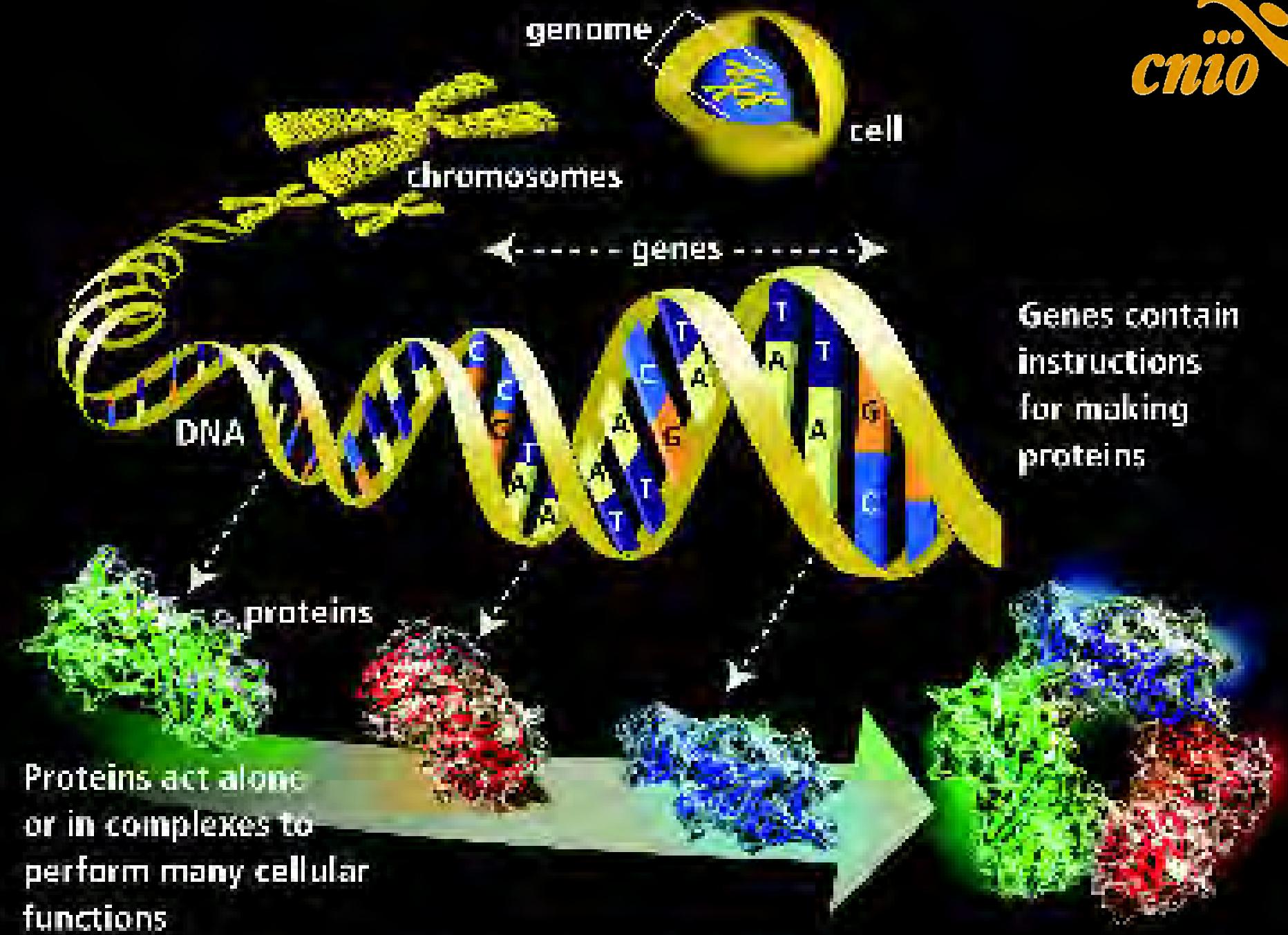


¿Qué genes están alterados en el Síndrome de Rett?

Esteban Ballestar

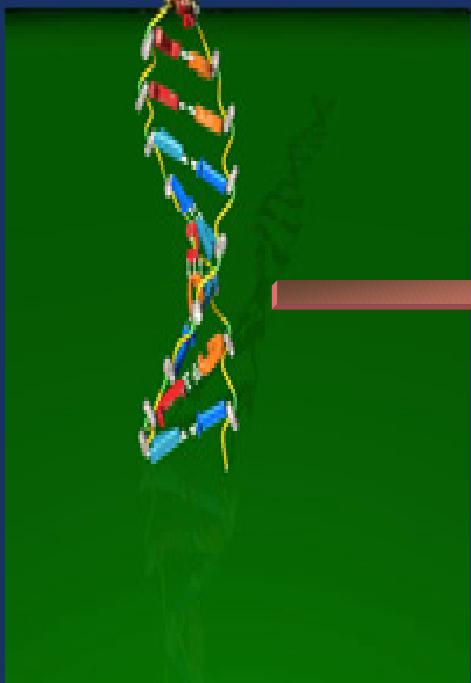
*Laboratorio de Epigenética del Cáncer
Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO), Madrid*



