

**Universidad Nacional Autónoma de México
Campus IZTACALA**

**Efecto del mutageno metil metanosulfonato sobre la
estabilidad de los tripletes repetidos CTG del gen DMPK en
*Escherichia coli***

**Que para obtener el título de
B i ó l o g a
P r e s e n t a:**

Velázquez Bernardino Prisiliana

Director de Tesis: Vo. Bo. Dr. Bulmaro Cisneros Vega



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimientos

Al Dr. Bulmaro Cisneros Vega por darme la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo y por el apoyo incondicional que me brindó a lo largo del trabajo. Gracias

A Maria Leonor Quintero Mora por toda la paciencia y apoyo para que este trabajo se realizara. Gracias por tu amistad y por todo lo que me enseñaste.

A Mario Bermudez por compartir conmigo parte de sus conocimientos. Por su valiosa amistad. Muchas gracias.

A Ricardo González por el todo el apoyo que me brindó para realizar este trabajo. Agradezco infinitamente todos tus consejos.

A Francisco Depardon por el interés y apoyo que mostró en mi trabajo. Gracias por tus consejos y tu amistad.

A Víctor Tapia Ramírez por su apoyo técnico en los cultivos bacterianos para la realización de este trabajo y por su amistad.

A los integrantes del Lab. 12 de Genética y Biología Molecular: Luigi, Rafa, Pablo, Marquitos, Oscarin, Liz, Rosy, por que todos los consejos que recibí de ustedes me han sido muy útiles y por su agradable compañía durante mi estancia en el labo.

A Claus, Julia, Ana, Eli, Lian, Raquel, Elsa, Víctor Chacon, Juan Carlos (slow), Horacio, Marquitos, Roberth, Oscar, Luis Chiquillo, Adrian, Rigo, José Luis y Cesar, por todo lo que hemos compartido juntos y que todavía no termina.

A mis hermanos y hermanas: Pili, Polo, Nino, Sandy, por todo lo que me han enseñado, por la confianza y el apoyo que me han dado, por dejarme ser, pero sobre todo por permitirme formar parte de sus vidas. Muchas gracias.

A Mireya, Chuy, y Leonardo por permitirme conocerlos.

A Dianis, Nayita, Oscarin, Fer, Cesarin, Vale, Regis por todo aquello que los hace especiales e importantes en mi vida.

Dedicatoria

A mis padres: Por todo el apoyo y confianza que me han dado siempre, porque sin ello esto no sería posible.
Gracias por estar conmigo.

ÍNDICE

	Pág.
Resumen	4
Introducción.....	5
a) Inestabilidad de los repetidos CTG.....	7
b) Modelos de estudio	
Antecedentes directos.....	9
a) Efecto del mutágeno MMS.....	12
b) Técnicas para el análisis de tripletes repetidos.....	13
Justificación.....	15
Objetivos	16
·	
Metodología	18
a) Transformación bacteriana.....	19
b) Caracterización por PCR	
c) Aislamiento a baja escala de ADN plasmídico.....	20
d) Mutagénesis.....	21
e) Purificación de ADN plasmídico por columna.....	22
f) Hibridación de ADN tipo Southern Blot	
g) Marcaje radiactivo del oligo con 10rp CTG.....	23
Resultados.....	24
a) Caracterización de los plásmidos que contienen repetidos CTG	

b) Porcentaje de viabilidad de la cepa DH5 α	26
c) Frecuencia de mutantes resistentes a rifampicina.	
d) Efecto del Mutágeno MMS sobre la estabilidad de los repetidos CTG.....	28
Discusión.....	34
Conclusiones.....	38
Literatura citada.....	39

Resumen

La expansión de trinucleótidos repetidos está asociada con varias enfermedades genéticas hereditarias entre las que se encuentran la enfermedad de Huntington, el síndrome de X-frágil y Distrofia miotónica, esta última asociada con la expansión de tripletes repetidos CTG. No se conoce aún cual es el mecanismo que causa inestabilidad de dichos tripletes pero se propone que podría ser generado por un paro en el proceso replicativo. En este trabajo se decidió estudiar el efecto que causa el mutágeno metil metano sulfonato (MMS) sobre la estabilidad de tripletes repetidos CTG insertos en el plásmido pcDNA-CAT 3'UTR con 5, 45 y 90 repetidos (rp) ya que al ser un agente alquilante podría provocar un paro en la ADN polimerasa. Así, se transformó a la cepa bacteriana DH5 α con dicho plásmido para ensayos de mutagénesis; para medir el efecto provocado por el MMS sobre los repetidos se extrajeron los plásmidos de las cepas mutagenizadas y se analizaron por restricción y por PCR seguido de la hibridación con el oligonucleótido de 10 rp CTG. Los resultados demuestran que el plásmido que porta mayor número de repetidos es mucho más inestable con respecto a los que tienen 5 y 45 rp y esta inestabilidad se incrementa en presencia del mutágeno. Estos resultados sugieren que el mutágeno provoca un paro en la ADN polimerasa permitiendo que las cadenas complementarias permanezcan por más tiempo separadas generando estructuras secundarias que a su vez podrían provocar tanto eliminaciones como expansiones de tripletes.

Introducción

La expansión de trinucleótidos repetidos en el genoma humano es la causa de varias enfermedades genéticas. Estos desórdenes pueden ser divididos en dos grupos: Grupo I, involucra la expansión de repetidos CAG en la región codificadora, lo que origina una región de poliglutaminas en el producto proteico. El grupo II, involucra la expansión de trinucleótidos repetidos en regiones no codificadoras del gen; en este caso, los mecanismos que conllevan a la enfermedad son muy diversos (Sanjeeva y Housman, 1997). Una característica significativa de los dos grupos de desórdenes es el umbral de la longitud de las expansiones que causan la presencia de la patología. En el grupo I es de 40-70 repetidos (rp), mientras que en los desórdenes del grupo II el tamaño es desde 50 hasta varios cientos o miles de repetidos (Timchenko y Caskey, 1999). La distrofia miotónica (DM), que corresponde al grupo II, está asociada con la expansión de los tripletes CTG en la región 3'UTR del gen mionin protein cinasa (*dmpk*) que se ubica en el cromosoma 19q 13.2-q13.3 (Tian *et al.*, 2000). Un incremento en el número de repetidos da como resultado una mayor severidad en los síntomas y una disminución en la edad de inicio de la enfermedad en generaciones sucesivas; a este fenómeno se le denomina anticipación (Sarkar *et al.*, 1998). La DM es una enfermedad multisistémica de herencia autosómica dominante, donde el fenotipo es altamente variable (Tian *et al.*, 2000). La DM se caracteriza por debilidad muscular, defectos de conducción eléctrica en el corazón y miotonía. Sin embargo, los pacientes presentan además características secundarias como cataratas y diversas patologías en piel, páncreas, el sistema nervioso central y el tracto gastrointestinal (Sanjeeva y Housman, 1997). La localización de los

tripletes CTG sugiere que estos no afectan directamente la estructura de la proteína traducida por el gen, pero podrían afectar la expresión de la MPK de forma indirecta, por ejemplo, por un efecto sobre la transcripción. A este respecto existen reportes en donde la mayoría de los pacientes presentan una reducción en los niveles del ARNm y por lo tanto en la proteína del gen *dmpk* (Dereck y Caskey, 1993). La disminución de los niveles del ARNm puede ser debido a que la expansión de los repetidos desestabiliza el transcrito siendo vulnerable a las nucleasas intracelulares antes de que la secuencia sea traducida (Dereck y Caskey, 1993). Además, es posible que la disminución del producto del gen *dmpk* se deba a que el transcrito mutado forma estructuras secundarias tan complejas que no pueden pasar a través del poro nuclear y por lo tanto no se expresa la proteína (Koch y Leffert, 1998). Con relación a esta hipótesis, existe un trabajo donde se establecen que mutaciones con 57 CTG's tienen un efecto negativo en cis sobre la expresión de proteínas, lo cual resulta de la agregación de transcritos dentro del núcleo. Así mismo, la región 3'UTR DMPK con 200 CUG, inhibe la diferenciación muscular de mioblastos de ratón. Los resultados anteriores proveen evidencia de que las mutaciones DM actúan en cis al reducir la producción de proteínas y en trans como un riboregulador para inhibir la miogénesis (Amack *et al.*, 1991)

Se ha postulado que los transcritos mutantes adquieren una función nueva ya que unen inapropiadamente proteínas a los repetidos CUG (Timchenko *et al.*, 1996). Hay evidencias que apoyan un modelo en donde la acumulación del ARNm mutante contribuye a la patogénesis a través de un efecto transdominante de los repetidos CUG sobre el procesamiento de ARN, esto se logra mediante la alteración de la función de proteínas de unión a

secuencias CUG. En apoyo a esta hipótesis se ha observado que la proteína CUGBP, la cual controla el *splicing* alternativo del receptor de la insulina, se ve afectada en su función debido a la presencia de repetidos CUG expandidos en el transcrito del gen *dmpk*. Por esta razón los pacientes DM tienen un decremento en su respuesta a la insulina. Así mismo el procesamiento del transcrito de la troponina cardiaca se ve alterado en células en cultivo provenientes del músculo estriado de pacientes DM (Philips *et al.*, 1998).

