

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE MEDICINA

**“MUTAGÉNESIS DIRIGIDA EN EL GEN STS Y SU
EFECTO EN LA SULFATASA DE ESTEROIDES”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

P R E S E N T A:

Jaime Toral López

DIRECTOR DE TESIS: Dr. Sergio Alberto Cuevas Covarubias



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM. Por la oportunidad de desarrollarme en mis conocimientos.

A CONACYT (DIC/97/310A/03/063) por su aporte económico, para la compra de los reactivos utilizados en este estudio.

A los miembros del comité tutorial por su paciencia y aporte de sus conocimientos en la dirección de esta tesis.

AGRADECIMIENTO A TITULO PERSONAL

A mi madre[†] quien dio toda su vida, su amor, experiencia y consejos para que lograra algo y que estaría orgullosa de su hijo.

A mi padre por su esfuerzo incondicional y enseñarme de lo que es la vida.

A mis hermanos y hermanas por su apoyo moral incondicional.

A mis hijas Luz Cecilia y Ángela Guadalupe por enseñarme lo que es más importante en mi vida.

A mi esposa por su apoyo, crítica, comprensión y paciencia.

Al Dr Sergio Alberto Cuevas Covarrubias por darme la oportunidad y su confianza en el desarrollo de esta tesis.

INDICE

I. INTRODUCCION	
1.1. Resumen	1
1.2. Summary	2
2. Antecedentes	3
2.1. La ictiosis	3
2.2. La sulfatasa de esteroides	4
2.3. El gen de la sulfatasa de esteroides	7
3. Mutagénesis dirigida	8
4. Transfección génica	10
4.1. Métodos de transfección	10
4.1.1. Métodos virales	11
4.1.1.1. Retrovirus	11
4.1.1.2. Adenovirus	11
4.1.1.3. Virus asociados a adenovirus	11
4.1.1.4. Herpes virus	12
4.2. Métodos no víricos utilizados para transfección	12
4.2.1. Métodos mecánicos y físicos	12
4.2.1.1. Microinyección	12
4.2.1.2. Bombardeo de partículas	12
4.2.1.3. Electroporación	13
4.2.1.4. Rayo láser	13
4.2.1.5. Precipitación con fosfato cálcico	13
4.2.1.6. Liposomas	13
5. El plásmido	14
5.1. Descripción de un plásmido	14
II. PLANTEAMIENTO Y JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO REALIZADO	15
III. HIPÓTESIS	15
IV. OBJETIVOS	15
V. MATERIALES Y REACTIVOS	16
1. Instrumentos	16
2. Cristalería	16
3. Materiales diversos	16
4. Reactivos	17
5. Soluciones	17
6. Material biológico	17
VI. MÉTODOS DE BIOLOGÍA MOLECULAR	18
1.1. Obtención del botón celular	18
1.2. Síntesis de cDNA de <i>STS</i>	18
1.3. Construcción del plásmido recombinante	19
1.3.1. Introducción del sitio de corte para las enzimas <i>EcoRI</i> y <i>BamHI</i> en cDNA del gen <i>STS</i>	19
1.3.2. Digestión del cDNA (<i>STS</i>) de la PCR	21
1.3.3. Obtención del vector	21

1.3.4. Digestión del vector <i>pUC57</i> con <i>EcoRI</i> y <i>BamHI</i> -----	21
1.3.5. Purificación del vector <i>pUC57</i> y del cDNA <i>STS</i> -----	22
1.3.6. Ligación del gen <i>STS</i> con el vector <i>pUC57</i> -----	22
1.4. Mutagénesis dirigida-----	22
1.4.1. Metilación del DNA-----	22
1.4.2. Mutagénesis dirigida en el gen <i>STS</i> -----	22
1.5. Secuenciación del DNA-----	23
1.6. Clonación del plásmido recombinante -----	23
1.6.1 Transformación en células competentes <i>E. Coli DH5αTM-T1^R</i> -----	23
1.6.2. Cultivo bacteriano en placa solida y selección con antibiótico -----	23
1.6.3. Expansión de bacterias transformadas en medio de cultivo liquido -----	23
1.7. Extracción del plásmido recombinante -----	24
1.8. Linealización del plásmido recombinante y análisis mediante digestión enzimática -----	24
1.8. Cultivo celular-----	24
1.8.1. Línea celular-----	24
1.8.2. Medio de cultivo -----	24
1.8.3. Cambio de medio de cultivo-----	25
1.8.3. Criopreservación celular -----	25
1.8.4. Viabilidad celular -----	25
1.9. Transfección del plásmido recombinante mediante lipofección en las células <i>A9</i> -----	26
2. Hibridación <i>in situ</i> con Fluorescencia (FISH) en células <i>A9</i> -----	27
3. Determinación de la actividad enzimática de la sulfatasa de esteroides-----	28
VII. RESULTADOS -----	29
VIII. DISCUSIÓN-----	34
IX. REFERENCIAS-----	36

I. INTRODUCCION

1.1. Resumen

La ictiosis recesiva ligada al cromosoma X (ILX) es un error innato del metabolismo debido a la deficiencia de la enzima sulfatasa de esteroides (SE). Con una frecuencia de 1:2,000-6,000 en varones, se caracteriza por presentar escamas oscuras, adherentes, regulares de distribución generalizada. La SE hidroliza el grupo sulfato de los 3 beta-hidroxiesteroides. Está compuesta de 583 aminoácidos, tiene una vida media de 4 días y se ubica en la membrana del retículo endoplásmico rugoso (RER) en forma de pentámero. Presenta dos dominios intraluminales, ubicándose el sitio de unión al sustrato en la región carboxilo y el sitio catalítico en la región de formilglucina (FG) 75. El gen de la sulfatasa de esteroides (*STS*) se encuentra en Xp22.3, tiene 10 exones y escapa al proceso de inactivación del cromosoma X. La mayoría de los pacientes con ILX (>90%) presenta pérdida total del gen *STS*. Se han reportado, en el gen *STS*, 11 mutaciones puntuales (3 en nuestro grupo) todas en el extremo carboxilo de la enzima, 7 deleciones parciales (2 en nuestro grupo) y recientemente informamos de la primera deleción intragénica (3pb, exón 7). **Problema.** Las mutaciones puntuales reportadas en el gen *STS* se han detectado en la región carboxilo de la SE. No se han reportado mutaciones en el gen *STS* correspondientes al sitio catalítico de la enzima, de tal forma que nuestro problema se limita a ¿Cuál es el cambio *in vitro* en la actividad enzimática de la SE producido por la mutación c1028 A>T en el gen *STS* que produce el cambio Q343L correspondiente a un aminoácido no conservado unido al Ca⁺⁺ en el extremo catalítico de la enzima?

Objetivo: Identificar el efecto que se produce en la actividad enzimática de la SE por la mutación *in vitro* c1028 A>T en el gen *STS* que produce al cambio Q343L en el extremo catalítico del sitio activo de la enzima.

Hipótesis: La mutación *in vitro* c1028 A>T en el gen *STS* que produce el cambio de aminoácido Q343L localizado en el sitio catalítico producirá la actividad enzimática nula de la SE como se ha mostrado en los cambios reportados en el region carboxilo de la SE de pacientes con ILX.

Materiales y métodos. Se realizó mutagénesis dirigida c1028 A>T correspondiente al exón 7 del gen *STS* que produjo el cambio de aminoácido Q343L en el extremo catalítico del sitio activo de la SE. Se llevó a cabo transformación bacteriana previa ligación del cDNA mutado al vector de clonación *pUC57*. Posteriormente se realizó lipofección del plásmido recombinante en las células A9 que carecen del gen *STS* y se analizó su inclusión nuclear con la técnica de hibridación *in situ* fluorescente (FISH). La determinación de la actividad enzimática de la SE, se realizó utilizando sulfato 7-[3H] dehidroepiandrosterona (DHEA-SO₄) como sustrato.

Resultados: La actividad de la enzima SE utilizando DHEA-SO₄ como sustrato en las células transfectadas arrojó niveles de actividad enzimática similar al control sano y muy por encima de las células A9 sin transfección, como también del control negativo (blanco).

Conclusión: La mutación c1028, CAG>CTG, que produce el cambio Q343L, glutamina > leucina, un aminoácido hidrofílico por uno hidrofóbico ubicado en el sitio activo de la enzima SE, genera actividad enzimática. No se observó pérdida de actividad enzimática total como en las células A9 no transfectadas y el blanco. Por lo que la modificación Q343L no altera la actividad enzimática que inicialmente se había propuesto.

1.2. Summary

Ichthyosis X-linked recessive (ILX) is an inborn error of metabolism due to deficiency of the enzyme steroid sulfatase (SE). With a frequency of 1:2,000-6,000 in males, is characterized by dark scales, adherent, regular generalized distribution. The sulfate group is hydrolyzed to the 3 beta-hydroxysteroids. It is composed of 583 amino acids, has a half life of 4 days and is located in the membrane of rough endoplasmic reticulum (RER) as a pentamer. Intraluminal has two domains, placing the substrate binding site in the carboxyl region and the catalytic site in the region of formilglucina (FG) 75. The gene for steroid sulfatase (*STS*) is located in Xp22.3, has 10 exons and escapes the process of X chromosome inactivation. Most patients with ILX (> 90%) had total loss of the *STS* gene. Have been reported in the *STS* gene, 11 mutations (three in our group) all in the carboxy terminus of the enzyme, seven partial deletions (two in our group) and recently reported the first intragenic deletion (3pb, exon 7) .

Problem. Point mutations reported in the *STS* gene were detected in the carboxyl region of the SE. No mutations were informed in the *STS* gene for the enzyme catalytic site, so that our problem is limited to what is the change *in vitro* enzymatic activity of SE produced by mutation c1028 A> T in *STS* gene that produces the change corresponding to an unpreserved amino acid Q343L linked to Ca⁺⁺ at the catalytic end of the enzyme?.

Objective: To identify the *in vitro* effect that occurs in the enzymatic activity of SE by mutation c1028 A> T in the *STS* gene that produces change Q343L at the catalytic end, active site of the enzyme.

Hypothesis: Mutation *in vitro* c1028 A> T in the *STS* gene that produces the Q343L amino acid change, located in the catalytic site produced no enzyme activity of the SE as shown in the reported changes in the SE carboxyl site of the ILX patients.

Materials and methods. Directed mutagenesis c1028 A> T was performed corresponding to exon 7 of the *STS* gene that produced the amino acid change Q343L in the catalytic end, active site of the SE. Was carried out bacterial transformation after ligation of mutated cDNA with cloning vector pUC57. Later, we made recombinant plasmid lipofection in A9 cells, lacking the *STS* gene and analyzed nuclear inclusion with the technique of fluorescence in situ hybridization (FISH). The determination of the enzymatic activity of SE was performed using sulphate 7-[3H] dehydroepiandrosterone (DHEA-SO₄) as substrate.

Results: The activity of the enzyme using as substrate DHEA-SO₄ in the transfected cells showed levels of enzyme activity similar to healthy control, and well above the A9 cells without transfection, as well as the negative control (white).

Conclusion: The mutation c1028, CAG> CTG, which produces the change Q343L, glutamine> leucine, an amino acid hydrophilic by a hydrophobic located in the active site of the enzyme, enzyme activity generates. There was no loss of total enzyme activity as in non-transfected A9 cells and white. So the change does not alter Q343L enzyme activity which was initially proposed.