ADN

Proteínas no reguladoras, con función única

Función celular



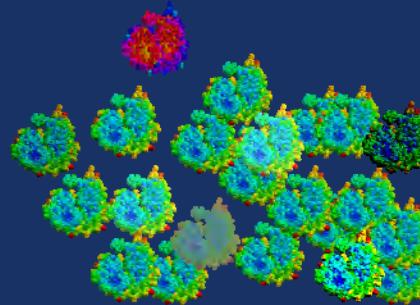
Célula normal

ADN

Proteínas no reguladoras



Proteínas ADN-reguladoras



1 función celular
alterada

1 proteína no reguladora
alterada

DNA

Proteínas no ADN-reguladoras



Varias funciones celulares alteradas i.e. Síndrome de Rett

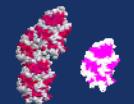
1 proteína reguladora alterada

DNA

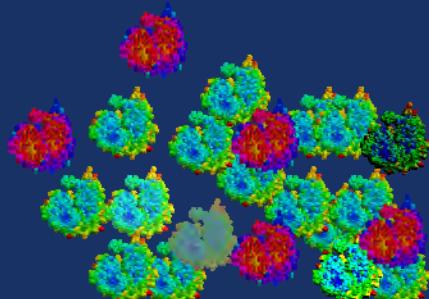
Proteínas no ADN-reguladoras



Proteínas ADN-reguladoras



MeCP2



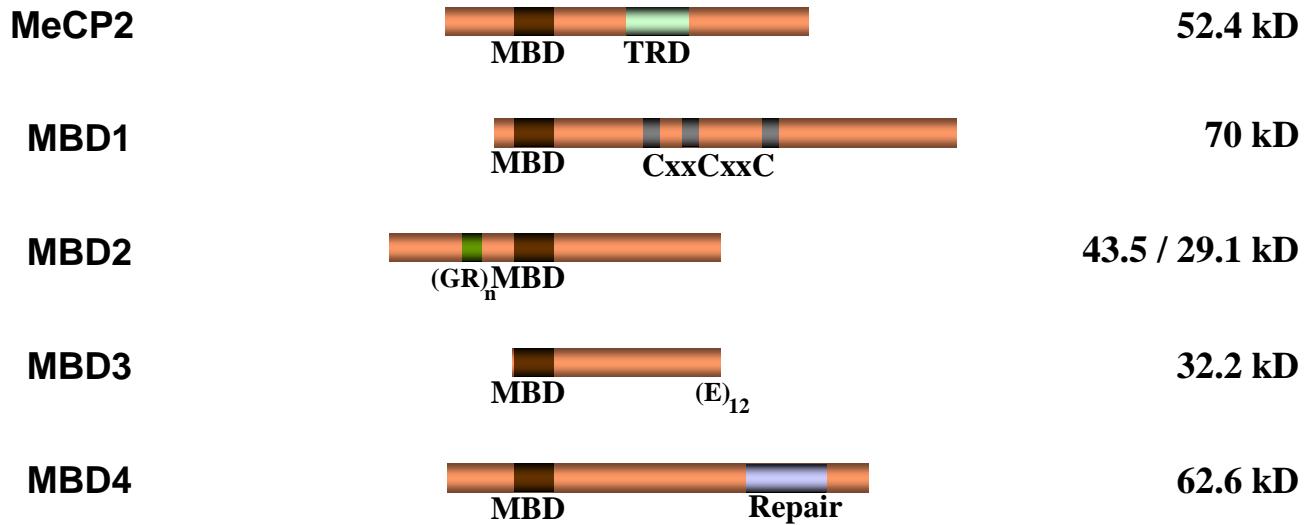
Varias funciones celulares alteradas i.e. Síndrome de Rett