Inestabilidad de los repetidos CTG

Un modelo que explica la expansión de los trinucleótidos repetidos es el deslizamiento de las cadenas complementarias de ADN. En este modelo se propone que durante la replicación del ADN, se lleva a cabo la disociación de la cadena que se está sintetizando de la cadena molde, lo cual es seguido por un deslizamiento y reasociación de las cadenas lo que genera una estructura de horquilla no apareada; si este fenómeno ocurre en la cadena iniciadora puede causar la expansión de repetidos, o una eliminación si ocurre en la cadena molde (Moore *et al.*, 1999).

En un segundo modelo, se postula que las expansiones ocurren después de un deslizamiento de las cadenas durante la síntesis de los fragmentos de Okasaki. En este caso, aunque la cadena de ADN desplazada puede ser blanco para la nucleasa FEN 1, la formación de horquillas en esta cadena puede hacerla resistente, lo cual da como resultado finalmente una frecuencia elevada de expansiones, más que eliminaciones. (Moore *et al.*, 1999)

Se sugiere que la recombinación puede jugar un papel importante en la inestabilidad de los repetidos. En estudios realizados en cepas de levadura

Rad27, las cuales exhiben altos niveles de recombinación, se observó que las estructuras resistentes a la nucleasa FEN-1 son susceptibles a rompimiento de doble cadena (DSBs) generando un extremo 3'OH que puede ser procesado por diferentes vías para generar la expansión. Las uniones Holliday serían intermediarios en este modelo y en este paso pueden incorporarse un mayor número de repetidos. Este proceso puede producir tanto conversión génica como entrecruzamiento (Usdin y Grabezyk, 2000). La recombinación homóloga en células de mamíferos da como resultado la conversión génica más que en entrecruzamientos, por lo tanto, los modelos que no involucran uniones Holliday explicarían las expansiones. Uno de estos modelos sugiere que en el alineamiento de la cadena dependiente de síntesis, ocurre la invasión de un molde homólogo por el extremo 3'OH, lo cual es seguido por la síntesis del ADN y el desenrollamiento de la cadena recién sintetizada del alelo donador. Estos procesos pueden ser repetidos muchas veces antes de que las cadenas del alelo aceptor se realineen; el resultado de esto puede ser una expansión en donde el alelo donador no cambia. (Usdin y Grabezyk, 2000).

Modelos de estudio:

La inestabilidad de los tripletes repetidos presentes en enfermedades humanas también ha sido observada en otros modelos de estudio como *E.coli*, levaduras, ratones transgénicos y células de pacientes en cultivo. Mediante el estudio del modelo procariótico de *E. coli*, se ha estimado que la frecuencia de expansión y eliminación de los repetidos está determinada por la ubicación de estos con respecto a la dirección de la replicación (Sarkar *et al.*, 1998). Kang *et al.* 1995, encontraron que las expansiones ocurren más frecuentemente

cuando los CTGs están situados en la cadena líder que cuando se localizan en la cadena retardada; por otra parte, las eliminaciones son más frecuentes cuando dichos CTGs están en la cadena retardada. La replicación del ADN-B duplex requiere la separación de las dos cadenas parentales, en este proceso las cadenas sencillas tienen la oportunidad de formar estructuras secundarias en la región de los repetidos.

Se sabe que la estabilidad que presentan las estructuras secundarias es mayor por el apareamiento C:G de los tripletes repetidos CTG que la que se presenta en secuencias CAG (Mitas, 1997). De hecho, se piensa que la ADN polimerasa tiene problemas para replicar regiones ricas en GC (Dereck y Caskey, 1993).

Antecedentes directos

Kang *et al.*, (1996) desarrollaron un sistema para tratar de elucidar los mecanismos que conllevan a la expansión de tripletes repetidos CTG en *E. coli*. Empleando dos interrupciones (CTA) dentro de la secuencia de repetidos CTG, como un marcador de localización de la región proximal y distal, con respecto al origen de replicación, encontraron que las expansiones en secuencias grandes de repetidos ocurren por medio de un solo evento más que por una acumulación de pequeñas expansiones. Por lo anterior, los autores proponen que debe ocurrir un fuerte bloqueo sobre la ADN polimerasa, previo al desplazamiento, provocado por estructuras del ADN o por unión de proteínas presentes en los nucleosomas. Así mismo, encontraron que dichas expansiones ocurren con mayor frecuencia en la región distal con respecto al origen de replicación.

Sarkar *et al.*, (1998) describen un sistema bacteriano que recapitula el modelo bimodal de amplificación, donde las expansiones pequeñas predominan en los fragmentos de CTG menores al tamaño de un fragmento de Okasaki, mientras que las expansiones grandes se presentan en fragmentos de repetidos mayores o iguales a un fragmento de Okasaki. Dichas amplificaciones requieren la pérdida de la proteína SbcC, la cual modula el rompimiento de la cadena sencilla de ADN y la degradación del duplex de ADN. Estos resultados sugieren que los intermediarios en la amplificación de los CTGs son las estructuras secundarias de cadena sencilla no clásicas, presentes en los fragmentos de Okasaki y /o el rompimiento de la doble cadena.

Wells *et al.*, (1998) concluyen que el deslizamiento de las cadenas complementarias en la secuencia de tripletes repetidos es probablemente responsable de pequeñas eliminaciones y expansiones en células deficientes en la reparación de ADN, y esto lo relacionan con la gran inestabilidad de los repetidos que se observa en células linfoblastoides de pacientes con DM. Darden y Topal, (1999) al investigar el efecto de sitios abásicos durante la replicación bacteriana de ADN *in vitro*, encontraron que la presencia de un solo sitio abásico induce drásticamente la expansión de los tripletes repetidos. Por lo tanto, parece que las pausas en la replicación son “puntos calientes” para la incorporación anormal de nucleótidos, generando así las expansiones. Además, estos autores encontraron que dicha inestabilidad es dependiente de la longitud del fragmento, ya que al colocar el sitio abásico a la mitad de la secuencia repetida no observaron expansiones. Schmidt *et al.*, (2000), al estudiar el efecto del sistema de reparación metil dirigido (MMR) de *E.coli*

sobre los repetidos CTG, observaron que no hay una dependencia de su orientación en cepas MMR⁻; estos autores sugieren que la dependencia de la orientación en células silvestres es principalmente causada por la presencia de estos genes de reparación. Sus resultados implican que las expansiones y contracciones en bacterias MMR⁻ no son reparadas. Por otro lado, estos autores observaron que la reparación de estas mutaciones, por el sistema MMR, puede faltar, generando grandes contracciones. Ellos demostraron que las contracciones dependientes de mutS aumentan de forma preferencial cuando los repetidos CTG están codificados por la cadena retardada.

Parniewski *et al.*, (2000) reportan que independientemente de su longitud, los repetidos CTG están sujetos a pequeños cambios (<8rp) cuando está inactiva la vía de “reparación de apareamientos erróneos”. Sin embargo, pueden presentarse grandes eliminaciones (>8rp) en los repetidos CTGs cuando la vía de reparación está activa. En este caso la frecuencia de eliminaciones grandes es proporcional a la longitud del fragmento.

Schumacher *et al.*, (2001) reportan que la inducción de la transcripción da como resultado un incremento de eliminaciones grandes de repetidos CTG y una reducción en la frecuencia de expansiones grandes. La sobre-producción de represores de transcripción conduce tanto a incrementar las expansiones como las eliminaciones de repetidos CTGs. Estos autores proponen que el incremento en la inestabilidad de los CTGs, debido al arresto en el proceso de replicación por la interacción de moléculas represoras, genera subsecuentes pausas en la cadena de ADN.

Hashem y Sinden, (2002), empleando un ensayo genético en *E.coli* demuestran que la introducción de un daño en el ADN puede provocar eventos

de reparación que a su vez conducen a un incremento en la tasa de eliminaciones de tripletes repetidos. Mediante el uso de agentes que dañan el ADN como el EMS, ENU, la luz UV y de fármacos como la mitomicina C, estos autores detectaron eliminaciones de tripletes repetidos CTG, los cuales dependían de la longitud y la orientación de los tripletes repetidos.

Efecto del mutágeno MMS:

El proceso de replicación del ADN es susceptible a la inhibición por diferentes lesiones, así, daños al ADN como bases alquiladas, sitios abásicos, dímeros de timina y asociación de proteínas al ADN pueden bloquear la replicación mediada por las ADN polimerasas. El mutágeno Metil metanosulfonato (MMS) produce predominantemente 7-metilguanina y 3-metiladenina (3MeA) pero también un pequeño porcentaje de 0⁶-metilguanina y 0⁴-metiltimina; estas dos últimas lesiones causan desapareamiento de bases mientras que la 3MeA bloquea la replicación. El tratamiento con MMS directamente produce lesiones 3MeA e indirectamente causa la acumulación de sitios abásicos en el genoma, debido a la actividad de la vía de reparación de bases por escisión (NER). Ambas, la 3MeA y las lesiones abásicas inhiben la replicación y se presume que son la causa de los rompimientos de la doble cadena dependientes de replicación. (Hryciw T. *et al*, 2002).