2. Antecedentes

2.1. Ictiosis ligada al cromosoma X (ILX)

El término ictiosis ha sido empleado por más de 2000 años y proviene de la raíz griega 'ichthys' (ictios) que significa pez. Los hindúes y chinos en el siglo XIX se referían a la enfermedad como una "afección de la piel de serpiente o escamas de pescado" y en la época del médico árabe Avicenna como "albarras nigra". Alibert consideraba que era causada por vivir en áreas cercanas a corrientes de agua estancada, al mar o por ingerir pescado en estado de putrefacción. En 1884, Fox informó el caso del niño cocodrilo, atribuyendo su causa al ataque de un cocodrilo sufrido por la madre durante la gestación. La primera descripción de ictiosis documentada en la literatura médica se encuentra en la obra "On cutaneous diseases" por Robert William en 1908. En 1933, Cockayne fue el primero en usar la clasificación genética siendo reclasificada por Greither en 1964, así como por Touraine en 1958. Wells y Kerr en 1965, estudiando las manifestaciones clínicas y genealógicas, pudieron distinguir a la ictiosis ligada al cromosoma X (ILX) como una enfermedad diferente a las otras ictiosis (1-3). Las ictiosis son un grupo de genodermatosis que se caracterizan por presentar hiperproliferación y/o retención del estrato córneo de la piel, lo que condiciona descamación anormal de la misma (4).

La ILX se ha observado en diferentes grupos étnicos y afecta a 1 de cada 2,000-6,000 varones, en nuestro país no se conoce la ocurrencia de esta entidad. Inicia generalmente durante los primeros meses de vida y los datos clínicos más importantes son la presencia de escamas oscuras, regulares, adherentes y de distribución generalizada. Predominan en cara anterior de abdomen, cuello, zonas de flexión y ambas extremidades. Respetan generalmente palmas de las manos y plantas de los pies (5-9).

Con base en criterios clínicos, bioquímicos, moleculares y forma de herencia son 5 las variedades de ictiosis que se encuentran bien definidas, éstas son: ictiosis vulgar (IV), ictiosis recesiva ligada al cromosoma X (ILX), ictiosis lamelar, eritrodermia ictiosiforme congénita e ictiosis bular o bulosa (Cuadro 1). Siendo la IV y la ILX las más frecuentes. Existen además otras condiciones ictiosiformes genéticamente indefinidas (10-11).

Tipo de ictiosis	Forma de herencia	Incidencia	Características de las escamas	Defecto bioquímico
Vulgar	AD	1:250 rnv	Finas, irregulares y adherentes.	Desconocidos
Ligada al cromosoma X	LX	1:2000 a 6000 Varones	Grandes, oscuras, regulares y adherentes	Deficiencia de SE, aumento de SC y LDL
Lamelar	AD AR	1:300,000 rnv	Grandes, gruesas, bordes elevados	Esterol libre y ceramida.
Bulosa	AD	1:300,000 rnv	Gruesas, verrugosas y oscuras.	Desconocido
Eritrodermia ictiosiforme congénita	AR	1:300,000 Rnv	Finas.	Desconocido.

Cuadro 1. Se muestran las principales características de las ictiosis (2).

AD: Autosómica dominante, AR: Autosómica recesiva, LX: ligada al cromosoma X. SE: Sulfatasa de Esteroides, SC: Sulfato de colesterol, LDL: Lipoproteínas de baja densidad, rnv: recién nacido vivo. Fuente: Modificación de Shwayder y Ott (3).

2.2. La sulfatasa de esteroides (SE)

France y Liggins en 1969 aportaron la primera evidencia de alteraciones en la actividad de la SE (E.C.3.6.1.2.) al demostrar la disminución en la síntesis de estrógenos en mujeres portadoras de la deficiencia placentaria de la enzima. En estas mujeres se encontraron niveles bajos de estriol y retardo en la labor de parto. Posteriormente, en el seguimiento de estas portadoras se demostró la presencia de ILX en sus hijos (12). En 1978 Shapiro y col., encontraron en cultivos de fibroblastos de piel de pacientes con ILX, deficiencia en la actividad de la SE, misma que se había informado en mujeres con deficiencia placentaria de esta enzima (12-13).

La sulfatasa de esteroides (SE), es una enzima de distribución ubicua que hidroliza las uniones éster-sulfato de los sulfatos de esteroides (13). La SE se encuentra unida a la membrana del retículo endoplásmico rugoso (RER), cisterna de Golgi, retículo trans-Golgi y membrana plasmática. La SE ha sido encontrada en tejidos como placenta humana (13-16), fibroblastos, glándula mamaria y trompas de Falopio (16-18, 24). Su pH óptimo oscila entre 6.5-7.5, siendo su K_m de $0.8 \mu M$ para el sulfato de estrona (ES), de $1.7 \mu M$ para el sulfato de dehidroepiandrosterona (DHEAS) y de $0.6 \mu M$ para el sulfato de testosterona (TS) (18-19). En la ILX la deficiencia de SE condiciona la acumulación de sulfato de colesterol en suero, membrana de los eritrocitos y estratos córneo y granuloso de la piel. En condiciones normales, la relación colesterol: sulfato de colesterol en el estrato córneo es de 10:1, sin embargo, en los pacientes con ILX esta relación alcanza proporciones de 1:1. La actividad de la SE es mayor en los estratos córneo y granuloso, en contraste, las porciones basales presentan una actividad de la enzima muy baja. Esto explicaría la acumulación del sulfato de colesterol en las capas superficiales de la piel de pacientes con ILX (13-18).

La SE está compuesta de 583 aminoácidos, los primeros 22 corresponden al péptido líder el cual es escindido postranscripcionalmente para dar origen a la enzima madura de 561 aminoácidos. Este proceso dura aproximadamente 2 días, siendo la vida media de la enzima de 4 días. La enzima activa está formada por múltiples subunidades idénticas, cada una con un peso molecular de 63 kDa, siendo el agregado activo más pequeño un dímero de 126 kDa (18, 20-21). Los extremos N- y C- se localizan en la porción luminal de la membrana RER (22),

La enzima activa o funcional está formada por dos dominios, como fue determinado por cristalografía de rayos X (24), (Figura 1a).

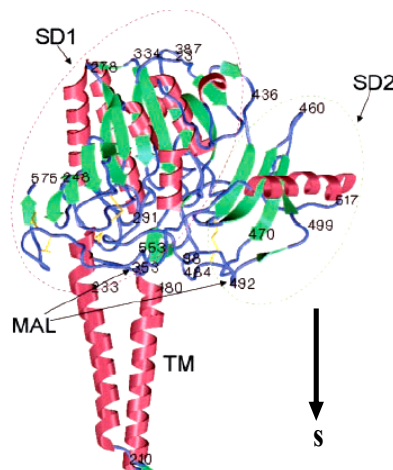


Figura 1 a. Diagrama estereográfico mostrando las estructuras secundaria y terciaria de la SE. Las hojas se muestran en verde y las hélices en rosa. Los números a lo largo del esqueleto denotan la secuencia del aminoácido. SD1 y SD2 los subdominios en el dominio polar y TM el dominio transmembrana son indicados. MAL (membrana-associated loops) son secciones de residuos que tienen interacción putativa con la bicapa lipídica (25).

El dominio globular o polar contiene el sitio activo o catalítico y el dominio transmembranal consiste de 2 α -hélices hidrofóbicas antiparalelas. El dominio polar mayor tiene 2 subdominios con el plegamiento sándwich α/β (Figura 1b).

El subdominio 1 (SD1) se enreda alrededor de la cadena 11 central mezclada con hojas- β , flanqueada por un giro helical de 13/ α hélices conteniendo el centro catalítico.

El subdominio 2 (SD2) consiste de aproximadamente 110 residuos C-terminales y se enreda alrededor de una hoja β antiparalela de cuatro cadenas y es flanqueada por el α hélice 16, que se empaqueta contra regiones de giros y curvas de la hoja β del subdominio 1.

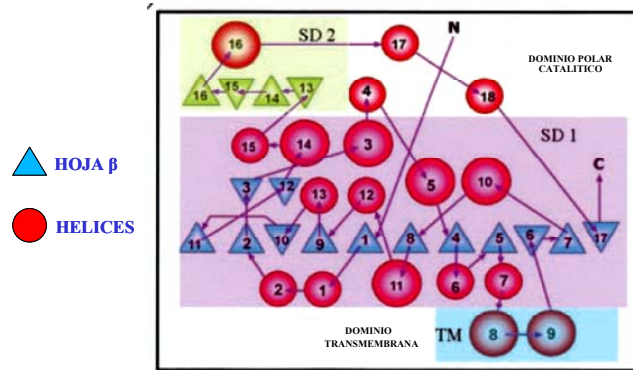


Figura 1b. Topología de plegamiento de SE con hélices en *circulo* y hojas β como *triángulos*. SD1, SD2 y TM están en tres diferentes colores (25).

El SD2 o C-Terminal es importante por la asociación y anclaje del dominio catalítico a la superficie de la membrana (Figura 1a y 1b).

Las dos hélices transmembranales protruyen hacia un lado del dominio polar dando a la molécula completa una apariencia parecida a un “hongo”. La localización del dominio transmembranal es tal que la apertura al sitio activo se entierra profundamente en una cavidad como en la “branquia” del “hongo” que descansa cerca de la superficie de membrana (Figura 1c).

El aminoácido catalítico, hidroxiformilglicina (FG)75, creado por modificación postraduccional de la cisteína (cis) 75 (31) se encuentra unido covalentemente a una molécula de sulfato, como un éster sulfato de FG (FGS). El catión bivalente requerido para la actividad enzimática de la SE es el Ca^{2+} .

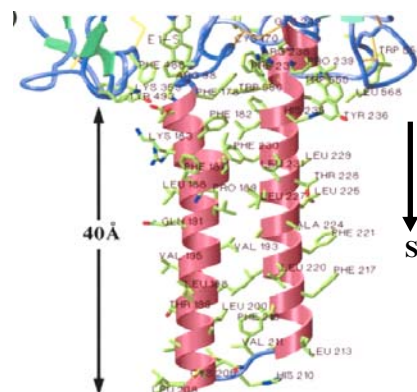


Figura 1 c. Hélices transmembranales. Se muestran cadenas laterales e interfaciales de las hélices. Átomos de carbono están en *verde*, nitrógeno en *azul* y oxígeno en *rojo* (25).

El extremo catalítico del sitio activo en la SE es altamente homólogo a la Arilsulfatasa A y B (ASA y ASB); se han identificado 10 residuos catalíticamente importantes, 9 de los 10 son homólogos en la ASA y ASB que son Asp35, Asp36, FGS75, Arg79, Lis134, His136, His290, Asp342, y Lis368. El 10° residuo es Gln343, un ligando al catión. Los átomos de oxígeno de Asp35, Asp36, Asp342, Gln343 y FGS75 sirven como ligando al catión (distancia del oxígeno entre 2.2 y 2.8 Å). Lis134, Lis368, Arg79, His136 e His290 están involucradas en la catálisis y en la neutralización de las cargas negativas de las moléculas carboxílicas. Los aminoácidos Lis134 y Lis368 cargados positivamente están dentro de la distancia contacto del sulfato de oxígeno de FGS75 (Figura 2a)

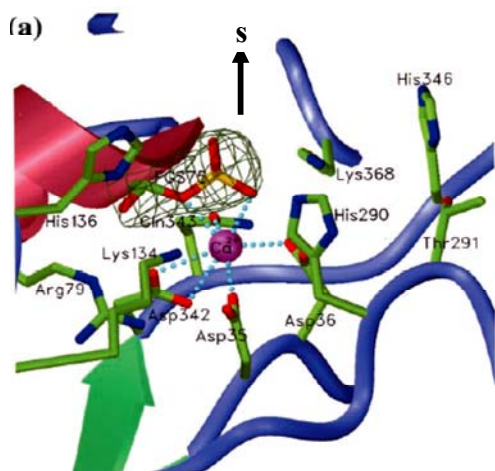


Figura 2a. Residuos catalíticos del sitio activo y la coordinación del Ca⁺⁺. El residuo catalítico FG75 es mostrado con su contorno electro densa final (25). S indica hacia la región TM.