Alternativas

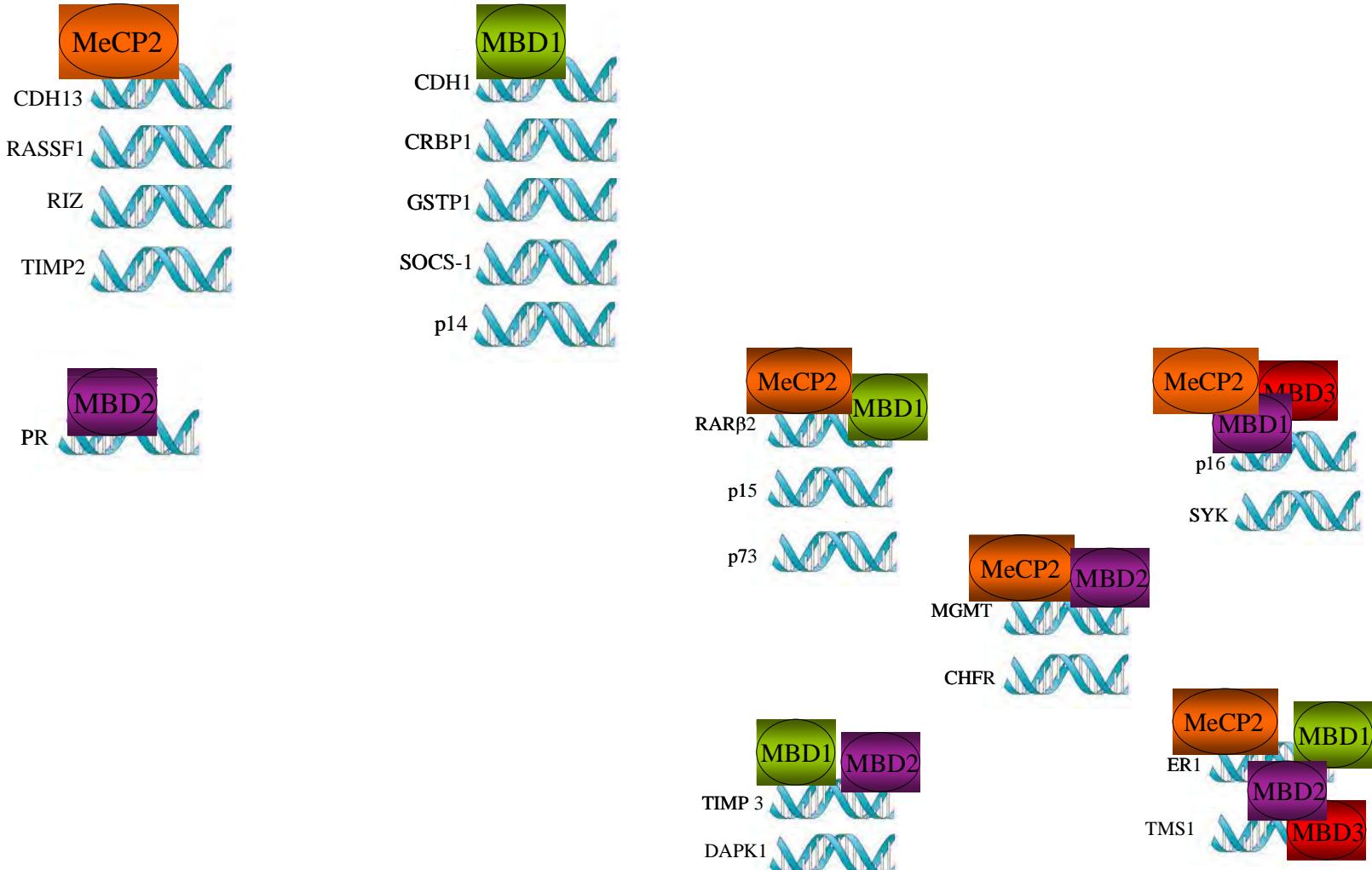
Terapias para proteínas no reguladoras de alteradas

Identificar genes alterados por falta de MeCP2 !!!!

¿Cómo funciona MeCP2?
¿Qué funciones celulares son reguladas por MeCP2?