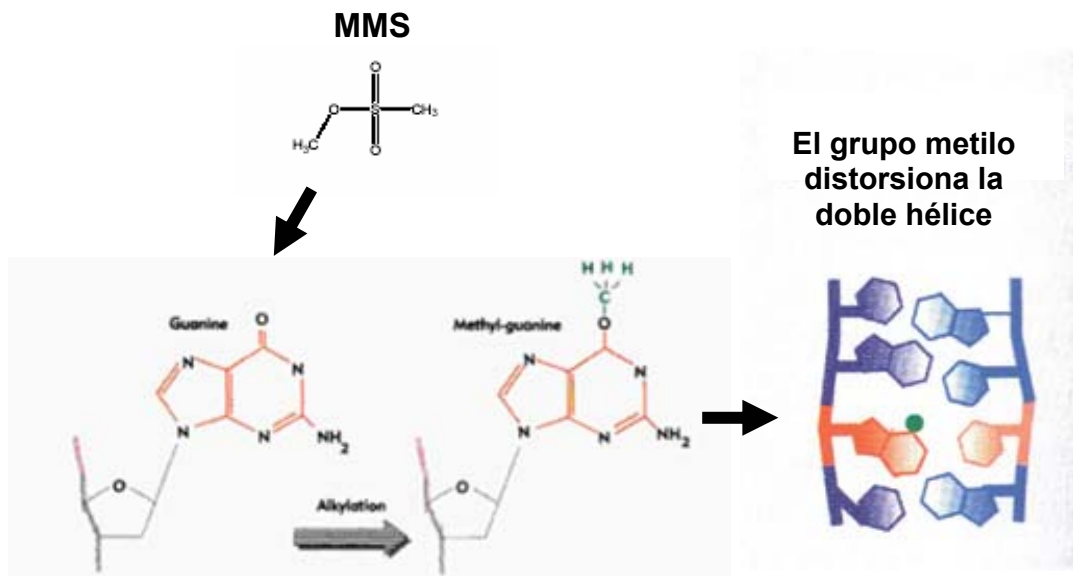


Fig. 1 Mecanismo de acción del mutágeno MMS. La introducción de un grupo metilo en el O⁷ de la guanina provoca la alquilación de la base que ahora se denomina metil guanina. Este fenómeno provoca una distorsión en la doble hélice (Lewin. 2001)

Técnicas utilizadas para el análisis de tripletes repetidos.

Una de las técnicas más usadas para medir la inestabilidad de los repetidos es la reacción en cadena de la ADN polimerasa (que por sus siglas en inglés es denominada **PCR**). Esta técnica permite la amplificación de fragmentos de ADN a partir de una pequeña cantidad de muestra biológica; un par de oligonucleótidos es usado para llevar a cabo una serie de reacciones sintéticas que son catalizadas por la ADN polimerasa. Los oligonucleótidos son complementarios a las cadenas opuestas del ADN molde y flanquean a la secuencia que será amplificada. El ADN molde es primero desnaturalizado y posteriormente se mezcla con una cantidad equimolar de cada oligonucleotido, la ADN polimerasa y los cuatro dNTP's. La mezcla de reacción es enfriada a una temperatura que permita la hibridación de los iniciadores con el ADN molde, después, la ADN polimerasa lleva a cabo la replicación. El ciclo de

desnaturalización, alineamiento y síntesis de ADN se repite muchas veces, así, los productos de la primera ronda de amplificación sirven como molde para la siguiente. Existen reportes que indican que la técnica de PCR no es del todo eficiente para amplificar regiones de trinucleótidos repetidos, ya que cuando dichas regiones sobrepasan los 100 repetidos no se logra su amplificación. Por lo tanto, las enzimas que cortan sitios cercanos a los repetidos y la hibridación tipo *Southern blot*, se han empleado como alternativas para el estudio de la estabilidad de repetidos.

La hibridación tipo **Southern Blot**, consiste en la transferencia de fragmentos de ADN, separados por medio de una electroforesis en geles de agarosa, a una membrana sólida. Posteriormente, los fragmentos de ADN se inmovilizan en la membrana y finalmente, el ADN puede ser sometido a hibridación. Las bandas que se revelan indican que existen fragmentos con secuencias complementarias a la sonda marcada radiactivamente.

Justificación

No se ha podido explicar claramente el fenómeno que causa la inestabilidad de los tripletes repetidos asociados a desordenes genéticos humanos, tal es el caso de los repetidos CTG que están presentes en número anormal en los individuos con Distrofia Miotónica. Se ha propuesto que las pausas que realiza la ADN polimerasa durante la replicación, cuando existen errores en la secuencia de ADN, favorecen la inestabilidad de los tripletes repetidos, lo cual es seguido por la formación de estructuras secundarias no clásicas en el ADN. Dada la complejidad que representa un sistema eucarionte para tratar de estudiar estos mecanismos, se han empleado sistemas procariontes. En base a lo anterior, en el presente trabajo se planteó el uso del mutágeno MMS como una estrategia para provocar pausas en la acción de la ADN polimerasa y de esta manera medir su efecto sobre la estabilidad de los tripletes repetidos CTG empleando un sistema bacteriano.

Objetivos:

General:

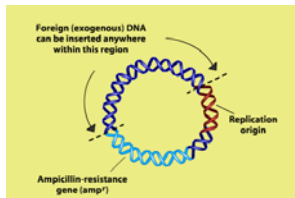
- Estudiar el efecto del mutágeno Metil metano sulfonato sobre la estabilidad de los tripletes repetidos CTG del gen *dmpk* en *E. coli*.

Particulares:

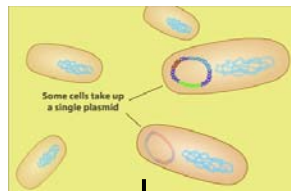
- Caracterizar por PCR los plásmidos que contienen los diferentes números de tripletes repetidos CTG; vectores CAT-CTG0, CAT-CTG5, CAT-CTG45 y CAT-CTG90.
- Transformar a la cepa DH5 α *E.coli*. con los plásmidos CAT-CTG0, CAT-CTG5, CAT-CTG45, CAT-CTG90.
- Evaluar el efecto del MMS sobre la viabilidad de la cepa DH5 α .
- Evaluar el efecto del mutágeno MMS sobre la estabilidad de los repetidos CTG.

Diseño experimental

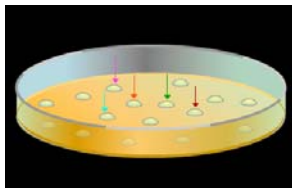
Caracterización de los vectores que portan los repetidos CTG.



Transformación de la cepa DH5 α con los plásmidos portadores de los repetidos CTG.

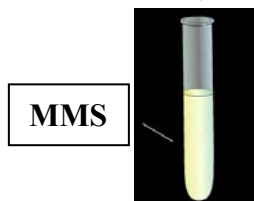


Establecer curva de viabilidad

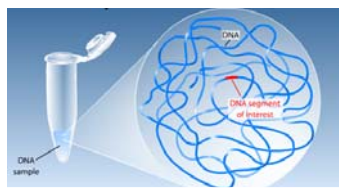


Exposición de la cepa DH5 α al mutágeno MMS

Obtención de la frecuencia de mutación

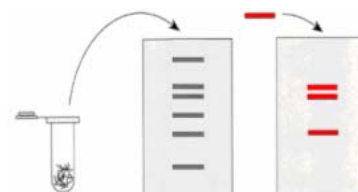


Mutagénesis de la cepa DH5 α transformada con los vectores que portan los repetidos CTG.



Aislamiento de ADN plasmídico de las cepas controles y tratadas con MMS

Análisis del efecto de MMS sobre la estabilidad de los repetidos CTG: Mediante PCR, Hibridación tipo Southern blot.



Metodología.

Se utilizaron cuatro construcciones plasmídicas derivadas del plásmido pcADN (INVITROGEN V790-20) que contienen la región 3'UTR del gen DMPK con 5, 45 y 90 repetidos CTG fusionados al gen reportero CAT. Estas construcciones fueron donadas por el Dr. Robert G. Korneluk. El vector pcADN presenta la señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina y los promotores para las ARN polimerasas T7 y SP6, flanqueando al sitio múltiple de clonación. El vector presenta además los genes de resistencia a neomicina y ampicilina. El gen CAT con la región 3'UTR del gen DMPK esta clonado en los sitios Kpn1 y BamH1, y se encuentra bajo el control del promotor del Citomegalovirus humano.