La molécula de sulfato de estrona (E1-S04) se liga al sitio activo con su molécula de sulfato superpuesta con el sulfato de FGS75, observado cristalográficamente, y los residuos de Leu74, Arg 98, Thr 99 Val 101, Leu103, Leu167 Val177, Phe178, Thr180, Gli181, Thr484, His485, Val486, Phe488 se unen alrededor del esqueleto del esteroide, produciendo muchos contactos hidrofóbicos, por lo que se considera que están involucrados en el reconocimiento al sustrato (Figura 2b).

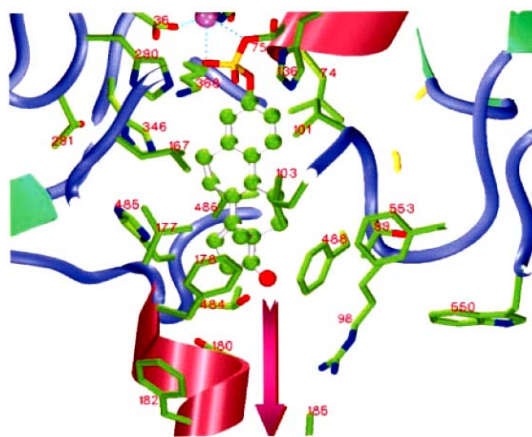


Figura 2 b. Sitio activo mostrando una molécula de E1-SO4 unido covalentemente a FG75. Residuos que pueden tener contacto con la molécula esteroide y residuos que alinean la abertura a la bicapa lipídica (mostrados por la flecha) son ilustrados (25).

La evidencia estructural del dominio transmembranal sugiere que varias regiones de curvas, especialmente dos segmentos polipéptidos, Phe 548 a Leu 568 y Phe 468 a Pro 500 están espacialmente próximas al surco del sitio activo, consistentes de varias cadenas laterales hidrofóbicas muestran alto movimiento térmico, están asociados a la membrana lipídica (24-25).

2.3. El gen de la sulfatasa de esteroides (*STS*)

El gen *STS* codifica a la SE y se localiza en el brazo corto del cromosoma X (Xp22.3) en una región de 146 Kb muy cerca de la región pseudoautosómica. Contiene 10 exones de tamaño variable y dos regiones que no se transcriben, una en el extremo 5' de por lo menos 206 pb y otra más en el extremo 3' de 668 pb. Tiene una señal de poliadenilación (AATAAA) de 13 pb antes del comienzo de la cola de poli-A (26). La región promotora del gen *STS* presenta un bajo contenido de secuencias CpG. En el extremo 5' del gen *STS*, se han identificado varios sitios de inicio de transcripción dentro de una región de 1.3 Kb. (Figura 3) (27). Por otra parte, se han identificado 3 transcritos primarios en distintas líneas celulares, cada uno con pesos moleculares diferentes (2.7, 5.2, y 7.2 Kb), cuya función se desconoce.

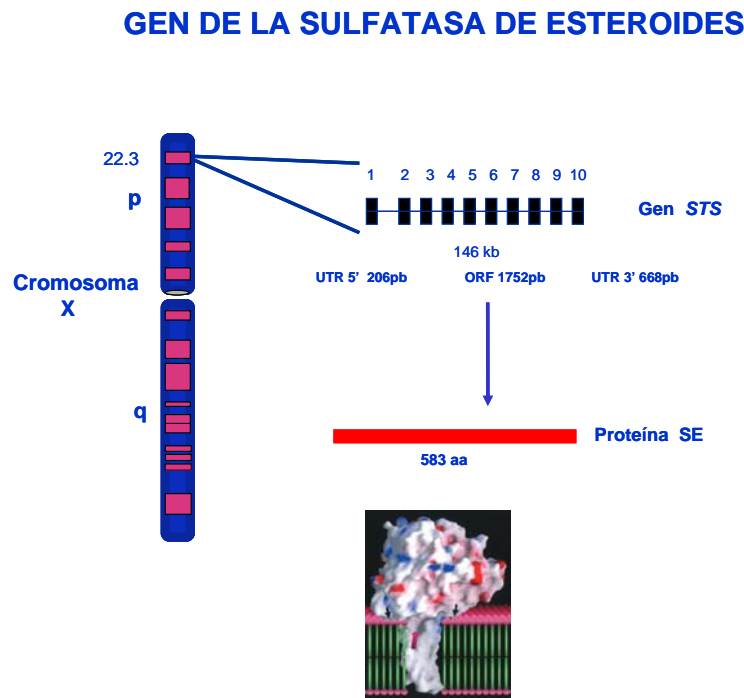


Figura 3. Representación esquemática del gen *STS*, su ubicación en Xp22.3, marco abierto de lectura de 1683pb y su proteína SE de 583 aminoácidos.

La mayoría de los pacientes con ILX (85-90%) presentan pérdida total del gen *STS*. Esta alta incidencia de deleciones puede ser debido a un intercambio aberrante X-Y durante la división mitótica en espermatogonias u ovogonias (17,69) y el mecanismo se debe al mal apareamiento de los locus hipervariables repetidos (llamados CRI-232) en la meiosis

femenina y masculina, conduciendo a recombinación discordante y delección del gen (35,37, 70-83).

Once mutaciones puntuales críticas para el gen STS han sido previamente reportadas, nueve conduciendo a sustituciones de aminoácidos y dos a codón de alto, éstas son: Ser341Leu, Gli344Term, Trp372Arg, Trp372Pro o Ser, Gli380Arg, Gln389Term, His444Arg, Cis446Tir, Arg454His, Arg454Cis, Gln560Pro. Cada una de estas mutaciones resultó en pérdida completa de la actividad enzimática y de ahí la incapacidad del cuerpo para sintetizar hormonas esteroides activas desde sus sulfatos conjugados (figura 4a y b). (33-34, 36, 38, 84-89)

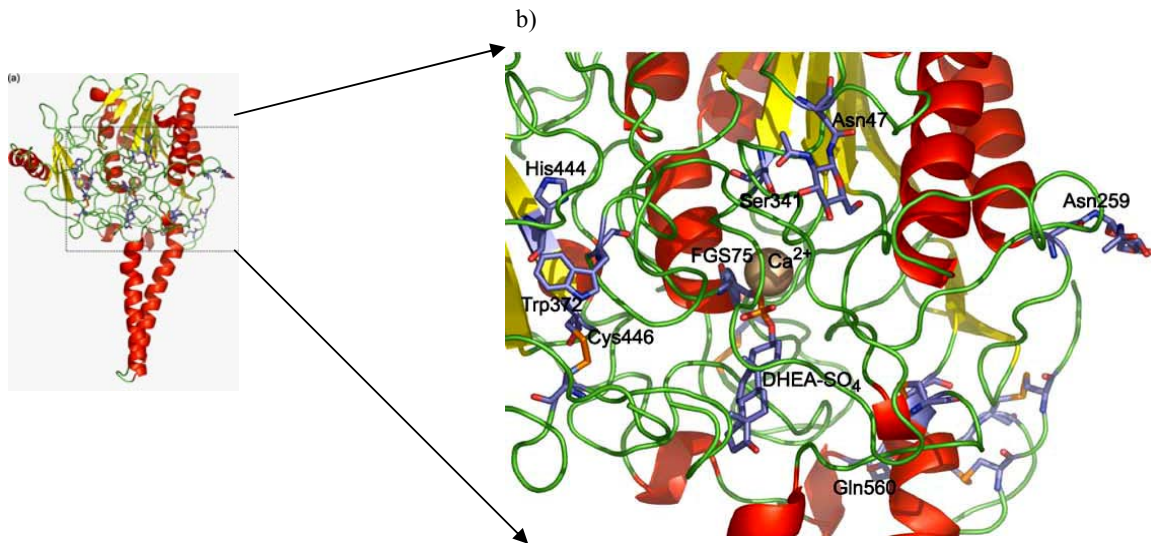


Figura 4. (a). Diagrama de giros mostrando las estructuras secundaria y terciaria de la sulfatasa de estrona/ DHEA. Hojas dibujadas en amarillo, hélices en rojo curvas en verde. Átomos de las cadenas laterales; carbón en azul claro, nitrógeno azul oscuro, oxígeno rojo, azufre naranja. (b) Mutaciones puntuales muestran aminoácidos de la enzima silvestre (Ser341, Trp372, His444, Cis446, Gln560). El residuo catalítico FG75, el catión bivalente Ca²⁺ y un modelo del sulfato de DHEA en el sitio activo (89).

3. Mutagénesis dirigida

La mutagénesis dirigida es un método de biología molecular para producir mutaciones localizadas en sitios predeterminados con objeto de cambiar un determinado nucleótido. En genética se denomina **mutagénesis** a la producción de mutaciones sobre DNA, clonado o no. De realizarse *in vitro*, dicha alteración puede realizarse al azar (mutagénesis al azar), sobre cualquier secuencia, o bien de forma dirigida (mutagénesis dirigida) sobre una secuencia conocida y en la posición de interés. En el caso de realizarse *in vivo*, sobre organismos y no sobre DNA clonado, se realiza a gran escala y sin conocimiento de secuencia, empleando para ello sustancias denominadas mutágenos. La **mutagénesis dirigida** es realizada *in vitro* y busca generar mutaciones conocidas en lugares concretos de la secuencia empleando oligonucleótidos de diseño, que poseen las características precisas para hibridar específicamente sobre una secuencia dada de DNA.

La mutación dirigida puede ser aplicada al cambiar la secuencia de regiones reguladoras en el promotor de un gen o cambiar la secuencia de aminoácidos para la que codifica, variando con ello la función de la proteína. Se pueden crear alelos nulos para que el gen deje de ser funcional. Dentro de alguno de los métodos actuales para lograr la modificación dirigida de una región de DNA se encuentran:

La mutagénesis dirigida simple sobre un fragmento de DNA clonado, en el cual se necesita que el sitio de interés tenga un sitio de restricción único, es decir que no esté en otra posición del DNA clonado o del vector; basta con digerir el recombinante con la endonucleasa correspondiente y tratar de forma controlada al DNA abierto con alguna exonucleasa (por ejemplo Bal 31 y religar sus extremos. Si lo que se desea es una inserción el recombinante abierto puede ser ligado a un fragmento con extremos compatibles para recuperar un mutante de inserción

La mutagénesis dirigida por PCR utiliza un oligonucleótido que incorpora la alteración deseada mediante uno de los dos cebadores de la reacción y trabajando sobre una molécula monocatenaria se amplifica la secuencia mutada, sin embargo esta técnica tiene algunas limitaciones. Por un lado el producto de la amplificación es un DNA lineal de doble cadena que va a ligarse a un vector para su clonaje, lo que obligara a modificar sus extremos. Mas importante es el hecho de que la enzima utilizada para la amplificación (*Taq* polimerasa) produce una alta tasa de errores, por lo que tras el proceso, debe confirmarse por secuenciación en el producto amplificado, la presencia de la mutación deseada y la ausencia de otras no deseadas.