La célula dispone de varias proteínas reguladoras parecidas a MeCP2



Cuando eliminamos MeCP2 de las células
alteramos muchas funciones

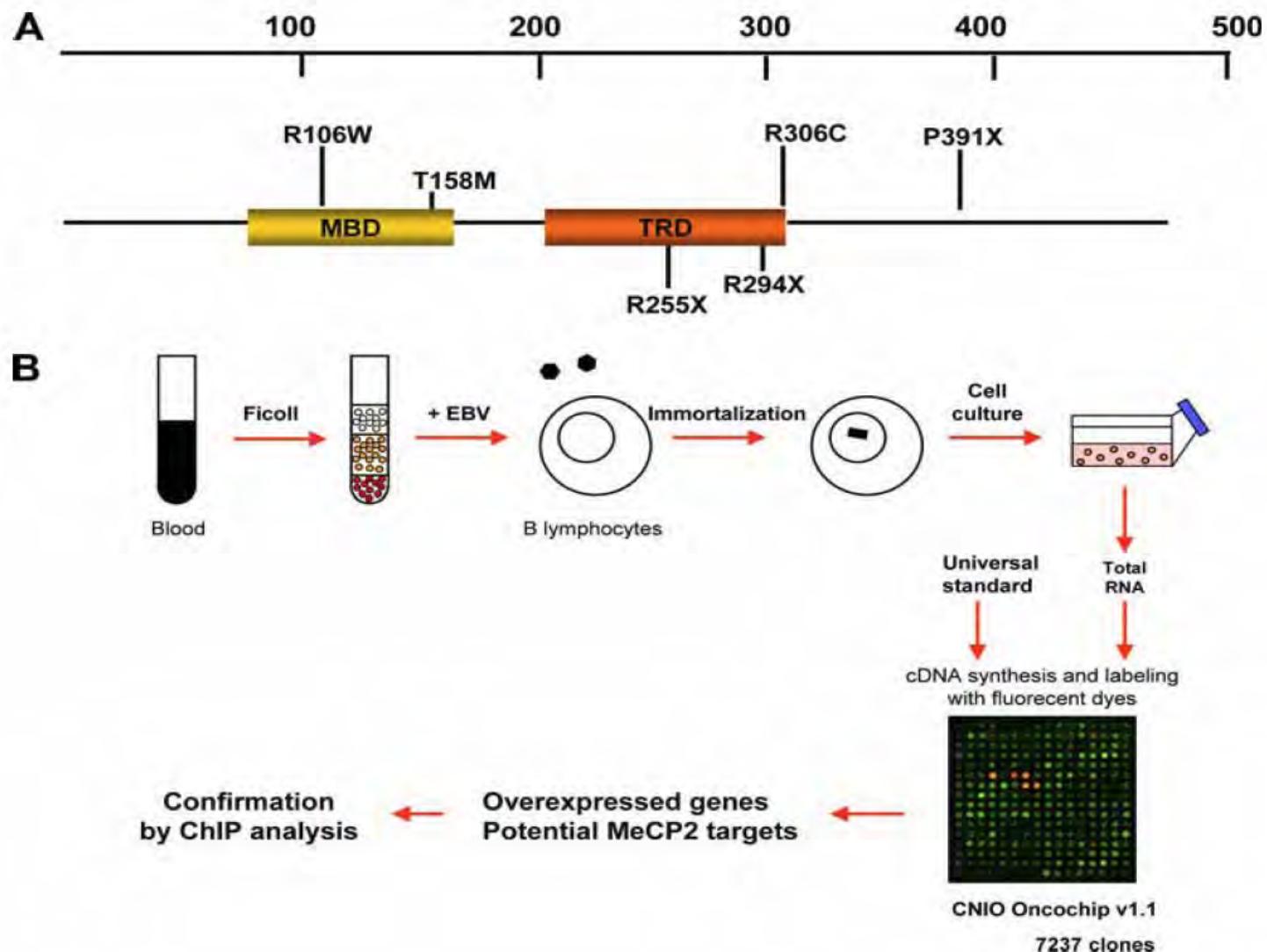
Objetivo fundamental del proyecto

- Determinar qué genes están afectados por la falta de funcionalidad de MeCP2 en niñas Rett mediante chips de ADN

Beneficios del proyecto

- La identificación de los genes afectados por la falta de función de MeCP2 es la forma de realizar un diseño racional de terapias

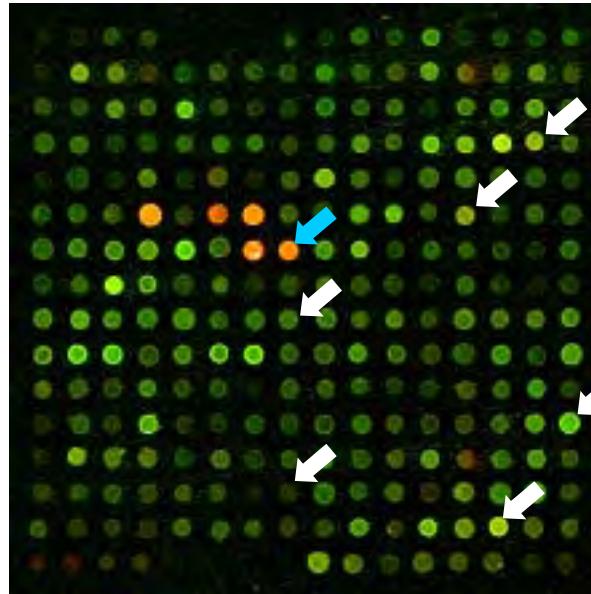
The impact of *MECP2* mutations in the expression patterns of Rett syndrome patients



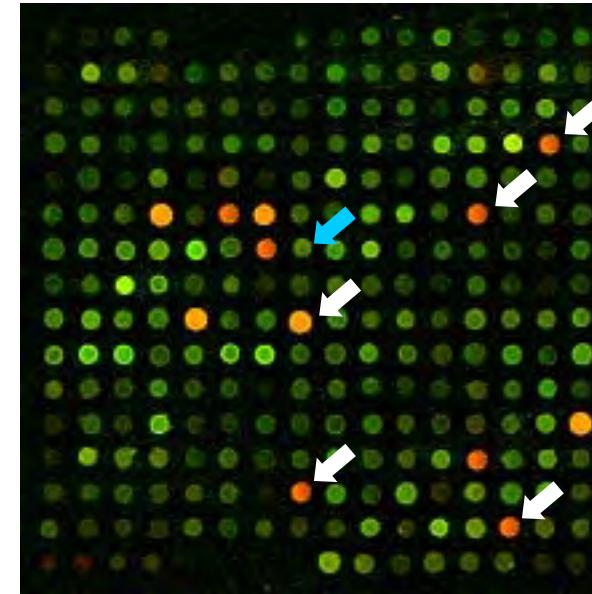
Chips de ADN para determinación de genes con expresión alterada