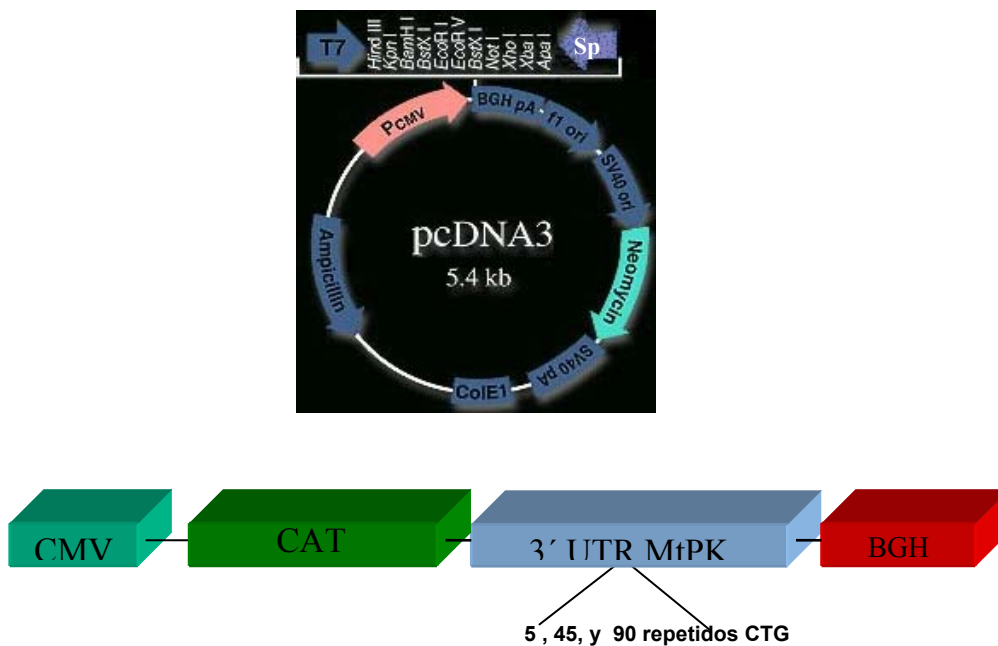


Fig. 2 Esquema de los vectores que portan 5, 45 y 90 repetidos CTG.

Transformación Bacteriana.

Se utilizaron 100µl de células competentes de la cepa DH5α y 20 ng/µl de ADN plasmídico; esta mezcla se incubó 5 min. en hielo y 50 seg. a 42° C para retornarse otros 5 min. a hielo. La reacción se resuspendió en 1ml de medio Luria Bertani (10gr triptona, 5g. de extracto de levadura, 5g de NaCl, 1ml NaOH 1N), se incubó en agitación a 37° C por media hora, después se centrifugó 30 seg. a 12,000 rpm y la pastilla se resuspendió en 200 µl de medio LB. Se espatularon 100µl de la mezcla de transformación en placas de LB + Ampicilina (100µg/ml) para la caracterización posterior de las colonias.

Caracterización por PCR de los plásmidos que portan los repetidos CTG.

Las construcciones se caracterizaron por PCR amplificando la región de los repetidos CTG con los oligonucleótidos CTG 1 (5´GAA GGG TCC TTG TAG CCG GGA A 3´) y CTG 2 (5´GAA GGA TGG AAC ACG GAC GG 3´). Se utilizaron las siguientes condiciones:

Componentes	Concentración final
PCR-Buffer	1X
dNTPs	0.2 Mm
MgCl ₂	1.5 mM
CTG 1	0.5 µM
CTG 2	0.5 µM
ADN molde	100ng
Taq Polimerasa	2.5 U.

Con temperaturas de pre-desnaturalización de 95° C por 5 min., desnaturalización a 94° C por 1min, alineamiento a 62° C por 1 min. y extensión a 72° C por 3 min. Se ejecutaron 25 ciclos. Para el caso del plásmido que contiene 90 rp se adicionaron 5 µl de Dimetil sulfoxido (DMSO) a la mezcla de reacción, lo cual permite el rompimiento de los enlaces de ADN que dan lugar a estructuras secundarias que interrumpen la amplificación de ADN.

Aislamiento a baja escala de ADN plasmídico:

Los plásmidos utilizados se purificaron por el método de lisis alcalina (Sambrook, *et al.*, 1989). A partir de una colonia de células se propagó un cultivo durante toda la noche a 37° C en agitación. En un tubo eppendorf, se centrifugaron 3 ml de cultivo a 12000 rpm durante 30 seg. a 4° C. Posteriormente, se removió el medio por aspiración dejando la pastilla lo más seca posible, se resuspendió en 500ml de STE (0.1 M de NaCl, 10 mM tris HCL pH 8 y 1 mM EDTA) y se centrifugó a 12000 rpm. Enseguida, se secó la pastilla y se resuspendió mediante agitación vigorosa en 100 ml de solución I fría (50 mM de glucosa, 25 mM de tris HCL pH 8 y 10 mM de EDTA pH 8). Se adicionaron 200 ml de la solución II fresca (0.2 N de NaOH y 1% de SDS), se mezcló por inversión y se dejó en hielo durante 10 min. Se agregó 150 ml de la solución III fría (5 M de acetato de potasio y ácido acético glacial) y se agitó fuertemente por inversión por 10 seg. Posteriormente, la mezcla se centrifugó 7 min. a 7000 rpm a una temperatura de 4° C y se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo. Se agregó un volumen igual de fenol cloroformo y se agitó usando el vortex. Posteriormente, se centrifugó 15 seg. a 14000 rpm y la fase acuosa se colocó en un tubo nuevo. Se adicionó un volumen igual de fenol-cloroformo

y se repitió el paso anterior. El sobrenadante se pasó a otro tubo donde se adicionaron 2 volúmenes de etanol absoluto frío y 15ml de acetato de amonio a 7.5 M. La mezcla se incubó a -70° C por 1h. Enseguida se centrifugó por 6 min. a 5000 rpm a temperatura ambiente y se removió el sobrenadante por aspiración. Se limpió la pastilla con 1ml de etanol frío al 70 %, se removió el etanol y se secó la pastilla al aire por 10 min. Finalmente, la pastilla se resuspendió en 30ml de agua con 0.5 ml de ARNsa 50X.

Mutagénesis:

Se cultivaron 10 ml de la cepa DH5 α hasta su fase exponencial (DO. 0.3-0.6 nm) en medio Luria-Bertani (LB), posteriormente, el cultivo se dejó en contacto con el mutágeno metil metano sulfonato (MMS) (Fluka, No. CAS 66-27-3) durante 10 min., 15 min., 20 min. ó 1 hr. El MMS se usó a una concentración de 15 y 20 mM. Posteriormente, para quitar el exceso de mutágeno que no se integró en la bacteria se lavaron las células con una solución amortiguadora de fosfatos. El cultivo se resuspendió nuevamente en medio LB, y se realizaron diluciones de 1:100, 1:10,000 1:1,000,000 y 1:10,000,000. Alícuotas de 100 μ l se espatularon en placas de LB + Amp (100 μ g/ ml) para realizar la cuenta viable y LB + Amp + Rifampicina (50 μ g/ ml) para evaluar la obtención de mutantes resistentes a este antibiótico (Sledziowska y Janion, 1989). Se eligió la concentración de 20mM de MMS y una hora de exposición al mutágeno para los siguientes experimentos.

Purificación de ADN plásmidico por columna.

Posterior al tratamiento con MMS se realizó la purificación de los plásmidos, para lo cual se llevó a cabo el procedimiento de lisis alcalina y posteriormente se empleo una columna con resina de intercambio iónico, de acuerdo con las condiciones del proveedor (QUIAGEN Plasmid Midi/Maxi kits).

Hibridación de ADN tipo Southern Blot.

Para la hibridación se utilizaron 2 µg de ADN plasmídico, previamente cortado con las enzimas de restricción Sac II y Not I. Las enzimas se usaron de acuerdo con las condiciones del proveedor (Gibco-BRL). El ADN restringido se sometió a electroforesis en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Una vez finalizada la electroforesis, el gel se sumergió y se agitó durante 15 min. en la solución amortiguadora de desnaturalización de ADN (NaOH al 0.5 M y NaCl 1.4 M). Enseguida, se colocó el gel en una solución neutralizadora (1 M Tris pH 7.5, 1.5 M NaCl) por 30 min. en agitación. Posteriormente, el gel se puso sobre una membrana de nylon, previamente humedecida 5 min., en H₂O y 5 min en la solución amortiguadora de transferencia 20X SSC (0.34 m NaCl, 3.0 Na₃ Citrato, pH 7). La transferencia de ADN a la membrana de nylon se llevó a cabo empleando la cámara de transferencia POSIBLOT™ (Stratagene), se empleó una hora a una presión de 75 mmHg. Una vez finalizada la transferencia el ADN se fijó a la membrana de nylon exponiéndola por 2 minutos a la luz ultravioleta (254 nm a 0.150 J/cm²) en un Crosslinker CL-1000 (UVP). La hibridación se realizó de acuerdo al protocolo descrito por Ausubel *et al.*, (1998). La membrana de nylon se pre-incubó por 4 hrs. a 65° C con 5 ml de la solución de hibridación (5x SSC. 5x

Denhardt's (FicolTM 400 al 2%, albúmina serica bovina al 2%, polivinilpirrolidona al 2% y 5% de SDS) para bloquear los sitios de la membrana donde no hay ADN unido. Se realizó un recambio de la solución de hibridación adicionando el oligo que contiene 10 rp CTG, previamente marcado radiactivamente con [γ -³²P] ATP; el oligonucleótido se dejó en contacto con la membrana a 65° C durante toda la noche. Posteriormente, la membrana se lavó a 65° C con una solución que contenía SSC y SDS en las siguientes concentraciones:

Baja Astringencia ----- 2x SSC, 0.1% (w/v) SDS ----- 15 min. 1 vez.

Astringencia media ----- 1x SSC, 0.1% (w/v) SDS ----- 5 min. 2 veces

Alta Astringencia ----- 0.1x SSC, 0.1% (w/v) SDS ----- 10 min. 2 veces

Finalmente la membrana se expuso a una placa radiográfica y se reveló para su posterior análisis.