La mutagénesis dirigida por oligonucleótidos permite añadir, eliminar, o sustituir uno o varios nucleótidos en un fragmento de DNA clonado de secuencia conocida, generando mutaciones específicas. El principio de la técnica consiste en el empleo de un oligonucleótido portador de la mutación deseada, que resulta elongado al actuar como cebador para la lectura de una hebra molde por parte de una DNA polimerasa y finalmente ligada por DNA-ligasa que cataliza el cierre del círculo. El resultado es un heterodúplex, una de cuyas hebras porta la modificación diseñada y que cuando es transferido a una estirpe hospedadora de *E. coli*, da lugar a una progenie mixta (Figura 5) (90).

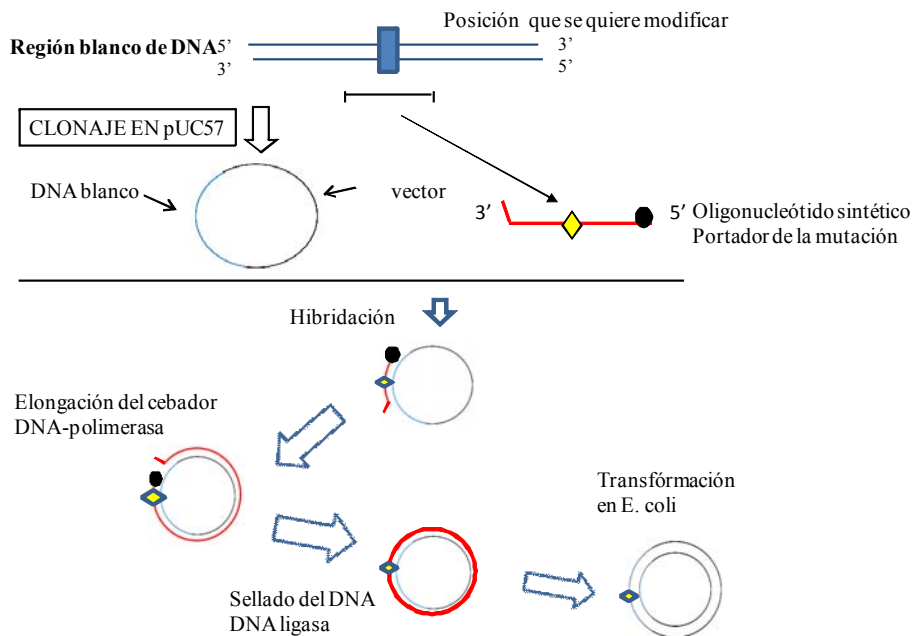


Figura 5. Esquema del procedimiento de mutagénesis por oligonucleótido (90).

Estudios de expresión del cDNA usando mutagénesis dirigida llevados a cabo en el gen *STS*, han sido realizados primero en la región C-terminal del DNA de pacientes con ILX que presentaban la mutación en 1344 causando un cambio de aminoácido glicina por arginina y otro en el nucleótido 1371 causando un cambio de glutamina a un codón de paro, reveló que estas mutaciones tienen efectos patogénicos *in vitro* y refleja niveles de actividad enzimática similares al de los pacientes con ILX (91).

Expresión de vectores, transfectados en células COS-1, portando *STS* truncados en la región N y C terminal, mostró que la actividad de la *STS* truncada, sin la región N-terminal, declinó. Adicionalmente la actividad de *STS* en la región C-terminal, declinaba conforme a la extensión de la región se truncaba (92-93).

Mutagénesis dirigida en los sitios de glicosilación, asparagina 47 y 259 de la SE, disminuían su actividad, mientras que los sitios asparagina 333 y 459 no la afectaban. Histidina 136, localizado dentro del sitio activo es crucial para la actividad de SE, mientras que prolina 212 la cual permite a la proteína girar en la membrana no es crucial para la actividad (93)

4. Transfección génica

La transfección génica se ha convertido en una herramienta fundamental en la investigación moderna. Se define la transfección génica como el proceso por el que un gen o un fragmento de DNA foráneo es introducido en una célula. Existen varios procedimientos por los que se puede conseguir la transferencia (36). La eficiencia de la transfección depende de varios factores, entre los que destacan:

- La pureza del DNA a utilizar en la transfección.
- Las células “blanco” utilizadas.
- El mecanismo de introducción del DNA en las células blanco.

Introducir DNA a células eucariontes es un procedimiento común en laboratorios experimentados aunque hay diversos métodos con eficacia y toxicidad variable. Como regla general cuanto mayor es la eficacia de la técnica para introducir DNA en las células, mayor es la cantidad de células destruidas en el proceso.

4.1. Métodos de transfección

Desde el inicio de la idea de utilizar genes como una nueva vía de terapia, uno de los primeros retos a considerar fue cómo lograr introducirlos en el interior de las células denominadas blanco.

Hoy la introducción del DNA exógeno que podemos denominar “transgen” en la célula blanco se logra a través de vectores.

Los vectores son sistemas cuyo objetivo es ayudar en la transferencia de DNA exógeno a la célula, facilitando la entrada y biodisponibilidad intracelular del mismo para que funcione adecuadamente. Pueden ser clasificados en vectores virales (37-40) y no virales (41-42).

Cuando se utilizan vectores virales para la transfección se suele hablar de transducción (43-45).

El tamaño de los fragmentos de DNA que se puede transferir es muy limitado en la mayoría de casos. A veces se puede utilizar un mini gen construido artificialmente, que consiste en un cDNA con la secuencia codificante completa a la que se le añaden en los flancos secuencias reguladoras adecuadas que aseguren una expresión elevada, por ejemplo un potente promotor vírico. El método escogido para la transferencia génica depende de la naturaleza del tejido blanco y de si la transferencia se realiza *ex vivo* (células cultivadas) o *in vivo* (células del

paciente). No obstante no existe un sistema de transferencia génica ideal, presentando cada uno sus ventajas e inconvenientes (46).

4.1.1. Métodos virales

La manipulación de virus es uno de los abordajes iniciales en la introducción de genes en células eucariontes. Con alta capacidad de infectar, permiten la conservación estructural del DNA y la transfección de una gran cantidad de células. Los sistemas víricos de mamíferos han sido particularmente atractivos debido a su alta eficiencia de transferencia.

Sin embargo, los problemas que surgen con esta tecnología son la integración del DNA en la célula huésped que puede producir una mutación no deseada o una recombinación con la consiguiente inactivación del gen introducido.

4.1.1.1. Retrovirus

Los retrovirus son virus cuyo genoma de aproximadamente 7.9 kb está constituido por una cadena simple de RNA. Representan una buena opción para la introducción de genes en animales, puesto que su eficiencia puede llegar a superar 90% de células infectadas. A pesar de tener un genoma de RNA, una vez infectada la célula, ésta se convierte en una copia de DNA debido al ciclo vial del virus (formación del provirus) que ahora puede insertarse en la célula huésped.

Los vectores retrovirales utilizados han perdido su capacidad de replicación al eliminar las secuencias *gag*, *pol* y *env* que codifican para nucleoproteínas responsables de la síntesis o recombinación de los ácidos nucleicos y componentes de la envoltura del virus (47). Al genoma viral se le incorpora una nueva secuencia génica que contiene el gen de interés.

Para obtener grandes cantidades de ese vector en estructuras capaces de infectar a las células blanco es necesario amplificarlo en unas células especiales denominadas “empaquetadoras” (48).

Estas se caracterizan por poseer secuencias *gag*, *pol* y *env* que permiten el empaquetamiento del virus. Cuando el virus infecta la célula blanco, le introduce su material genético que gracias a la transcriptasa reversa pasa a convertirse en DNA proviral con capacidad de integrarse en el genoma de la célula infectada (49-50).

4.1.1.2. Adenovirus

Los adenovirus son virus cuyo genoma, de aproximadamente 36 kb, está constituido por una doble cadena lineal de DNA. Los vectores adenovirales se construyen sustituyendo en su genoma secuencias responsables de la replicación (secuencias E1) por el gen que se quiere transfectar. La replicación de este vector se lleva a cabo de forma similar a los retrovirus en células complementarias que poseen la secuencia E1 en su genoma. Este vector se internaliza en la célula blanco por un mecanismo mediado por receptor y una vez en el endosoma se lisan liberando el DNA viral en el citoplasma celular (51-52).

4.1.1.3. Virus asociados a adenovirus

Se trata de virus de DNA no patógenos de la familia de los parvovirus, que requieren la coinfección con otros virus para replicarse. Vectores de genomas pequeños, poseen una restringida capacidad de transporte de genes (menos de 4kb), aunque presentan un amplio rango de células donde pueden actuar sin necesidad de división celular. Su genoma está formado sólo por:

- A). Gen reproductor: codifica para una familia de proteínas relacionadas con la replicación e integración del virus.
- B). Gen cap: codifica para una familia de tres proteínas estructurales.
- C). Extremos con terminales TR: de aproximadamente 145 nucleótidos, acotando la porción de interés que va transcribirse (53).

4.1.1.4. Herpes virus

Los herpes virus, como el virus del herpes simple (VHS) y el de la varicela zoster, son virus con DNA bicatenario lineal, de aproximadamente 100 a 250 kb. La estructura de su DNA es peculiar, existiendo dos trozos de DNA bicatenario lineal unidos, dando lugar a una estructura única a la que se denomina molécula L y S.

Los extremos de esta moléculas contienen de nuevo secuencias terminales repetitivas (TRL y TRS) siendo a este nivel donde se unen ambas moléculas.

Entre las cualidades de los herpes virus destaca la capacidad de eliminar partes de su genoma para acomodar largos segmentos de DNA. Su inconveniente es que los intentos por atenuar el virus han tenido un éxito limitado, teniendo capacidad límite para las células blanco transfectadas (54).

4.2. Métodos no víricos utilizados para transfección

3.2.1. Métodos mecánicos y fisicoquímicos

La preocupación en torno a la seguridad de los virus recombinantes ha generado un interés creciente en el desarrollo de sistemas de vectores no víricos. Los métodos mecánicos y fisicoquímicos son, en general, procedimientos de fácil aplicación, aunque en ellos la proporción de células transfectadas con el DNA exógeno es bajo y el gen introducido puede alterarse al pasar por el citoplasma o bien integrarse al genoma celular en forma inespecífica (55).

4.2.1.1. Microinyección

La microinyección consiste en la introducción directa, mediante un micro manipulador, del material génico en el núcleo de la célula. El método de inyección de DNA es simple, económico y no tóxico comparado con la transferencia por virus. También se pueden llevar largas construcciones de DNA. No obstante, los niveles y persistencia de la expresión son probablemente demasiado cortos.

Esta tecnología puede tener potencial como procedimiento de vacunación y de expresión de genes a un nivel bajo, lo que es suficiente para alcanzar una respuesta inmunológica. Es un método muy eficiente pero requiere de la manipulación individual de cada célula (55).

4.2.1.2. Bombardeo de partículas

Este método ha sido efectivo para transferir genes tanto *in vitro* como *in vivo*. El plásmido de DNA es revestido de gotas (de 1 a 3 micras de diámetro) de oro o tungsteno. Estas partículas son aceleradas por descargas eléctricas o por pulso de gas y son disparadas hacia el tejido. La fuerza física del impacto supera la barrera de la membrana celular, lo que permite la transferencia génica con éxito en varios tipos de tejidos.