Obtención de un MAPA de expresión de los pacientes Rett

Muestra control



Paciente Rett, R255X

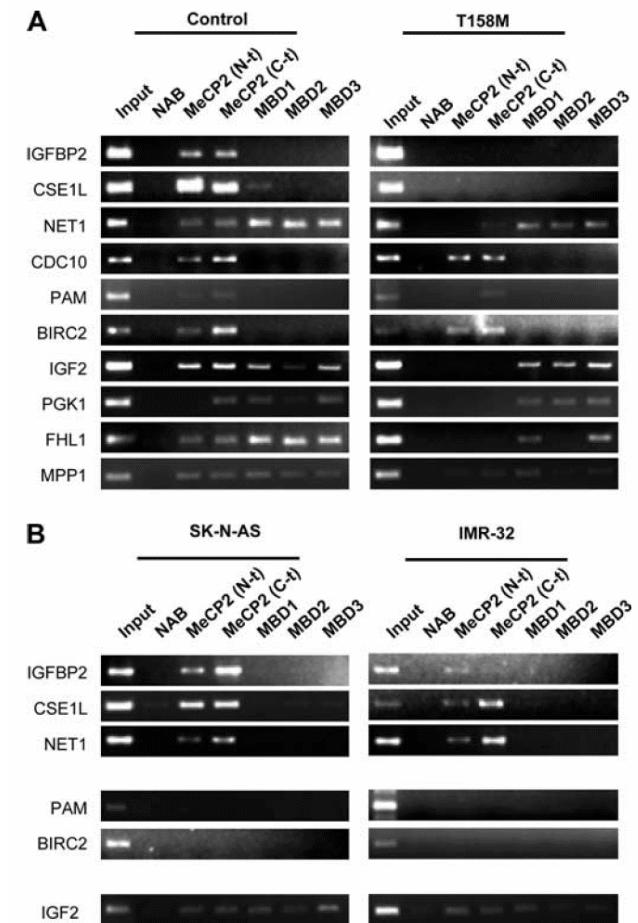
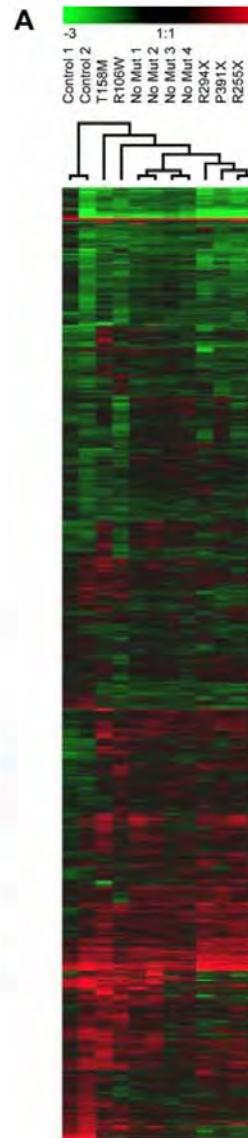
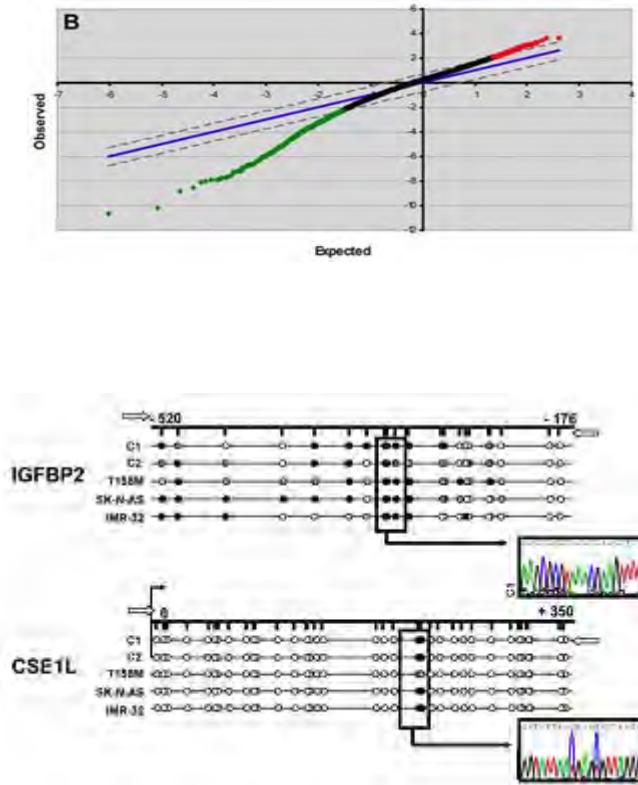