Marcaje radiactivo del oligo con 10rp CTG:

El oligo conteniendo 10 repetidos CTG se marcó radiactivamente con [γ -³²P] ATP, bajo las siguientes condiciones:

5 pmol	Oligo CTG 10
5 X	Solución amortiguadora de intercambio
10 U	T4 Cinasa
2.5ml	ATP [γ - ³² P] (10 μ Ci/ μ l, 3000 Ci/mmol)
15ml	H ₂ O para ajustar el volumen a 25ml

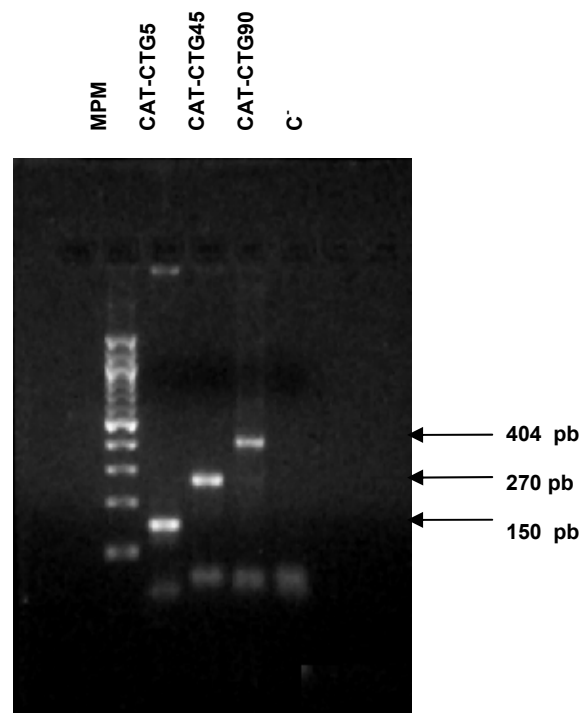
Esta mezcla se incubó en un termociclador (Perkin Elmer) por 30 minutos a 37° C y se detuvo la reacción a 65° C por 10 minutos.

Resultados

Caracterización de los plásmidos que contienen a los repetidos CTG

La caracterización de los plásmidos se llevó a cabo mediante PCR, utilizando los oligonucleótidos CTG1 Y CTG 2 (Ver material y métodos). En la figura 3A se observa que los productos obtenidos corresponden al tamaño esperado, para 5 rp se generó un fragmento de 150pb, para 45 rp de 270 pb y para 90rp de 404 pb. Por lo que respecta a la caracterización con enzimas de restricción, el ADN del vector CAT-CTG0 se cortó con la enzima Pst I y generó un fragmento de 1374 pb. Los vectores CAT-CTG5, CAT-CTG45, CAT-CTG90, se digirieron con la enzima BstX I y se obtuvieron los productos de 764, 929, 1019 pb respectivamente (Fig 3B).

A)



B)

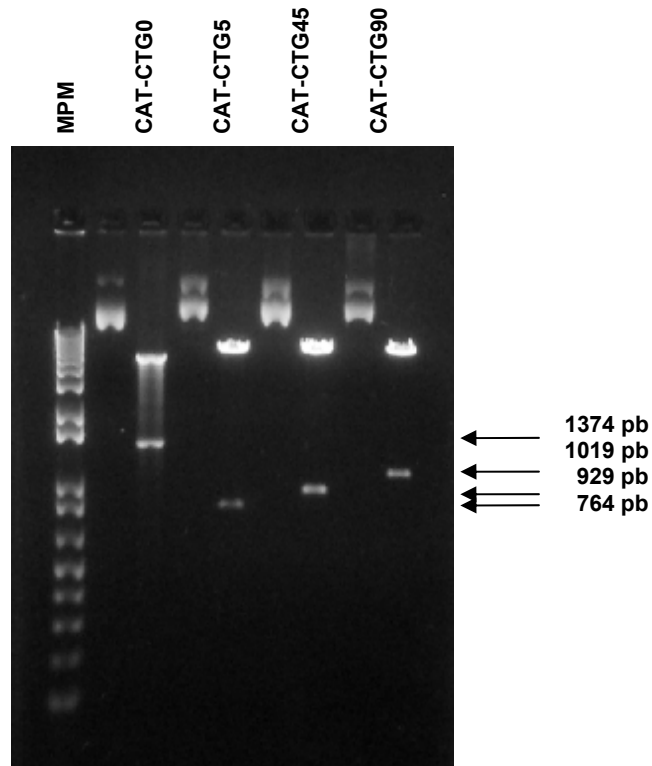


Fig.3 Caracterización de los plásmidos que contienen los repetidos CTG. **A)** Se llevó a cabo la amplificación por PCR de la región que contiene los repetidos empleando los oligos CTG1 y CTG2. Los productos se separaron en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. MPM: marcador de peso molecular (1kb plus); C: control Negativo de la reacción. **B)** Los plásmidos se restringieron con las enzimas Pst I, para el vector CAT-CTG0 y Bstx I para los vectores CAT-CTG5, CAT-CTG45 y CAT-CTG90. Los productos de restricción se separaron en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio.

Porcentaje de viabilidad de la cepa DH5 α sometida a mutagénesis con MMS.

Se realizó la curva de viabilidad de la cepa DH5 α , transformada con el plásmido CTG90, para obtener las condiciones óptimas de mutagénesis. Se tomó como 100% el valor obtenido de la cuenta viable de la cepa que no se

trató con el mutágeno MMS. De esta forma el porcentaje obtenido cuando se empleó una concentración de 15 mM de MMS fue de 22%, y con 20mM de MMS fue de 9% (Fig.4)

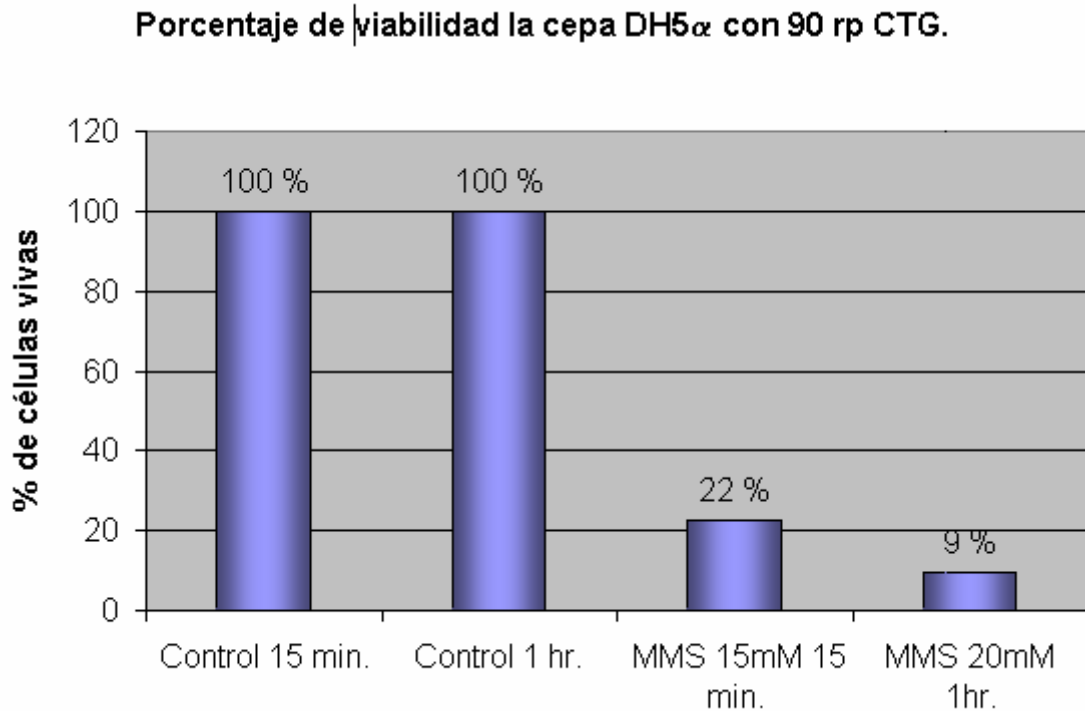
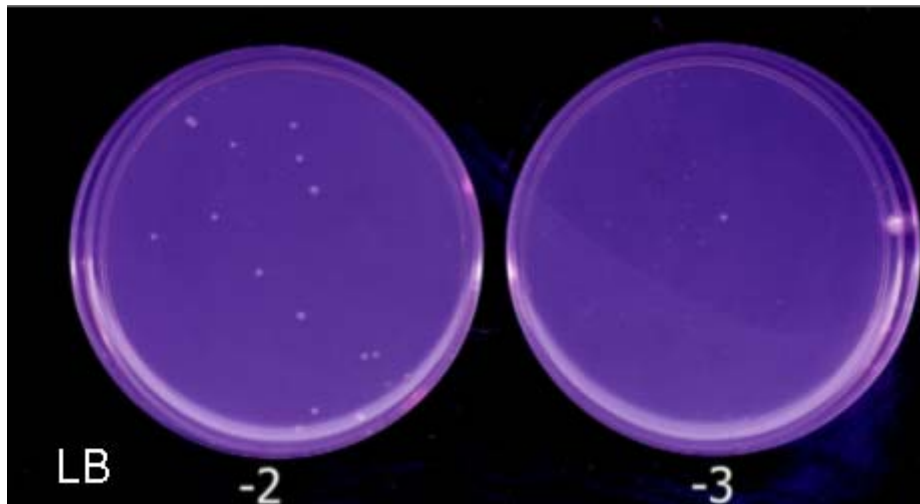


Fig. 4 Porcentaje de viabilidad de la cepa DH5 α expuesta al mutágeno MMS. Los cultivos bacterianos se trataron con 15y 20 mM de MMS durante 15 minutos y 1 hora respectivamente.