Aunque estas técnicas de inyección estable son sencillas y relativamente seguras, la eficiencia de la transferencia génica es pobre y se obtiene poca integración estable del DNA inyectado, lo que limita su uso en los casos de células en proliferación activa. El problema es menor para tejidos que no proliferan regularmente, en los que el DNA inyectado puede

continuar expresándose durante varios meses. Posiblemente puede ser aplicado como parte de un protocolo de vacunación como demuestran las investigaciones de Ulmer y col, 1998, inyectando en músculo de ratón el gen que codifica para la proteína de matriz del virus de la influenza A (56).

4.2.1.3. Electroporación

La electroporación consiste en aplicar corrientes eléctricas de alto voltaje a las células blanco provocando poros nanométricos en su membrana. Esto permite que el DNA de carga negativa entre a la célula en su camino hacia el ánodo y quede atrapado dentro de ella. Con esta metodología se han podido introducir fragmentos de DNA de hasta 150 kb.

En esta metodología se deben de tomar en cuenta dos hechos; en primer lugar, la muerte celular que provoca el propio proceso de transfección y que puede situarse entre 60 y 90% de las células blanco; en segundo lugar, que la eficiencia de la técnica en condición optima se sitúa en torno a 25-30 células transformantes x 10⁵ células vivas. Esta técnica se puede utilizar en todos los tipos celulares y su eficiencia está condicionada por la intensidad de la corriente eléctrica, el tiempo que separa una descarga de otra y la concentración y el tipo de DNA utilizado, obteniéndose con el DNA lineal mejores resultados que con el DNA superenrollado (56).

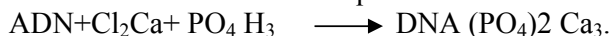
4.2.1.4. Rayo láser

Recientemente, el tratamiento de células en cultivo mediante rayo láser ha permitido provocar poros microscópicos que permiten el paso de DNA exógeno al citoplasma, de forma similar a lo que ocurre en la electroporación. Su principal inconveniente es el sofisticado sistema que exige su aplicación (56)

4.2.1.5. Precipitación con fosfato de calcio

La capacidad de las células en cultivo para adquirir DNA foráneo mediante endocitosis aumenta considerablemente con la utilización del fosfato de calcio (64).

Sin embargo, no se conocen las causas por la que este compuesto químico predispone las células a la transfección aunque si se conoce la reacción que provoca:



4.2.1.6. Liposomas

Los liposomas son partículas generadas *in vitro* cuya pared está formada por micelas lipídicas lo que les permite fusionarse fácilmente con la membrana plasmática liberando su contenido a la célula (56). Los liposomas cargados positivamente interactúan con las cargas negativas del DNA y lo compactan protegiéndolo de las enzimas (nucleasas) capaces de degradarlo. Así, lípidos monocatiónicos como DOTMA (N,1 -(2,3-dioleoyloxy)- propyl)-NNN- trimethylammonium chloride) y péptidos policatiónicos de segunda generación como DOPSA(2,3-dioleoyloxy-N-(2(esperminecarboxamido)ethyl)-NN-dymethyl propanaminium trifluorocetato) forman liposomas que se unen espontáneamente a polianiones de DNA y RNA. El resultado es la captura del 100% de complejos estables de polinucleótidos.

Los lípidos pueden fusionarse a la membrana celular y pasar el ácido nucleico directamente dentro del citoplasma evitando la ruptura de degradación lisosomal. El complejo DNA-liposoma puede ser utilizado como un método simple de transfección de células eucarióticas.

In vitro, la etapa de penetración en la célula no plantea problemas. Las moléculas comerciales son extremadamente eficaces sobre cultivos celulares acercándose su eficacia al 50%. *In vivo*, es considerablemente menor.

En su eficiencia influyen diversos factores. Tanto la proporción de lípidos con respecto al DNA/RNA, como su concentración total tienen que ser cuidadosamente optimizados para evitar toxicidad observada con elevadas dosis.

Este método es usado en general con una gran eficacia para transfectar DNA dentro de una amplia variedad de líneas celulares. Varios estudios han demostrado la eficacia de liposomas policationicos en el reparto de DNA *in vivo* (57-58, 42).

Este método es una alternativa atractiva a los de transferencia viral debido a que no hay límites en el tamaño de DNA, presenta una baja inmunogenicidad y posee una fácil preparación. Sin embargo, su eficacia de transfección es baja. Esto se debe a que la mayor parte del material génico transportado es secuestrado y/o degradado en los endosomas, siendo pequeña la proporción de este material que llega al núcleo.

5. El plásmido bacteriano

5.1. Descripción de un plásmido

Los plásmidos son elementos genéticos extra cromosómicos, moléculas de DNA de doble cadena, circulares y cerradas que se han encontrado en todos los tipos de bacterias estudiadas a la fecha. Sin embargo, algunas bacterias poseen plásmidos de estructura lineal lo cual no es una característica común. Dependiendo de su tamaño pueden codificar unas cuantas proteínas hasta cientos de ellas. Su tamaño varía de 1 a 400 kb, el número de copias de plásmido presente en la célula hospedera es también muy variable. Raramente codifican productos esenciales para el crecimiento celular, tales como RNA polimerasas o enzimas del ciclo del ácido tricarbóxicos. En cambio los productos de sus genes generalmente dan a la bacteria una ventaja selectiva sólo bajo ciertas condiciones. La resistencia a antibióticos como ampicilina, tetraciclina, kanamicina, la nodulación de raíces de leguminosas, producción de antibióticos como bacteriocina son algunas características fenotípicas codificadas por los plásmidos (59-60).

Estos elementos juegan un papel esencial en la evolución y adaptación bacteriana, ya que son mediadores del intercambio del material genético entre estas poblaciones. La transferencia de la información genética contenida en el plásmido de una bacteria donadora a una receptora se conoce como conjugación. Este proceso requiere de la expresión de genes y de la presencia de regiones específicas en ellos para su movilización. El plásmido se moviliza a través de un puente de conjugación entre las células. Además, algunos plásmidos se recombinan de manera dinámica entre si o con el genoma constituyendo una fuente importante de diversidad genética para las bacterias.

Desde el punto de vista básico y aplicado, los plásmidos han servido como herramientas importantes en estudio de biología molecular y biotecnología (61-63).

En este sentido la mayoría de plásmidos naturales no son vectores de clonación o de expresión. Sin embargo pueden ser modificados para su uso como tales, conociendo sus características moleculares que le permiten colonizar y mantenerse en los hospederos. Los plásmidos se replican de manera autónoma con respecto al cromosoma, ya que codifican elementos propios que controlan su replicación (63).

II. PLANTEAMIENTO Y JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO REALIZADO

La mayoría de los pacientes con ILX presentan delección total del gen *STS* provocando una actividad nula de la SE. 5-10% son mutaciones puntuales y/o delecciones parciales. Con base en ello y considerando que el Hospital General de México es un centro de concentración de pacientes, ya que cuenta con el diagnóstico completo para la identificación de pacientes y portadoras, es necesario entender el efecto de las alteraciones moleculares de esta enfermedad. Hasta la fecha, nos llama la atención que las mutaciones puntuales reportadas caen en la región carboxilo lo cual *in vivo* provoca actividad nula de la SE. H136 está ubicado en el extremo catalítico del sitio activo de la SE, es el único aminoácido que se ha modificado mediante mutagénesis dirigida y se observó actividad enzimática nula (93). Análisis mediante el software SIFT PROTEIN sugirió que el cambio Q343L sería deletéreo para la actividad enzimática de la SE. Por lo antes mencionado la pregunta de investigación radicó en determinar si la mutagénesis dirigida en Glu343, que es un aminoácido no conservado pero importante debido a su unión al Ca^{++} , es necesario para estimular a FG75, el cual lleva a cabo la hidrólisis y liberación del grupo sulfato ¿modifica la actividad enzimática de la SE?

Con base en lo anterior, nuestro problema se limitaría en conocer cuál es el cambio en la actividad enzimática de la SE producido por la mutación c1028 A>T en el gen *STS* que produce el cambio de aminoácido Q343L ubicado en el extremo catalítico del sitio activo de la SE.

III. HIPÓTESIS

La mutación *in vitro* c1028 A>T en el gen *STS* que produce el cambio de aminoácido Q343L localizado en la región catalítica resultará en la actividad enzimática nula de la SE como se ha mostrado en los cambios reportados en la región carboxilo de la SE de pacientes con ILX.

IV. OBJETIVO

Identificar el cambio en la actividad enzimática de la SE por la mutación *in vitro* c1028 A>T en el gen *STS* que produce el cambio Q343L correspondiente la región catalítica de la enzima.

V. MATERIALES Y REACTIVOS

1. Instrumentos

- Secuenciador ABI-310
- Cámara para electroforesis
- Espectrofotómetro de Centelleo de líquidos (COUNTER LS 6500, Beckman)
- Incubadora (BUEKELO)
- Baño María con agitación (MAXI-SHAKE)
- Balanza electrónica (CHYO MP 3000)
- Microcentrífuga (CENTRO MP4R)
- Politrón T-100 con vástago número. 10
- Termociclador (Perkin Elmer)
- Cámara fotográfica
- Espectrofotómetro (Beckman)
- Microcentrífuga refrigerada
- Termómetros
- Microscopio de epi-fluorescencia BX60(OLYMPUS)

2. Cristalería

- Probetas volumétricas 100 ml.
- Pipetas graduadas 5 y 10 ml
- Tubos de ensayo 15X100 mm
- Vasos de precipitado 25, 50 y 100 ml
- Portaobjetos
- Cubreobjetos
- Tubos de polipropileno con fondo cónico de 15 ml
- Viales de 15 ml con tapa de rosca
- Matraz Erlenmeyer 250 ml
- Pipetas Pasteur
- Viales transparentes de 3 ml
- Embudos de tallo corto

3. Materiales diversos

- Gasas
- Gradillas
- Cintas adhesivas
- Mechero Fisher
- Micropipetas semiautomáticas 200-1000, 5-40, 20-200 0.05-2 μ l
- Multidispensador (Brinkmann)
- Guantes
- Algodón
- Tubos de polipropileno con tapa para centrifuga de 15 ml (LABCON)
- Jeringas de 10 ml

- Ligaduras
- Torundas
- Tubos eppendor de 25, 500 , 1500 y 2000 μ l

4. Reactivos.

- 7-DHEA-S marcado con H₃. (NIW marca)
- Control DNA CEPH
- Marcador de peso GS-400 HD ROX
- Linkage Mapping Set Version 2, panel 28 ABI- PRISM
- POP-4
- Sonda LSI del gen *STS* con control CEPX (Vysis)
- Amortiguador
- Cemento de goma (marca)
- Kit para PCR
- Oligonucleótidos, DNTP's
- Formamida ultra pura
- Etanol 100% (MERCK grado analítico)
- Benceno (MERCK grado analítico)
- Ácido acético glacial (MERCK)
- Metanol (MERCK)
- Líquido de centelleo
- 4,6 Diamino-2-fenil-indol
- 20XSSC

5. Soluciones

- NH₄Cl 0.85%.
- TRIS 0.014M -pH 7.0
- KCl 0.075M
- Fijador metanol /ác. acético 3:1
- Solución 2X SSC
- Ác. Etilendiaminotetracético sal di sódica EDTA
- Solución de Formamida al 70%
- Solución de NP-40 0.1 y 0.4%
- Solución de 2XSSC con NP-40
- Solución de Bradford
- PBS

6. Material biológico

- Sangre venosa periférica obtenida con EDTA como anticoagulante (para ensayo bioquímico y extracción de DNA)
- Raspado de mucosa oral

VI. MÉTODOS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

1.1. Obtención del botón celular

Se tomó una muestra de 10 ml de sangre periférica normal, se centrifugó a 3000 rpm durante 6 min. Posteriormente, se desechó el plasma sanguíneo, al botón se le añadieron de 5-7 ml de cloruro de amonio (NH₄Cl) 0.85% y se dejó reposar 3-5 min. Posteriormente se centrifugó a 3000 rpm por 6 min, con el fin de lavar el botón de leucocitos obtenido. Este proceso de lavado se repitió por 3 ocasiones. Este botón se utilizó para la extracción del cDNA de la *STS*

1.2 Síntesis de cDNA de *STS*

Para la síntesis de la 1^a cadena de cDNA *STS* se utilizó el SuperScript™ III CellsDirect cDNA Synthesis System kit (Invitrogen).

