9430-5.
- Rousseau F, Heitz D, Biancalana V, Blumenfeld S, Kretz C, Boue J, et al. Direct diagnosis by DNA analysis of the fragile X syndrome of mental retardation. *N Engl J Med* 1991; 325: 1673-81.
- Pintado E, de Diego Y, Hmadcha A, Carrasco M, Sierra J, Lucas M. Instability of the CGG repeat at the FRAXA locus and variable phenotypic expression in a large fragile pedigree. *J Med Genet* 1995; 32: 907-8.
- Kenneknecht I, de Graaff E, Deissler H, Glaser D, Wohrl D, Schenckel I, et al. Characterization of *FMR1* promoter elements by in vivo-footprinting analysis. *Am J Hum Genet* 1997; 60: 1354-62.
- Oberle I, Rousseau F, Heitz D, Kretz C, Devys D, Hanauer A, et al. Instability of a 550-base pair DNA segment and abnormal methylation in fragile X syndrome. *Science* 1991; 252: 1097-102.
- De Diego Y, Hmadcha K, Lucas M, Carrasco M, Pintado E. Fragile X founder effects and frequencies at the FRAXA locus in a mentally retarded populations of Andalucía, Southern Spain. In European Research Conferences 'Inherited disorders and their genes in different European populations'. Acquafredda di Maratea, Italia, 1998.
- Hmadcha A, de Diego Y, Pintado E. Assessment of *FMR1* expression by reverse transcriptase-polymerase chain reaction of KH domains. *J Lab Clin Med* 1998; 131: 170-3.
- Deys D, Lutz Y, Rouyer N, Bellocq JP, Mandel JL. The *FMR1* protein is cytoplasmic, most abundant in neurons and appears normal in carriers of a fragile X premutation. *Nat Genet* 1993; 4: 335-40.
- Smith SS, Laayoun A, Lingeman RG, Baker DJ, Riley J. Hypermethylation of telomere-like foldbacks at codon 12 of the human c-Ha rat gene and the trinucleotide repeat of the *FMR1* gene of fragile X. *J Mol Biol* 1994; 243: 143-51.
- Coffee B, Zhang F, Warren ST, Reines D. Acetylated histones are associated with *FMR1* in normal but not fragile X-syndrome cells. *Nat Genet* 1999; 22: 98-101.
- Chiurazzi P, Pompini MG, Pietrobono R, Bakker CE, Neri G, Oostra BA. Synergistic effect of histone hyperacetylation and DNA demethylation in the reactivation of the *FMR1* gene. *Hum Mol Genet* 1999; 8: 2317-23.
- Pfeilschifter J, Eberhardt W, Beck KF. Regulation of gene expression by nitric oxide. *Eur J Physiol* 2001; 442: 479-86.

METILACIÓN Y EXPRESIÓN DEL GEN FMR1

Resumen. Objetivo. En este artículo se hace una breve revisión sobre la metilación del ADN, las enzimas y proteínas involucradas en la formación del complejo represor y la importancia de la metilación del gen FMR1 en el síndrome X frágil. Desarrollo. El estado de metilación de regiones de control en el genoma desempeña un papel fundamental en la regulación de la expresión genética. En genes

METILAÇÃO E EXPRESSÃO DO GENE FMR1

Resumo. Objectivos. Neste artigo efectua-se uma breve revisão sobre a metilação do ADN, as enzimas e proteínas envolvidas na formação do complexo represor e a importância da metilação no gene FMR1 na síndrome do X frágil. Desenvolvimento. O estado de metilação de regiões de controlo no genoma desempenha um papel fundamental na regulação da expressão genética. Em genes suscep-

susceptibles, los que contienen una isla CpG en el promotor, la metilación de la citosina favorece un estado represivo de la cromatina que previene la unión de los factores de transcripción. Las enzimas ADN metiltransferasas transfieren un grupo metilo de la S-adenosilmetionina al carbono 5 de la citosina en las secuencias CG. Se ha descrito un grupo de proteínas que reconocen a las citosinas metiladas y reclutan al correpresor y las desacetilasas de las histonas. La pérdida del grupo acetilo de las histonas produce la compactación de la cromatina. El síndrome X frágil se debe, en la mayoría de los casos, a la expansión por encima de un umbral de las repeticiones CGG del primer exón del gen FMR1. Por causas no bien conocidas estas expansiones se acompañan de la metilación del promotor y como consecuencia del silencio del gen. Conclusiones. La metilación del ADN etiqueta a los genes de forma que la misma secuencia de bases puede tener repercusiones fenotípicas diferentes. La metilación aberrante de los genes es causa de diversas patologías como el síndrome X frágil. El conocimiento de los mecanismos de represión de la expresión genética por metilación y el estudio de agentes que haga reversible el proceso son importantes para el tratamiento de dichas enfermedades. [REV NEUROL 2001; 33 (Supl 1): S57-62]

Palabras clave. Complejo represor. Expansión de tripletes. Expresión genética. Gen FMR1. Metilación del ADN. Síndrome X frágil.

tíveis, os que possuem uma ilha CpG no promotor, a metilação da citosina favorece um estado repressivo da cromatina que previne a união dos factores de transcrição. As enzimas ADN metiltransferase transferem um grupo metilo da S-adenosilmetionina ao carbono 5 da citosina nas sequências CG. Foi descrito um grupo de proteínas que reconhecem as citosinas metiladas e recrutam o co-repressor e as desacetilases das histonas. A perda do grupo acetilo das histonas produz a compactação da cromatina. A síndrome X frágil deve-se, na maioria dos casos, à expansão acima citada, de um limiar das repetições CGG do primeiro exão do gene FMR1. Por causas desconhecidas estas expansões são acompanhadas pela metilação do promotor e por consequência pelo silêncio do gene. Conclusões. A metilação do ADN rotula os genes para que a mesma sequência de bases possa ter repercussões fenotípicas diferentes. A metilação aberrante dos genes é a causa de diversas patologias, como a síndrome X frágil. O conhecimento dos mecanismos de repressão da expressão genética por metilação e o estudo de agentes que torna reversível o processo, são importantes para o tratamento das referidas doenças. [REV NEUROL 2001; 33 (Supl 1): S57-62]

Palavras chave. Complexo repressor. Expansão de tripletos. Expressão genética. Gene FMR1. Metilação do ADN. Síndrome X frágil.