Frecuencia de mutantes resistentes a rifampicina.

Para obtener la frecuencia de mutantes resistentes a rifampicina, se plaquearon 100 μ l del cultivo de la cepa DH5 α sometida a mutagénesis. Alícuotas de las diferentes diluciones se plaquearon en cajas de LB con rifampicina. En la figura 5 se observa que no hubo crecimiento en las placas que contienen rifampicina mientras que en las placas control si se observaron colonias.

A)



B)

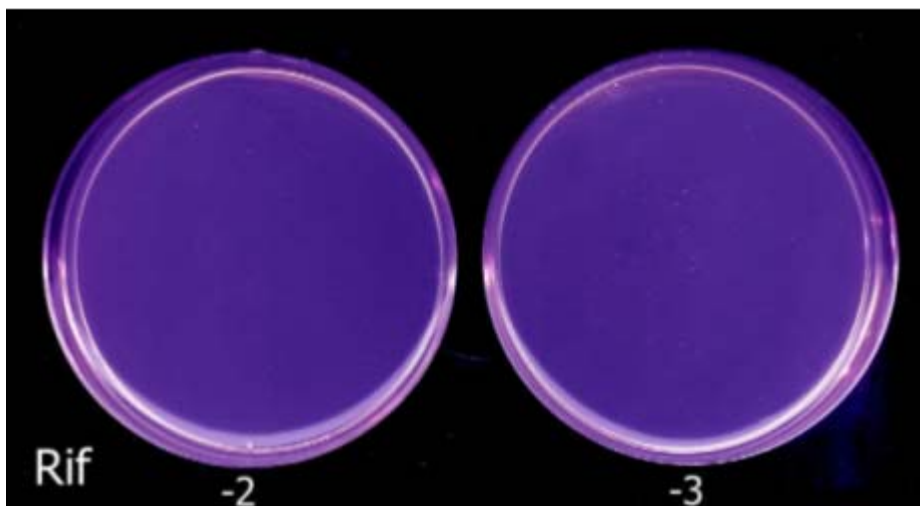


Figura 5. Los cultivos de la cepa DH5 α se trataron con 20 mM de MMS durante una hora y se espatularon 100 μ l en cajas de medio LB con 100 mg/ ml de Ampicilina (A) o con 50 mg/ ml de rifampicina (B). Las diluciones usadas fueron de 1:100 y de 1: 10,000.

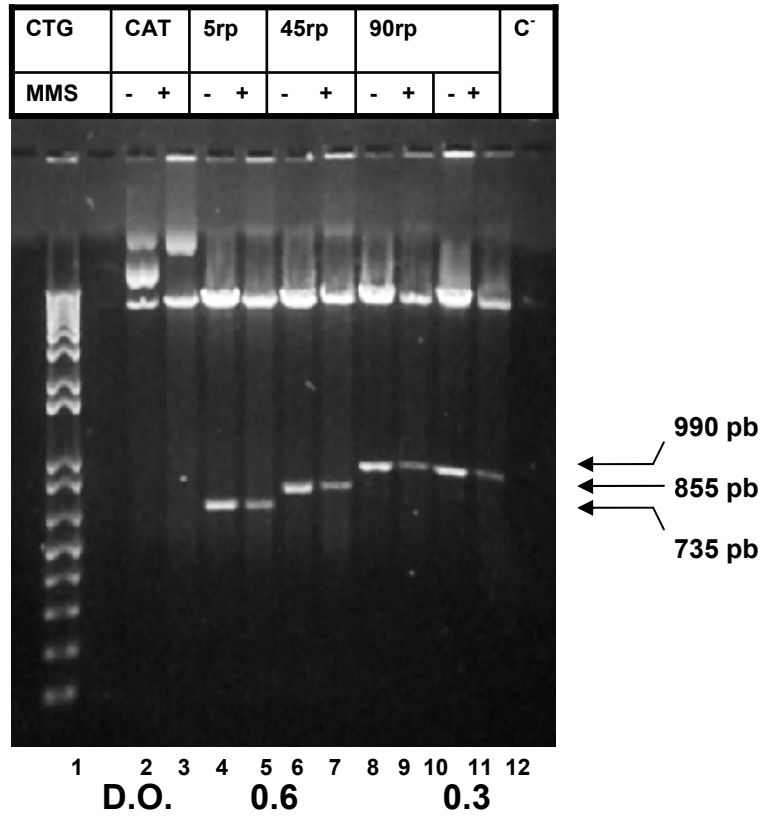
El análisis de la frecuencia de mutación también se realizó con el antibiótico estreptomicina, y el resultado fue el mismo, no se obtuvieron mutantes resistentes a este antibiótico (datos no mostrados).

Efecto del Mutágeno MMS sobre la estabilidad de los repetidos CTG.

A pesar de no obtenerse mutantes resistentes a los antibióticos rifampicina y estreptomicina, decidimos tomar la concentración de 20 mM de MMS para medir el efecto de este mutágeno sobre la estabilidad de los repetidos CTG.

Las células portadoras de los plásmidos de la serie CAT-CTG se trataron durante 1 hora con MMS y posteriormente se aisló el ADN plasmídico para analizar la estabilidad de los repetidos. Los plásmidos mutagenizados se sometieron a restricción con las enzimas Sac II y Not I, las cuales reconocen sitios en el ADN que flanquean la región de los repetidos CTG. Posteriormente, el ADN digerido se separó por medio de electroforesis en un gel de agarosa (Fig. 6A). Debido a que el plásmido que solo porta el gen reportero CAT no contiene el sitio Not sólo se observa su linearización por la acción de la enzima Sac II. En los demás casos, los vectores digeridos liberaron fragmentos en un rango de 735 a 990 pb. Los ADNs se transfirieron a una membrana de nylon para proceder con la hibridación tipo *Southern blot*, para lo cual se usó un oligonucleótido compuesto por 10 CTGs. En la figura 6B se pueden observar los productos radioactivos que se generaron por la hibridación. No observamos cambio alguno en el patrón de hibridación entre los plásmidos sometidos a mutagénesis con respecto a los controles.

A)



B)

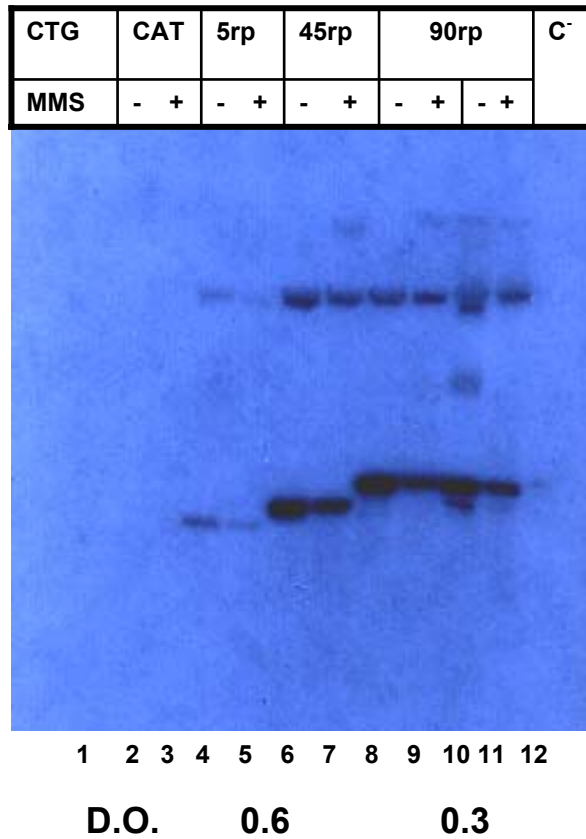
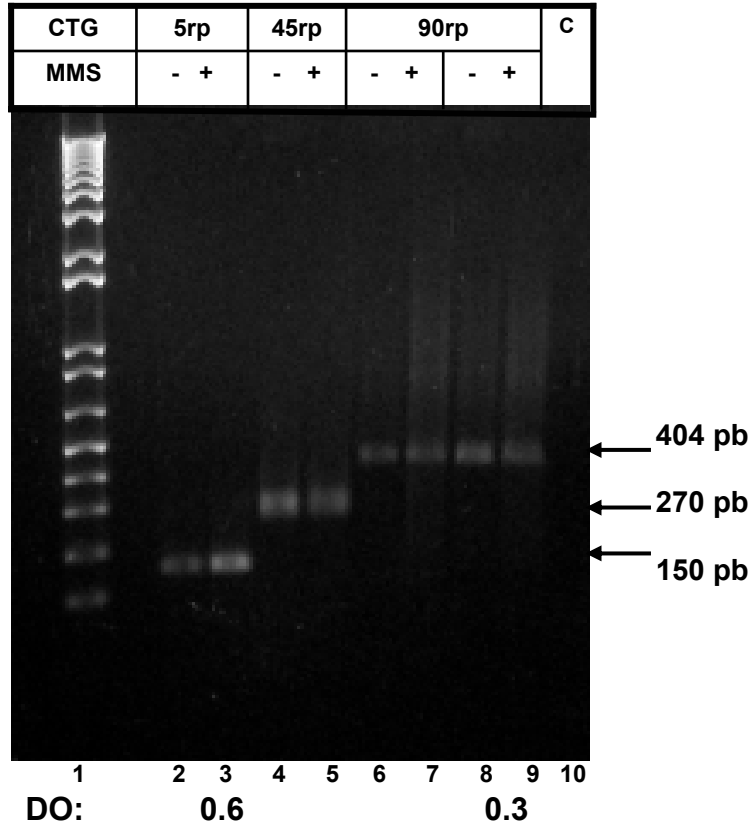


Fig. 6 **A)** Análisis por restricción de los plásmidos de la serie CAT-CTG sometidos a mutagénesis con MMS. **B)** Hibridación de los fragmentos de restricción que contienen repetidos CTG que se muestran en el panel A con el oligo CTG10. El Carril 1 corresponde al marcador de peso molecular. En la parte superior de la figura se indica el número de repetidos que porta cada plásmido en ausencia de MMS(-) y presencia de MMS (+).