1.2.1. Lisis celular

Partiendo de un botón de leucocitos normales, se procedió a lavar las células con 5-10 ml de PBS 1X (phosphate buffer salino) frío, enseguida se centrifugó el paquete celular a 200 g x 5 minutos posteriormente se aspiró el PBS y resuspendió el botón en 1 ml de PBS 1X frío. Se mezclaron las células suavemente. Se tomó una alícuota pequeña para verificar que las células estuvieran en una concentración adecuada y se determinó la densidad celular. Se ajustó la densidad celular usando PBS frío para obtener un rango de 1-10,000 células/ μ l. Se cuantificaron las células nuevamente para verificar concentración celular. Utilizando un tubo de 0.2 ml se le agregaron 10 μ l de buffer de resuspensión. Enseguida se le agregó 1 μ l de lisis *Enhancer* (Invitrogen). Se colocaron de 1-2 μ l de células (10,000 cel) al tubo de PCR a 75° C e incubándolo 10 minutos a 75° C. Se recolectó por centrifugación y se procedió a digerir con DNasa I

1.2.2. Digestión con DNasa I

Se colocó el tubo sobre hielo y se agregó 5 μ l de DNasa grado amplificación (1U/ μ l) con 1.6 μ l de Buffer DNasa I 10X. Se mezcló suavemente por pipeteo y se centrifugó brevemente para colectar el contenido, enseguida se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos. Se centrifugó brevemente, y se añadió 1.2 μ l de EDTA (25 mM) a cada tubo. Se mezcló suavemente por pipeteo, y centrifugó brevemente para colectar el contenido. Se incubó a 70° C X 5 minutos, inmediatamente se centrifugó brevemente y se procedió a la síntesis del cDNA de cadena sencilla.

1.2.3. Síntesis de la 1^a cadena del cDNA

El tubo de la etapa de digestión de DNasa I se colocó en hielo y se agregaron 2 μ l de Oligo (dT) 20 (50 mM), 1 μ l dNTP mix 10 mM. Se mezcló suavemente por pipeteo y centrifugó brevemente. Se incubó el tubo a 70° C por 5 minutos y se centrifugó brevemente. Se colocó el tubo en hielo por 2 minutos y se agregó lo siguiente: 6 μ l de buffer RT 5X, 1 μ l RNasa OUT (40U/ μ l), 1 μ l SuperScript III RT (200 U/ μ l), 1 μ l DTT 0.1 M. Se mezcló por pipeteo y centrifugó brevemente, enseguida se pasó el tubo al termociclador precalentado a 50° C y se incubó 50 minutos. Se inactivó a 85° C por 5 minutos. Se agregó 1 μ l de RNasa H (2U/ μ l) a

cada tubo se incubó a 37° C por 20 minutos. Se dejó enfriar la reacción sobre hielo y se procedió a almacenar el cDNA a -20° C. Se continuó a la PCR.

1.3. Construcción del plásmido recombinante

1.3.1. Introducción del sitio de corte para las enzimas *EcoRI* y *BamHI* en el cDNA del gen *STS* por PCR

Se introdujeron sitios de corte para las enzimas *EcoRI* y *BamHI* (promega) en los extremos amino y carboxilo del cDNA de la *STS* respectivamente (figura 6). Así nos aseguramos de la correcta orientación del inserto en el vector plasmídico (figura 7), se realizó una PCR utilizando los siguientes oligonucleótidos:

Sentido: GAATTC GCC ACC ATG CCT TTA AGG AAG ATG AAG
EcoRI Inicio

Antisentido: GGA TCC CTG CTA GCG GCT CAG TCT CTT ATC CTG
BamHI Término

La reacción de PCR se realizó mezclando 5 µl buffer de PCR 10X High Fidelity, 1 µl de mezcla de dNTP (10 mM), 2 µl MgSO₄ (50 mM), 1 µl de primer sentido (10 mM), 1 µl de primer anti sentido (10 mM), 1 µl de cDNA (1 µg), 0.2 µl Platinum Taq High Fidelity (1 U) y se llevó a una concentración final de 50 µl y se centrifugó brevemente. Se procedió a incubar en termociclador a 94° C por 2 minutos para desnaturalizar el templado. Se realizaron 30-40 ciclos de amplificación de PCR: se desnaturalizó a 94° C por 30 segundos. Se alineó a 55° C por 30 segundos y se extendió a 68° C en 1 min.

EcoRI

ATTCGAGCTCGGTACCTCGCGAATGCATCTAGTGAG **AATTC**GCC ACC

	-22 M P L R K M	6
	<u>atg cct tta ag g aag atg</u>	
19	aag atc cct ttc cta ctg ttc ttt ctg tgg gaa gcc gag agc cac gca K I P F L L L F F L W E A E S H A o E	23/1
70	gca tca agg cag aac atc atc ctg ctg atg gct gac gac ctc ggc att gga A S R P N I I L V M A D D L G I G	40/18
121	gat cct ggg tgc tat ggg aac aaa act atc ag g act ccc aat atc gac cgg D P G C Y G N K T I R T P N I D R	57/35
172	ttg gcc agt ggg gga gtg aaa ctc act cag cac ctg gca gca tca ccg ctg L A S G G V K L T Q H L A A S P L	74/52
223	tgc aca cca agc agg gca gcc ttc atg act ggc cgg tac cct gtc cga tca C T P S R A A F M T G R Y P V R S	91/69
274	gga atg gca tct tgg tcc cgc act gga gtt ttc ctc tca gcc tct tog G M A S W S R T G V F L F T A S S	108/86
325	gga gga ctt ccc acc gat gag att acc ttt gct aag ctt ctg aag gat caa G G L P T D E I T F A K L L K D Q	125/103
376	ggg tat tca aca gca ctg ata <u>g gg aaa tgg cac ctt ggg atg agc tgt cac</u> G Y S T A L I G K W H L G M S C H	142/120
427	agc aag act gac ttc tgt cac cac cct tta cat cac ggc ttc aat tat ttc S K T D F C H H P L H H G F N Y F	159/137
478	tat ggg atc tct ttg acc aat ctg aga gac tgc aag ccc gga gag ggc agt Y G I S L T N L R D C K P G E G S	176/154
529	gtc ttc acc acg ggc ttc aag agg ctg gtc ttc ctc ccc ctg cag atc gtc V F T T G F K R L V F L P L Q I V	193/171
580	ggg gtc acc ctc ctt acc ctt gct gca ctc aat tgt ctg ggg cta ctc cac G V T L L T L A A L N C L G L L H	210/188
631	gtg cct cta ggc gtt ttt ttc agc ctt ctc ttc cta gca gcc cta atc ctg V P L G V F F S L L F L A A L I L	227/205
682	acc ctt ttc tgg gtc ttc ctt cat tac ttc cgg ccc ctg aac tgc ttc atg T L F L G F L H Y F R P L N C F M	244/222
733	cta cga gat cat tca gca gcc cat gtc cta tga caa tct cac cca gag gct M R N Y E I I Q Q P M S Y D N L T	261/239
784	aac ggt gga atg agg aag gcg gcc cag ttc ata cag cgg <u>aac act gag act</u> Q R L T V E A A Q F I Q R N T E T	278/256
835	ccg ttc ctg ctt gtc tgg tac ctc cac gtc cac aca gcc ctg ttc tcc P F L L V L S Y L H V H T A L F S	295/273
886	agc aaa gac ttt gct ggc aaa agt caa cac gga gtc tac ggg gat gct gtt S K D F A G K S Q H G V Y G D A V	312/290
937	gag gaa atg gac tgg agt gtc ggg cag atc ttg aac ctt ctg gat gag ctg E E M D W S V G Q I L N L L D E L	329/307
988	aga ttg gct aat gat acc ctc atc tac ttc aca tcg gac <u>cTg</u> gga gca cat R L A N D T L I Y F T S D L G A H <u>Mut_c1028 A>T</u>	346/324
1039	gta gaa gaa gtg tct tcc aaa gga gaa att cat ggc gga agt aat ggg atc V E E V S S K G E I H G G S N G I	363/341
1090	tat aaa gga gga aaa gca aac aac tgg gaa gga ggt atc cgg gtt cca ggc Y K G G K A N N W E G G I R V P G	380/358
1141	atc ctt cgt tgg ccc agg gtg ata cag gct ggc cag aag att gat gag cc I L R W P R V I Q A G Q K I D E P	397/375
1192	act agc aac atg gac ata ttt cct aca gta gcc aag ctg gct gga gct ccc T S N M D I F P T V A K L A G A P	414/392
1243	ttg cct gag gac agg atc att gat gga cgt gat ctg atg ccc ctg ctt gaa L P E D R I I D G R D L M P L L E	431/409
1294	gga aaa agc caa cgc tcc gat cat gag ttt ctc ttc cat tac tgc aac gcc G K S Q R S D H E F L F H Y C N A	448/426
1345	tac tta aat gct gtg cgc tgg cac cct cag aac <u>agc aca tcc atc tgg aag</u> Y L N A V R W H P Q N S T S I W K	465/443
1396	gcc ttt ttc ttc acc ccc aac ttc aac ccc ctg ggt tcc aac gga tgc ttt A F F F T P N F N P V G S N G C F	482/460
1447	gcc aca cac gtg tgc ttc tgt ttc ggg agt tat gct acc cat cac gac cca A T H V C F C F G S Y V T H H D P	499/477
1498	cct tta ctc ttt gat att tcc aaa gat ccc aga gag aga aac cca cta act P L L F D I S K D P R E R N P L T	516/494
1549	cca gca tcc gag ccc cgg ttt tat gaa atc ctc aaa gtc atg cag gaa gct P A S E P R F Y E I L K V M Q E A	533/511
1600	gcg gac aga cac acc cag acc ctg cca gag gtg ccc gat cag ttt tca tgg A D R H T Q T L P E V P D Q F S W	550/528
1651	aac aac ttt ctt tgg aag ccc tgg ctt cag ctg tgc tgt cct tcc acc ggc N N F L W K P W L Q L C C P S T G	567/545
1702	ctg tct tgc cag tgt gat aga gaa aaa cag gat aag aga ctg agc cgc <u>tag</u> L S C Q C D R E K Q D K R L S R * <u>CATG GATCC</u> CGGGCCCGACTGCAGAGGCTGATGCAAGCTT	583/562

BamHI

FIGURA 6. Secuencia del cDNA de STS (HGMD- NM_000351.4), su sitio de restricción agregado con oligonucleótidos específicos para el reconocimiento por EcoRI y BamHI. Números de la izquierda indican la posición de los nucleótidos y los de la derecha el número que le corresponde a los aminoácidos con o sin péptido líder respectivamente. Mut c1028 es el sitio de la mutación dirigida en el cDNA del STS.