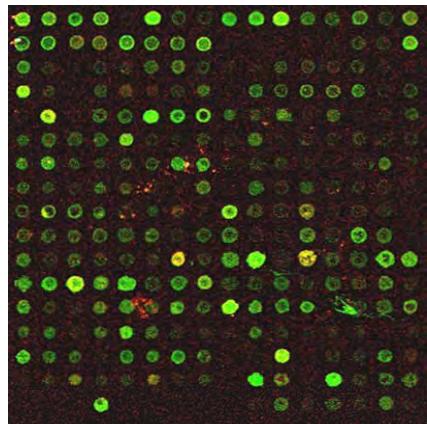
Esteban Ballestar · Santiago Ropero · Miguel Alaminos
Judith Armstrong · Fernando Setien · Ruben Agrelo
Mario F. Fraga · Michel Herranz · Sonia Avila
Mercedes Pineda · Eugenia Monros · Manel Esteller

The impact of *MECP2* mutations in the expression patterns of Rett syndrome patients

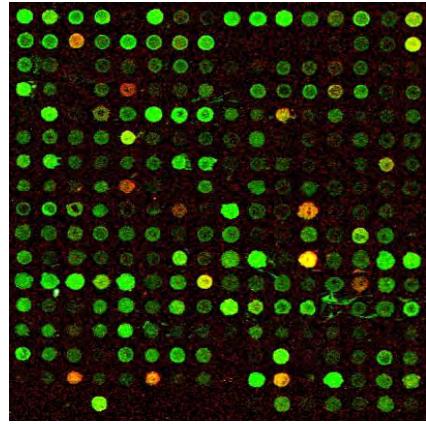
Hum Genet (2005) 116: 91–104

The impact of *MECP2* mutations in the expression patterns of Rett syndrome patients