Debido a lo anterior, decidimos corroborar los resultados con un ensayo mas fino, por lo que se llevo a cabo un ensayo de PCR sobre las mismas muestras sometidas a mutagénesis. Empleamos los oligos CTG1 y CTG2 que amplifican

la región de ADN que acarrea los repetidos CTG. Como se muestra en la figura 7A, se observó un barrido por arriba de los productos de PCR esperados, este barrido fue visible solamente en los carriles donde se analizó el vector con 90 repetidos, además el barrido fue más intenso en el caso del plásmido sometido a mutagénesis. Con la finalidad de comprobar si los barridos observados correspondían con fragmentos de ADN portadores de repetidos CTG originados por la inestabilidad de los tripletes, se procedió con la transferencia e hibridación de los productos de PCR. En la figura 7B se observa que el vector CTG90 e incluso el vector CTG45 generaron barridos por arriba y por debajo de los productos esperados de PCR. Así mismo, se confirmó que los barridos fueron más intensos en los plásmidos que portaban un número mayor de repetidos. Además se observó que los barridos eran más notorios en los vectores sometidos a tratamiento con MMS. Por otra parte no se obtuvo alguna diferencia cuando se compararon los resultados de la cepa transformada con 90 CTGs crecida a 0.3 o 0.6 densidades ópticas. Se confirmó que los barridos se originaron por la inestabilidad de los repetidos CTG y que el tratamiento con MMS acentúa esta inestabilidad.

A)



B)

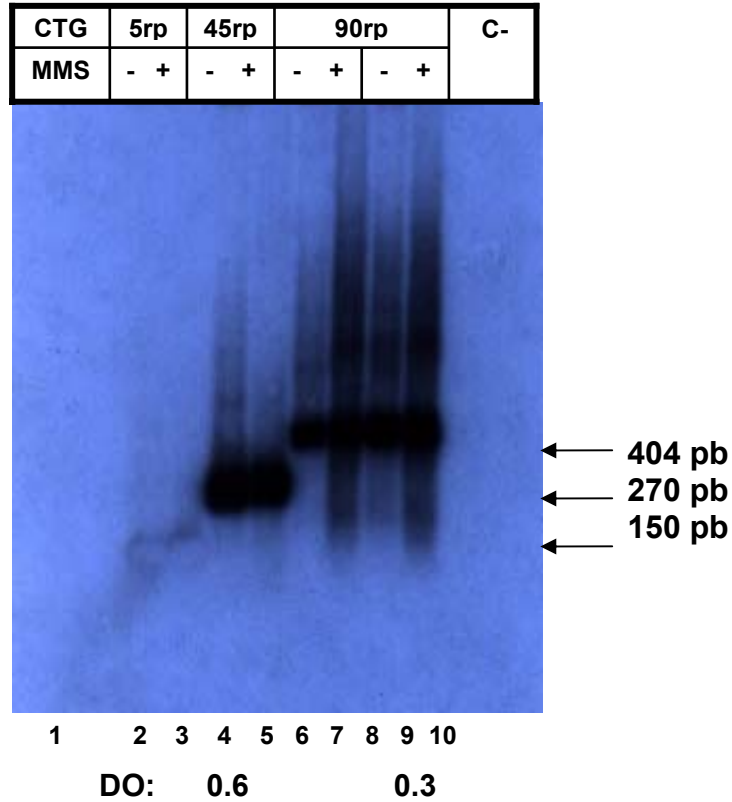


Fig. 7 Análisis por PCR del efecto del mutágeno MMS sobre la estabilidad de los repetidos CTG. Los cultivos se crecieron hasta alcanzar una densidad óptica de 0.6 (carriles, 2-7) o 0.3 (carriles 8 y 9), Se extrajo el ADN y se llevó a cabo el PCR con los oligos CTG1 y CTG2. Los productos de PCR se separaron mediante electroforesis en un gel de agarosa (A). En el panel B se muestra la hibridación de los productos de PCR con el oligo CTG10. En la parte superior de la figura se indica el número de repetidos que porta cada plásmido, en ausencia (-) o presencia (+) de MMS. Marcador de peso molecular (carril1). Control negativo de la reacción (carril 10).

Discusión

Se conoce muy poco acerca de los mecanismos moleculares que provocan la inestabilidad de los fragmentos de tripletes repetidos asociados a enfermedades hereditarias. La mayoría de los trabajos realizados para analizar la inestabilidad de las secuencias mencionadas se han hecho en sistemas bacterianos, ya que son más fáciles de abordar; en estos sistemas se ha observado que la inestabilidad de los tripletes se manifiesta mayoritariamente como eliminaciones, aunque las expansiones también se presentan pero con menor frecuencia. Se ha propuesto que en la inestabilidad de los tripletes repetidos están involucrados varios factores: 1) el tamaño del fragmento repetido (Darden y Topal, 1999, Parniewski *et al.*, 2000, 2) la orientación con respecto al origen de replicación (Kang *et al.*, 1995, Hashem y Sinden 2002), 3) la secuencia de la que se compone el triplete (Usdin y Grabezyk 2000, Mitas 1997), 4) defectos en el sistema de replicación (Darden y Topal 1999, Schumacher *et al.*, 1998, Usdin y Grabezyk 2000 Kang *et al.*, 1996, Pelletier *et al.*, 2003), y 5) defectos en el sistema de reparación (Schmidt *et al.*, 2000, Parniewsky *et al.*, 2000).

En este trabajo analizamos el efecto del mutágeno MMS sobre la estabilidad de los tripletes expandidos CTG. Inicialmente estudiamos la viabilidad de la cepa DH5 α sometida a tratamiento con el mencionado mutágeno. De acuerdo a los resultados que obtuvimos se puede concluir que el MMS tuvo un efecto considerable sobre la viabilidad de la cepa DH5 α (mortalidad del 9% con 20 mM de MMS). Sin embargo, cuando buscamos aislar mutantes resistentes a los antibióticos rifampicina o estreptomicina no se obtuvo resultados positivos. Es posible que el hecho de usar una cepa silvestre

para los genes involucrados en la reparación de ADN haya influido en la nula obtención de mutantes. Por ejemplo, las alteraciones en genes esenciales como el gen de la subunidad β de la ARN polimerasa, cuyas mutaciones confieren la resistencia a rifampicina, seguramente son corregidas por el sistema de reparación de ADN (Kang 1995); también existe la posibilidad de que se hubiera presentado alteraciones en genes diferentes a los analizados.

No obstante los resultados anteriores, decidimos estudiar el efecto del MMS sobre los repetidos CTG, para lo cual analizamos los plásmidos portadores de los diferentes números de tripletes CTG por medio de digestión enzimática o por medio de una reacción de PCR, para amplificar el fragmento que contiene los repetidos CTG. Los productos de digestión y PCR se hibridaron con un oligonucleótido marcado radiactivamente compuesto por 10 repetidos CTG. Cabe mencionar que para los ensayos de PCR se usó el compuesto dimetil sulfoxido, el cual se utiliza para disminuir la temperatura de separación de las cadenas de ADN (t_m) ya que mediante las condiciones estándar el plásmido que contiene 90 CTG no se pudo amplificar, probablemente porque forma algún tipo de estructura secundaria que impide la reacción de PCR. Por medio de digestión enzimática no se observó efecto alguno del mutágeno MMS sobre los tamaños de los fragmentos de digestión. Sin embargo, cuando llevamos cabo la hibridación de los productos de PCR se observa un barrido hacia arriba y hacia debajo de los fragmentos amplificados; de manera interesante, este barrido fue más intenso en los plásmidos que portaban un mayor número de repetidos. Así mismo al comparar un mismo vector antes y después de ser sometido a tratamiento con MMS, se apreció claramente que el barrido era más fuerte en los vectores mutagenizados. Estos