1.3.2. Digestión del cDNA (STS) de la PCR

Para realizar la digestión del cDNA- STS (HGMD- NM_000351.4) se realizó la siguiente mezcla:

Se agregó 4.1 µl H₂O, 2 µl de buffer 3 10X (promega), 0.5 µl de BSA (10 µg/ µl), DNA (cDNA-STS) a una concentración de 1µg y finalmente las enzimas de restricción 1µl de *EcoRI* (10 u/ µl) y 1µl de *BamHI* (10 u/ µl) para un volumen final de 20 µl. La mezcla se corrió en un gel de agarosa

1.3.3. Obtención del vector

El vector utilizado fue el plásmido *pUC57* (GenScript) que contiene 2710 pb, es un vector pequeño de alto número de copia, contiene el replicon *rep* (pMB1) es responsable de la replicación del plásmido, el gen *bla* (Ap^R) codifica para una β- lactamasa resistente a ampicilina, contiene el operon para *lacZ* seguido de su secuencia de multiclonaje (MCS) es mostrado en la figura 7 a. El mapa de de restricción de su MCS se muestra en la figura 7 b.

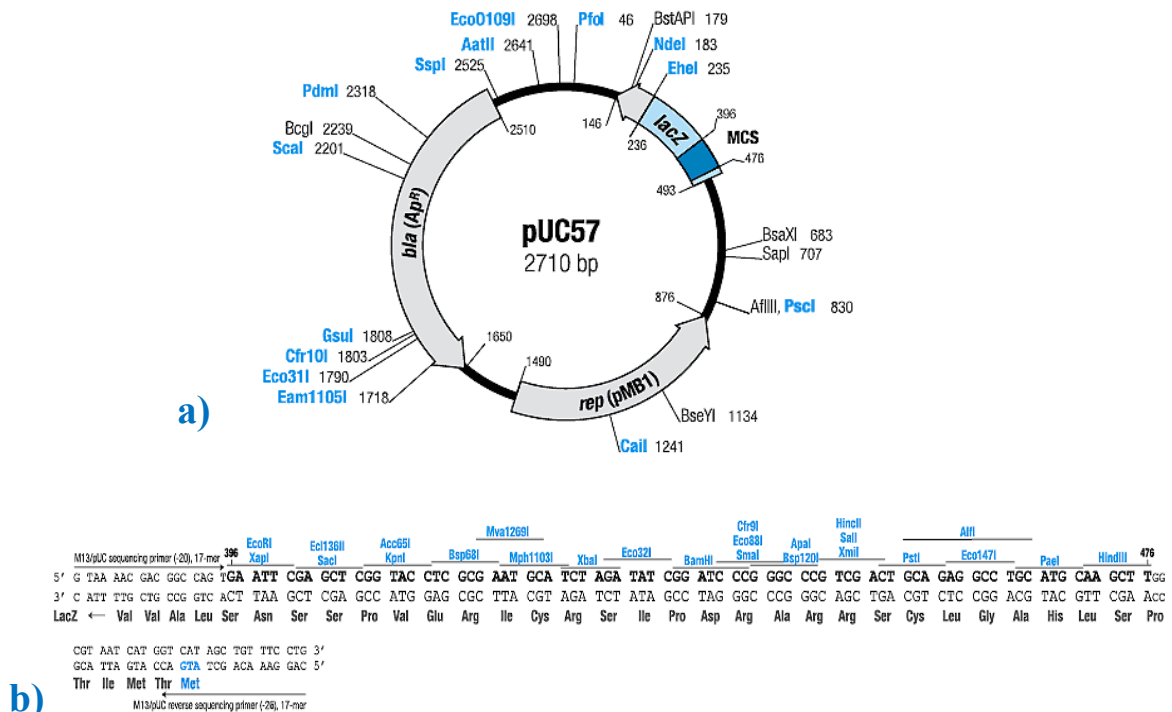


Figura 7. (a) Vector de clonación *pUC57*. (b) Secuencia de restricción dentro del Sitio de Clonaje Múltiple (MCS) en donde se ubica los sitios de restricción *EcoRI* y *BamHI*.

1.3.4. Digestión del vector *pUC57* con *EcoRI* y *BamHI*

Para realizar la digestión del plásmido *pUC57* se realizo una mezcla en donde se agregó 4.1 µl H₂O, se añadió 2 µl de buffer 3 10X (promega), además de 0.5 µl BSA (10 µg/ µl), DNA (plásmido) a una concentración de 1µg y finalmente las enzimas de restricción 1µl de *EcoRI* (10 u/ µl) y 1µl *BamHI* (10 u/ µl) (promega) para un volumen final de 20 µl.

1.3.5. Purificación del vector *pUC57* y del cDNA- *STS*

Se procedió a cortar la banda del gel de agarosa, se le agregaron 500 µl del buffer QX1 y 3.5 µl de resina QIAEX II SUSPENSION (Quiagen), se calentó por 10 min a 55°C. Se centrifugó a 11.800 rpm por 1.5 min y nuevamente bajo las mismas condiciones se agregó 500 µl de QX1, disgregando botón, se centrifugó y decantó, eliminando resto de buffer con puntas.

Se lavó con 500 µl de buffer PE, (2 veces), se centrifugó, decantó, eliminó con punta resto de buffer. Se secó en termoblock por 10 min aprox. a 55°C. Se resuspendió con 15 µl de H₂O, permitiendo la elusión del DNA por 24 hrs y después se centrifugó a 11.500 rpm en 2 min. El sobrenadante se corrió en gel de agarosa por electroforesis para checar la calidad del purificado.

1.3.6. Ligación del cDNA- *STS* con el vector *pUC57*

Para realizar la ligación del vector de clonación *pUC57* con el cDNA (*STS*) se mezcló 16 µl H₂O, se añadió 90ng del vector de clonación, enseguida 45 ng del cDNA (*STS*), posteriormente 1 µl de buffer de ligación 10X con 1nM de ATP, 1 µl de ligasa de DNA T4 (0.1-1u) (promega), para llevar a un volumen final de 20 µl y se incubó por 24 hrs a 4°C.

Para su análisis se realizó electroforesis en gel de agarosa, utilizando como control el PSV₂ NEO como lo muestra la figura 8.

1.4. Mutagénesis dirigida

Para la realización de la mutación dirigida se utilizó el kit GeneTailor™ Site-Directed Mutagenesis System (invitrogen) el cual se aplicó sobre el cDNA del gen *STS* para cambiar el nucleótido c1028 A>T, que cambio el aminoácido glutamina (Q) por leucina(L) en la posición 343 ubicado en el extremo catalítico del sitio activo de la proteína SE.

1.4.1. Metilación del DNA

Antes de realizar la mutación dirigida sobre el cDNA del gen *STS* se llevó a cabo metilación del DNA el cual se realizó mezclando el DNA plásmido + cDNA-*STS*, a una concentración de 100 ng, enseguida se agregó 1.6 µl del Buffer de metilación, se añadió 1.6 µl, SAM (S-Adenosilmethionine) 10X, 1.0 µl DNA metilasa (4U/ µl) y se llevo a un volumen final de 16 µl. Se mezclaron los reactivos y se incubaron 37° C X 1 hr. Se procedió a la reacción de mutagénesis

1.4.2. Mutagénesis dirigida en el gen *STS*

Para la reacción de mutagénesis se utilizaron los siguientes oligonucleótidos:

Sentido: 5'-TCATCTACTTCACATCGGACCTGGGAGCACATGT-3'

Antisentido: 5'-GTCCGATGTGAAGTAGATGAGGGTATCAT-3'.

Se realizó una mezcla con 5 µl buffer PCR 10X high fidelity, dNTPs 10 mM 1.5 µl, MgSO₄ 50 mM 1 µl, Primer (10 µM cada uno) 1.5 µl, DNA metilado 2.5 µl, Platinum Taq *high fidelity* (5U/ µl) 0.5 µl llevando a un volumen final de 50 µl

Se mezcló y se sometió a las siguientes condiciones de PCR: 1 ciclo a 94° C por 2 min para desnaturalización. Enseguida 20 ciclos a 94° C por 30 segundos; 55° C por 30 segundos; 68° C por 1 min / 1kb DNA para alineamiento y 1 ciclo a 68° C por 10 min para extensión. Se almacenó la reacción a 4° C después la PCR.

1.5. Secuenciación del DNA

Para asegurar de que la mutación c1028 en el cDNA (*STS*) se había llevado correctamente se realizó secuenciación con los oligonucleótidos específicos sentido 5'-GGCAGATATTGAAACCTTCTG-3' y el antisentido 5'-AATCTTCTGGCCAGCCTGTA-3' Big Dye v3.1 (Applied Biosystems) empleando el termociclador MultiGene II (LabNet) las condiciones de reacción fueron recomendadas por el fabricante para la utilidad de secuenciación automática. Las muestras obtenidas se purificaron con columnas Centri-Sep (Applied Biosystems).

La secuenciación del DNA se realizó en un secuenciador automático ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) según el método de terminadores didesoxi marcados (Sanger, 1977) (Figura 9)

1.6. Clonación del plásmido recombinante

1.6.1 Transformación en células competentes *E.coli* DH5α™-T1^R

Se centrifugó brevemente el vial que contenía la reacción de mutagénesis y se colocó en hielo. Se descongeló, lentamente en hielo, un tubo con 50 µl de bacterias competentes *E. Coli* DH5α™-T1^R (invitrogen) y se mezcló 2 µl de la reacción de mutagénesis con las bacterias competentes, se incubó en hielo durante 7-10 minutos, el resto de la mezcla de mutagénesis se guardó a -20°C

Se sometió a un choque térmico (42° C X 30 seg) y se colocó en hielo durante 1 min.

Se recuperaron las bacterias añadiendo 200 µl de SOC precalentado, se incubaron a 37° C durante 1 hr en agitación a 225 rpm y se cultivaron 125 µl en placas solidas de LB precalentada finalmente se incubaron en estufa a 37° C toda la noche.

1.6.2. Cultivo bacteriano en placa sólida y selección con antibiótico

Se preparó medio LB (Luria Bertani) solidó, enseguida se agitó hasta disolver y se ajustó a pH de 7 con NaOH, se aforó a 250 ml o 100 ml con agua desionizada estéril y se esterilizó en autoclave a 121° C por 30', se dejó enfriar y se agregó 75 µl de ampicilina (concentración final de 100 µg/ml), se colocaron en las cajas de petri 30 ml del medio L-B y se dejaron enfriar a temperatura ambiente, posterior se almacenaron a 4° C (las cajas con medio) y dejando una a 37° C X 24 hrs como prueba de esterilidad (figura 10).

1.6.3. Expansión de bacterias transformadas en medio de cultivo líquido

Se preparó 100 ml de L-B (Luria Bertani) líquido, se esterilizó por 30' a 121° C. Se depositaron 10 ml de medio L-B líquido a un matraz de 50 ml, medido con una probeta adecuada y esteril. Se agregaron 200 µl de glucosa al 20%, 160 µl de MgSO₄ 2 M y Ampicilina a concentración 100µg/ml.

Se sembró una colonia de la bacteria *E. coli* + plásmido al medio de 10 ml y se dejó en agitación por 12 hrs, se observó si había crecimiento adecuado, enseguida se tomaron 3 ml de medio L-B crecido turbio con bacterias *E. coli* + plásmido y se depositaron en el matraz con 100 ml, se agregó glucosa al 20%, MgSO₄ 2 M y ampicilina. Se dejó en agitación por 12 hrs y posteriormente se centrifugó a 3500 rpm por 25-30' y almacenó el botón celular a 4° C o bien se iniciaba con la extracción del plásmido.