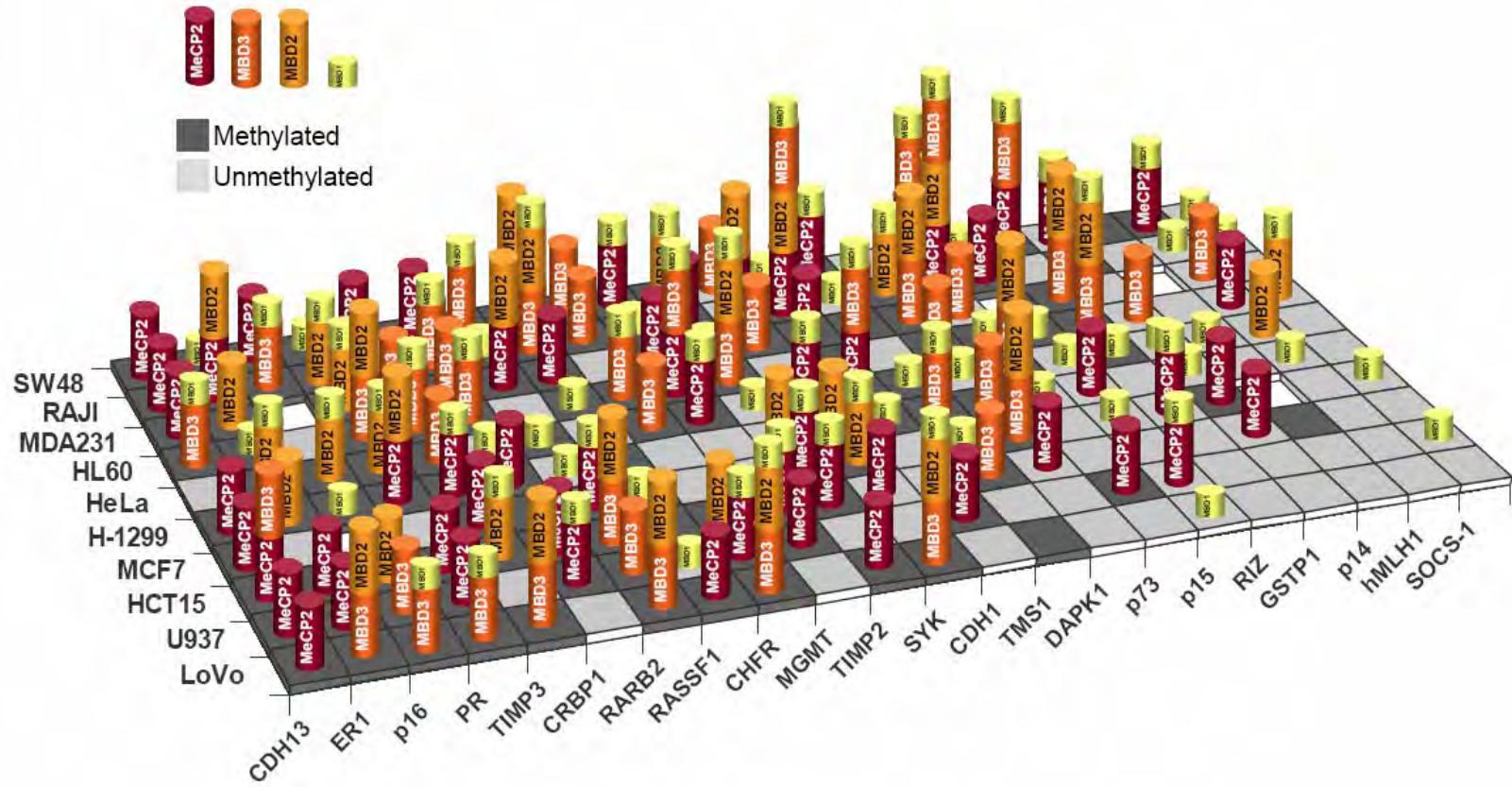




Control



MeCP2 -



**Determinar qué genes están afectados en tejido nervioso
por pérdida de función de MeCP2**



letter

A mouse *Mecp2*-null mutation causes neurological symptoms that mimic Rett syndrome

Jacky Guy¹, Brian Hendrich¹, Megan Holmes², Joanne E. Martin³ & Adrian Bird¹

Rett syndrome (RTT) is an inherited neurodevelopmental disorder of females that occurs once in 10,000–15,000 births^{1,2}. Affected females develop normally for 6–18 months, but then lose voluntary movements, including speech and hand skills. Most RTT patients are heterozygous for mutations in the X-linked gene *MECP2* (refs. 3–12), encoding a protein that binds to methylated sites in genomic DNA and facilitates gene silencing^{13–17}. Previous work with *Mecp2*-null embryonic stem cells indicated that MeCP2 is essential for mouse embryogenesis¹⁸. Here we generate mice lacking *Mecp2* using *Cre-loxP* technol-

ogy. Both *Mecp2*-null mice and mice in which *Mecp2* was deleted in brain showed severe neurological symptoms at approximately six weeks of age. Compensation for absence of MeCP2 in other tissues by MeCP1 (refs. 19,20) was not apparent in genetic or biochemical tests. After several months, heterozygous female mice also showed behavioral symptoms. The overlapping delay before symptom onset in humans and mice, despite their profoundly different rates of development, raises the possibility that stability of brain function, not brain development *per se*, is compromised by the absence of MeCP2.

PLAN de TRABAJO:

1) Obtención y caracterización de los ratones deficientes en MECP2

Aislamiento de encéfalo, mesencéfalo, bulbo raquídeo

2) Análisis mediante microarrays

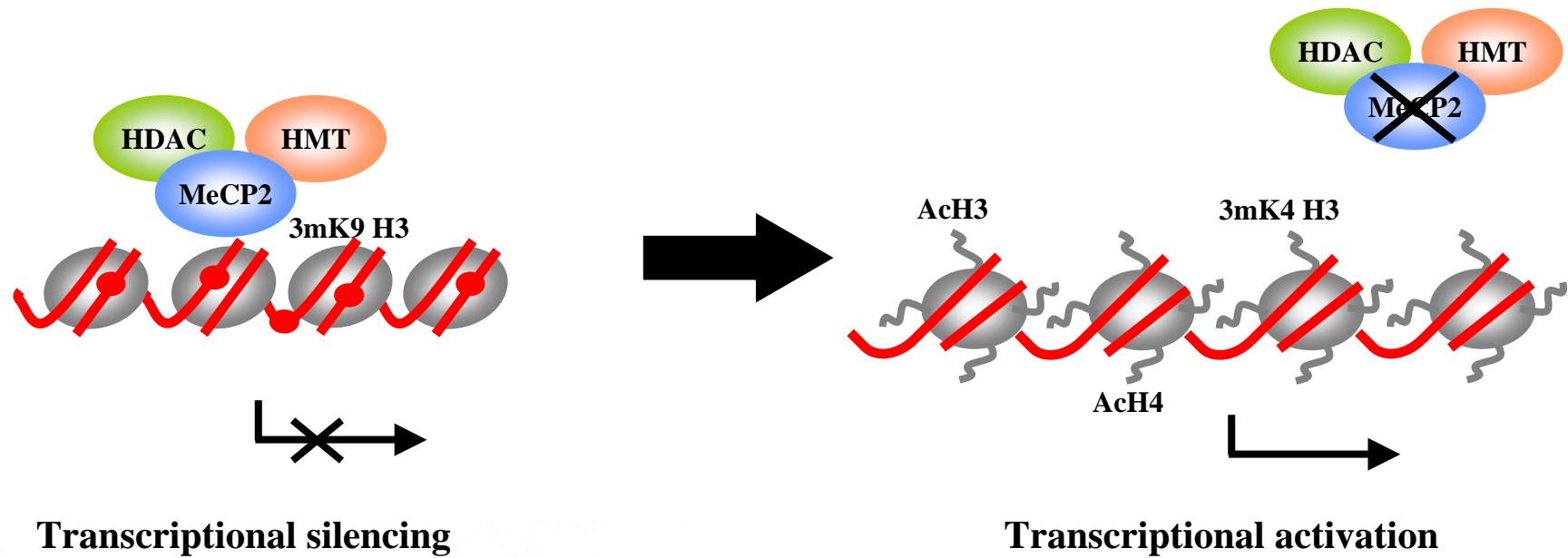
3) Análisis de los cambios de expresión mediante RT-PCR