resultados indican que a mayor número de tripletes repetidos CTG se observa una mayor inestabilidad, representada tanto por eliminaciones como expansiones de la secuencia portadora de los repetidos, y que dicha inestabilidad se incrementa por la acción del mutágeno. Nuestros resultados concuerdan con los reportes de Kang et al (1995), Parniewski (2000) y Hashem y Sindem (2002) quienes proponen que la inestabilidad es dependiente de la cantidad de repetidos, ya que aumenta a medida que el número de repetidos originales es mayor. Es pertinente comentar que el plásmido que contiene 5 tripletes no generó señal en la hibridación, probablemente el oligonucleotido de 10 repetidos no fue capaz de hibridar con esta pequeña secuencia, aunque existe la posibilidad de que la señal se haya eliminado al aplicarse lavados astringentes a la membrana. El efecto del MMS sobre la estabilidad de tripletes repetidos CTG se puede explicar mediante la proposición de que este mutágeno bloquea la replicación y permite que las cadenas complementarias permanezcan disociadas por mucho más tiempo que lo normal, dando oportunidad a que se formen estructuras secundarias de horquilla que provocarían eliminaciones de repetidos. Por otro lado, el bloqueo replicativo podría provocar el deslizamiento de la cadena de ADN que se está sintetizando dando lugar a una expansión. El efecto del MMS sobre la estabilidad de repetidos que observamos coincide con los reportes de Hashem y Sindem (2002) quienes utilizando diferentes agentes etilantes encontraron inestabilidad de los repetidos CTG y CAG. Estos autores proponen que la inducción de daño en el ADN da como resultado en eventos de reparación que conduzcan a un incremento en la tasa de eliminaciones de tripletes. El MMS genera bases alquiladas, predominantemente 7MeG y 3MeA, que son

reparadas mediante una glicosilasa. Esta reparación da como resultado la formación de sitios apurínicos o apirimídicos que a su vez son procesados por el sistema de reparación por escisión de nucleótidos (NER) (Beraneck, 1990, Oussatcheva *et al.* 2001, Kapeen *et al.* 2003); este sistema repara aductos que distorsionan la doble hélice mediante la unión de proteínas de reparación como UvrA B y C. La inestabilidad del plásmido que porta 90 repetidos podría ser debida a que la cepa hospedera utilizada presenta un sistema de reparación normal. Cabe mencionar que el sistema NER al igual que el sistema de reparación por apareamientos erróneos (MMR) pueden reconocer estructuras secundarias directamente. Esto nos lleva a proponer que se requiere un bloqueo en la replicación para generar inestabilidad de tripletes repetidos. Esta hipótesis tiene su sustento en los experimentos que demostraron que los tripletes repetidos CTG cercanos al primosoma son más inestables, esto debido a que aproximadamente las primeras 200-400 pb son replicadas por la ADN polimeraza I y después se interrumpe la replicación para que la ADN polimerasa III se ensamble al aparato de replicación y continúe sintetizando el ADN; es esta interrupción en el primosoma la que se propone que estaría generando la inestabilidad de los tripletes repetidos.

Conclusiones:

El MMS provocó una disminución del 78 y 91 % en la viabilidad de la cepa DH5 α cuando se utilizó a concentraciones de 15 mM y 20 mM respectivamente.

El tratamiento con MMS afectó la estabilidad de los repetidos CTG, probablemente por un bloqueo en el proceso replicativo.

Se observó que la inestabilidad de los repetidos CTG aumenta a medida que su número es mayor.

Literatura Citada

Amack J. D., Paguio A. P., Mahadevan M. S. (1999). Cis and trans effects of the myotonic dystrophy (DM) mutation in a cell culture model. *Human Molecular Genetics*, **8**: 1975-1984.

Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D. Seidman J. G., Smith J.A., Strul K, 1998 *Current Protocols in Molecular Biology* Vol. **1** ED. John Wiley & Sons Inc. Harvard Medical School USA. Pág. 2.9.1

Beranek D.T. (1990) . Distribution of methyl and ethyl adducts following alkylation with monofunctional alkylating agents. *Mutation Research*, **231**:11-30.

Darden L.T. y Topal D. M. (1999). Abasic sites induce triplet-repeat expansion during ADN replication *in Vitro*. *The Journal of Biological Chemistry*, **274**(37): 25975-25978.

Dereck P.A. y Caskey C.T.(1993).Trinucleotide repeats and genome variation. *Current Opinion in Genetics and Development*, **3**: 404-407.

Hashem I. V. y Sinden R.R. (2002). Chemotherapeutically induced deletion of expanded triplet repeats. *Mutation Research*, **508**: 107-119.

Hryciw T., Tang M., Fontaine T., Xiao W. (2002). MMS1 protects against replication-dependent ADN damage in *Sacharomyce cerevisiae*. *Molecular Genet Genomics* **266** :848-857.

Kang S., Jaworski A., Oshima K. y Wells R. (1995). Expansion and deletion of CTG repeats from human disease genes are determined by the direction of replication in *E. coli*. *Nature Genetics*, **10**:213-218.

Kang S., Jaworski A., Oshima K. y Wells R. (1996). CTG Triplet repeats from the myotonic dystrophy gene are expanded in *Escherichia coli* distal to the replication origin as a single large event. *JouARNI Molecular Biology*, **258**: 543-547.

Kappen L.S. Xi I, Jones G.B. , Goldberg I H, (2003) Stimulation of ADN strand slippage syntesis by a bulge binding synthetic agent. *Biochemistry*, **42**(7): 2166-2173.

Koch K.S. y Leffert H.L.(1998). Giant hairpins formed by CUG repeats in dystrophy messenger ARNs might sterically block ARN export through nuclear pores. *JouARNI Teory Biology*, **192**:505-514.

Lewin B. (2001). *Genes VII*, Vol. 7 , pág. 15-17.

Mitas M. (1997). Trinucleotide repeats associated with human disease. *Nucleic Acids Research*, **25**(12): 2245-2253

Moore H., Grenwell P.W., Liu P., Arnheim N., Petes T.D. (1999). Triplet repeats form secondary structures that escape ADN repair in yeast. Proc Natl Acad. Sci.USA, **96**: 1504-1509.

Oussatcheva E.A., Hashem V.I., Zou Y., Sinden R.R. Potaman V.N. (2001). Involvement of the trinucleotide excision repair protein UvrA in instability of CAG*CTG repeats secuencias in Escherichia coli. JouARNI Biology Chemistry, **276**: 30878-30884.

Parniewski P. Jaworski A. Wells R.R., Bowater R.P. (2000). Length of CTG*CAG repeats determines the influence of mismatch repair on genetics instability. JouARNI Molecular Biology, **299**:865-874.

Pellietier R., Krasilnikova M.N., Samadashwily G.M. Lahue R. Mirkin S.M. (2003). Replication and expansion of trinucleotide repeats in yeast. Molecular and Cellular Biology, **23**(4):1349-1357.

Philips, A. V., Timchenko, L. T., Cooper, T. A. (1998). Disruption of splicing regulated by a CUG-binding protein in myotonic dystrophy. Science, **280**: 737-741

Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. (1989). Molecular Cloning. A Laboratory Manual 2nd. ed. ED. Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA, pag 1.25.

Sanjeeva R.P. y Housman E.D. (1997). The complex pathology of trinucleotide repeats. *Curret. Biology*, **9**:364-372.

Sarkar P.S., Chang H.C., Boudi F.B., Reddy S. (1998). CTG Repeats show bimodal amplification in *E. coli*. *Cell*, **95**: 531-540.

Schmidt H.K., Abbott M.C. y Leach R.F.D. (2000). Two opposing effects of mismatch repair on CTG repeat instability in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, **35** (2): 463-471.

Schumacher S., Pinet I. y Bichara M. (2001). Modulation of transcription reveals a new mechanism of triplet repeat instability in *Escherichia coli*. *JouARNI Molecular Biology*, **307**:39-49.

Schumacher S., Fuchs R.P., Bichara M. (1998). Expansion of CTG reapeats from Human disease genes is dependient upon replication mechanisms in *Escherichia coli*; The effect of long Patch mismatch repair revisited. *JouARNI Biology Chemistry*, **279** (5):1101-1110.

Sliedziewska G.E. y Janion C.(1989). AlteARNtive pathways of methyl metanesulfonate-induced mutagenesis in *Escherichia coli*. *Molecular Gene Genetics*, **216**: 126-131.

Tian B. White R.J., Xia T., Welle S. Turner, Mathews M.B. y Thornton C. (2000). Expanded CUG repeat ARNs form hairpins that activate the double-

stranded ARN-dependint Protein kinase PKR. ARN, Cambridge University Press, **6**(1):79-87.

Timchenko L.T. y Caskey C.T. (1999). Triplet repeat disorders: Discussion of molecular mechanisms. CMLS Cellular Molecular Life Sciences, **55**: 1432-1447.

Timchenko, L. T., Miller, J. W., Timchenko, N. A., DeVore. D. R.; Datar, K. V.; Lin, L.; Roberts, R.; Caskey, C. T.; Swanson, M. S. (1996). Identification of a (CUG) n triplet repeat ARN-binding protein and its expression in myotonic dystrophy, Nucleic Acids. Research, **24**: 4407-4414,

Usdin K. y Grabezyk E. (2000). ADN repeats expansions and human disease. CMLS Cellular and Molecular Life Sciences, **57**: 914-931.

Wells R.D., Parniewski P., Plucienik A., Bacolla A. Gellibolian R., Jaworski A. (1998). Small slipped register genetic instabilities in *Escherichia coli* in triplet repeat sequences associated with hereditary disease. The JouARNI of Biological Chemistry, **273** (31): 19532-19541.