4) Ensayos de ChIP con anticuerpos MeCP2

6) Análisis global de los cambios de modificación de las histonas

7) Análisis de los cambios de modificación de las histonas en promotores

MeCP2-null mice as a model for Rett syndrome



Looking for transcriptional changes

Wild type mice

Forebrain
Midbrain
Hindbrain



MeCP2-null mice

Forebrain
Midbrain
Hindbrain

RNA Extraction



Amplification



Reverse
transcription and
labeling



Hybridization



Image scanning



Data analysis



**Candidate
overexpressed genes in
MeCP2-null mice**

Gen 1

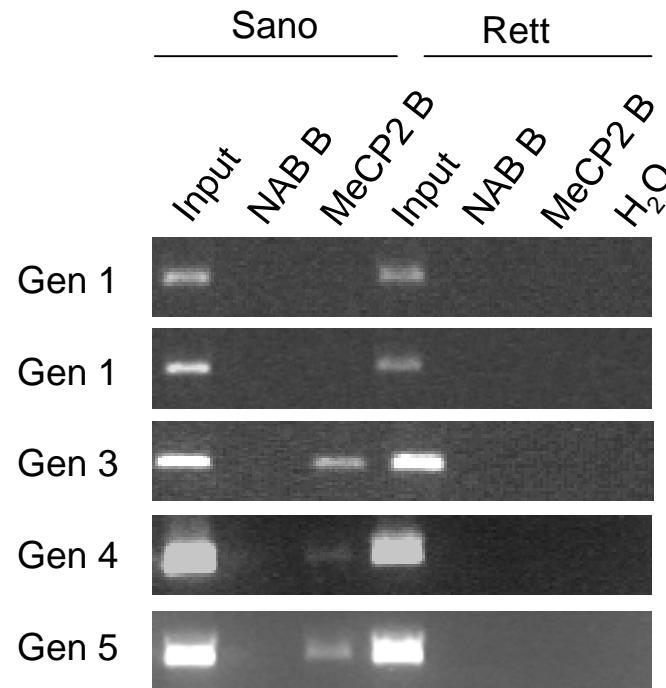
Gen 1

Gen 3

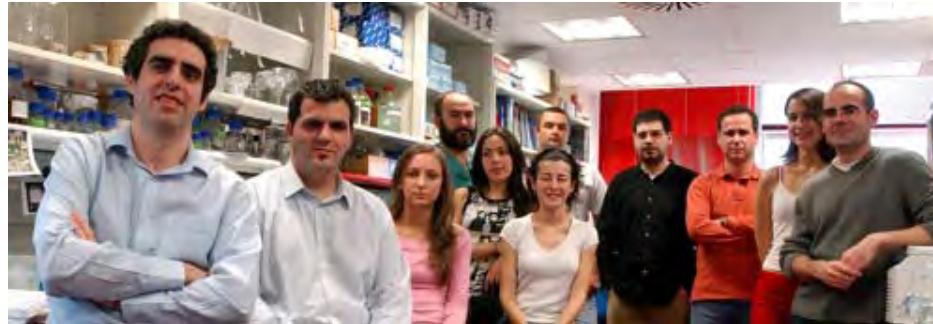
Gen 4

Gen 5

ChIP assays: direct protein-DNA interactions and activation marks



Laboratorio de Epigenética



Manel Esteller

Esteban Ballestar

Maria Berdasco

Sara Casado

Mario F. Fraga

Agustin Fernandez

Rocio Gonzalez

Filipe Jacinto

Pilar Lopez-Nieva

Lidia Lopez-Serra

Isabel Lopez de Silanes

Amaia Lujambio

Paz Quesada

Santiago Ropero

Cecilia Rosales

Fernando Setien

Colaboradores



Dr Mercè Pineda
Dra Eugènia Monròs
Dra Judith Armstrong



**Associació Catalana
de la Síndrome de Rett.**



**ASOCIACION VALENCIANA
SINDROME DE RETT**

**Asociación Valenciana
del Síndrome de Rett**