1.7. Extracción del plásmido recombinante

Para la extracción del plásmido recombinante se utilizó el Kit QIAGEN Plasmid/ Maxi (Qiagen). El botón de bacterias se resuspendió en 10 ml de buffer P1 (con RNasa) usando vortex. (se mezcló el buffer perfectamente antes de usar y guardar a 4° C). Se agregaron 10 ml de buffer P2, mezclados por inversión (4-6 veces) y se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos. Al lisado se agregaron 10 ml de buffer P3 frío (4° C), mezclando inmediatamente por inversión (4-6 veces) se procedió a incubar en hielo por 20 minutos, se mezcló y centrifugó a 12000 rpm, 30 min a 4° C. Se re-centrifugó a 12000 rpm 15 min a 4° C, removiendo rápidamente el sobrenadante que contiene el plásmido. Se hidrató el QIAGEN-tip 500 aplicando 10 ml de buffer QBT (2 veces opcional). Se agregaron 30 ml de buffer QC (2 veces) y se eluyó el DNA en tubos estériles de 15-30 ml, con 15ml de buffer QF, para posterior ser precipitado el DNA con 10.5 ml de isopropanol a temperatura ambiente, se mezcló y centrifugó inmediatamente a 9500- 11000 rpm, 30 min a 4° C. Se lavó el botón con 800 µl de etanol a 70% y centrifugó a 9500-11000 rpm, 10 minutos a 4° C. Se decantó sobrenadante, posteriormente se dejó secar el botón 5-10 min y se resuspendió con 15 µl de Tris Cl 10 mM, PH 8.5.

1.8. Linealización del plásmido recombinante y análisis mediante digestión enzimática en gel de agarosa

Se realizó alineamiento del plásmido con el fin de tener un mayor nivel de transfección y se utilizó H₂O estéril 5.1 µl, posteriormente se agregó 2 µl de buffer, BSA 0.5 µl, DNA plásmido (1 µg), finalmente la enzima *ECORI* (1 µl = 10-12 U) y se llevó a un volumen total de 20 µl.

La reacción se mezcló suavemente, después se incubó por 2 hrs a 37 °C, enseguida 5 min a -20 °C y finalmente 15 min a 65 °C, se guardó a -20 °C.

El análisis del plásmido se realizó en un gel de agarosa al 0.7% (0.2 gr agarosa en 30 ml de TAE 1X) con 1.5 µl de bromuro de etidio y se corrió a un voltaje de 50 mVolt (Figura 11). Se procedió a la transfección celular.

1.9. Cultivo celular

1.9.1. Línea celular

El estudio fue realizado en la línea celular A9 (ATCC: No CCL-1.4), células adherentes de fibroblastos de ratón, el cual carece de la secuencia del gen *STS*.

1.9.2. Medio de cultivo

Las células A9 fueron cultivadas en medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) (ATCC) suplementado con suero fetal bovino al 10% (SFB) (ATCC) y para evitar el crecimiento de patógenos externo se utilizó gentamicina y amfotericina B.

Los cultivos de células se realizaron en frascos de cultivo (Falcon) de 25 ó 75cm² de superficie, se mantuvieron en estufa a 37° C, atmósfera de 5% de CO₂ y 90% de humedad. Todas las manipulaciones de la línea celular se realizaron en esterilidad trabajando en campana de flujo laminar y utilizando material y soluciones estériles.

Las líneas celulares A9 (en criotubos y almacenadas en nitrógeno líquido), fueron descongelados en calor húmedo a 37° C, posteriormente en campana de flujo laminar, las células fueron lavadas 2 veces con PBS para eliminar los restos de DMSO y posteriormente resuspendidas en frascos de cultivo con DMEM previamente filtrado (figura 12).

1.9.3. Cambio de medio de cultivo

Se decantó o vació el medio de la caja de cultivo, agregando nuevo medio a la caja 15 o 5 ml dependiendo del tamaño de la caja. Se observó al microscopio invertido y se incubó a 5% de CO₂ a 37° C. Para el lavado de las células, se separaron con tripsina-EDTA 0.25%- 0.53 mM (ATCC) con 10 ml y 3 ml respectivamente y se procedió a centrifugar a 1500 rpm x 5 min en medio con suero con antibiótico (C.S/CA). Después de revisar las cajas en el microscopio invertido, se incubó a 37° C, 5% de CO₂, dejando tapa semiabierta.

1.9.4. Crío-conservación celular

Se retiró el medio de cultivo del frasco 25 cm² con aspiración y se agregaron 3ml de tripsina, se movió suavemente intercalando con la incubadora de CO₂ a 37° C X 5 minutos, posteriormente se observó en el microscopio invertido para ver que las células se despegaron del frasco, enseguida se agregaron 3 ml de medio para inhibir a la tripsina. Se centrifugó en tubos Falcón a 750 rpm x 10 min y se desechó el sobrenadante, se agregó DMSO (100µl) y SFB (900 µl) y vació a un vial con las células depositadas previamente y se congeló a -80° 24 hrs y posterior pasó a nitrógeno líquido indefinidamente.

1.9.5. Viabilidad celular (previo a la transfección)

Para realizar un conteo de viabilidad se tomaron 50 µl de medio con células de un tubo previamente tripsinizado y se mezcló con 50 µl de azul de tripano, se depositó en la cámara de Neubauer.

1). Se contaron las células vivas y muertas en los 5 cuadrantes de la cámara Neubauer, se sumaron y se sacó promedio de vivas y muertas.

Ejemplo:

$$(777)(10^4) (2) = 15.540.000 / \text{ml}$$

Promedio vivas: 777

Muertas: 56

Total vivas (777) + muertas (56) = 833 - 100 %

$$56 - x = 6 \% \quad \text{Entonces} \quad \frac{100\%}{- 6 \%}$$

94% de VIABILIDAD

Si; 15. 540 000 cel - 1 ml

$$1.000.000 \text{-----} x = 0.0643 \text{ ml}$$

$$x = 64 \mu\text{l de medio + células}$$

Entonces 336µl de RPMI S.S/SA

$$+ 64 \mu\text{l de medio + células}$$

$$400 \mu\text{l de medio de cultivo + células}$$

1.10. Transfección del plásmido recombinante mediante lipofección en las células A9

La transfección del plásmido recombinante en las células A9 se llevo a cabo con el kit de **LIPOFECTAMINE PLUS™** Reagent (LIFE-TECHNOLOGIES), para ello se procedió primero a lavar las células A9 con medio RPMI (Invitrogen) sin suero/ sin antibiótico (S.S/S.A). Se determinó la cuenta (vivos y muertos) y se sacó el promedio de viabilidad para asegurar que la célula estaban vivas y se transfectaría correctamente (ver fórmula para viabilidad).

Enseguida se depositaron 1×10^6 células en 400 μ l de medio S.S / S.A dentro de placas de 6 pozos y se incubó a 37° C a 5% de CO₂ (mientras se prepara liposomas y plásmidos). Posteriormente se mezcló lipofectamina (10 μ l) en 40 μ l de medio S.S / S.A, se incubó 45'. Se diluyó 1 μ g de DNA plasmidico, previamente cuantificado y digerido) (aproximadamente 5 μ l plásmido) en 45 μ l de medio S.S / S.A. Se mezclaron los complejos previos e incubó a 15' a Temperatura ambiente. Se agregaron los complejos a la células y mezcló por balanceo y se incubó en CO₂ 5% a 37°C X 3-5 hrs. Posteriormente se agregó 2 ml de medio RPMI, C.S / S.A y se incubó por 24 hrs 37°C 5% de CO₂. Se depositó el medio con células al tubo de 15 ml, se centrifugó a 1000 rpm x 5' y se repitió con PBS (2 ml) una vez, enseguida se dejó las células en medio C.S/C.A (2 ml) X 24 hrs o más.

2.- Hibridación “*in situ*” con Fluorescencia (FISH) en células A9

Para su realización se adquirió una sonda comercial de Identificación específica del *locus* (LSI), en la cual se encuentra el gen *STS* (Xp22.3), esta sonda está marcada con el fluorocromo espectro naranja e incluye además un control interno (CPX) específico para la región centromérica del cromosoma X, el cual se encuentra marcado con un fluorocromo visible en el espectro verde.

1) Pre-tratamiento de las muestras:

Las laminillas de las células A9 transfectadas y no transfectadas, y leucocitos normales se deshidrataron en series de etanol (70%, 80% y 95%) durante 2 minutos. Una vez secas, se desnaturalizaron por 5 min en solución de formamida 70%, inmediatamente se trasladaron a jarras *coplin* con etanol al 70% ,85 y 100% en series de 1 min.

Las preparaciones deshidratadas en etanol al 100% se dejaron secar sobre una parilla de calentamiento a 45°C y se procedió a colocar la sonda.

2) Preparación de la sonda:

La sonda comercial de LSI se mezcló con la solución de hibridación en una proporción de 1:7, y aforo con H₂O a un volumen final de 10 µl.

3) Hibridación.

Se aplicaron 10 µl de la mezcla de hibridación por cada 25 x 25 mm de área en las preparaciones celulares. Posteriormente, se cubrieron con cubreobjetos y se sellaron con cemento de goma (*Rubber*). Las preparaciones se incubaron a 37 °C en cámara húmeda, en oscuridad durante 24- 48 horas.

4) Tratamiento post-hibridación.

Se retiró el cubreobjetos de la preparación y se procedió a lavar, para eliminar el exceso de marca. Los lavados se realizaron a 46°C por series de 3-4 min. Utilizando primero solución de lavado con 0.4XSSC con NP-40 y posteriormente 0.1XSSC. Se secaron las preparaciones a temperatura ambiente en oscuridad.

5) Detección de la señal:

A cada una de las preparaciones previamente tratadas se les aplicaron 10 µl de contra tinción, en este caso DAPI II, ya que se tiene la presencia de dos fluorocromos en distintos espectros en la misma preparación, se cubrió la preparación con un cubreobjetos, evitando así la formación de burbujas.

Finalmente, se analizaron las preparaciones en el microscopio de epi-fluorescencia (OLYMPUS) a una longitud de onda de 570- 595 nm con aumento a 100 X (Figura 13).

3. Determinación de la actividad enzimática de la sulfatasa de esteroides

Para su realización se utilizaron 1×10^6 de células A9 transfectadas y A9 no transfectadas, leucocitos humanos normales como controles a la misma cantidad. La muestra de 1×10^6 células se resuspendió en 1 ml de amortiguador-tris 0.014M; se procedió a fragmentar las células empleando un Politrón T-100 con vástago del número 10, a la velocidad máxima en dos ciclos, de 20 y 10 segundos respectivamente. Posteriormente se incubó la reacción durante 1 hora utilizando como sustrato 10 μ l de Sulfato de Dehidroepiandrosterona (DHEAS- 3 H) (94.5 Ci/mmol/.25ml etanol), para un volumen de 200 μ l de muestra por duplicado, se homogenizó la enzima y el sustrato, se procedió a incubar a 37° C durante 1 hora. Con el propósito de detener la reacción y extraer el producto final (DHEA) después del tiempo de incubación se agregó 1 ml de Benceno frío (*Merck*, grado analítico), agitándose vigorosamente en vórtex durante 2 minutos y se centrifugó 5 minutos a 2500 rpm. Posteriormente, del sobrenadante, se extrajeron 600 μ l, a los cuales se les añadieron 5 ml de líquido de centelleo para posteriormente ser leídos por espectrofotometría de centelleo de líquidos.

Cada uno de los ensayos se realizó después de la transfección por duplicado a las 24 y 72 hrs, incluyéndose además un blanco (buffer + sustrato).

VII. RESULTADOS

Extracción de cDNA.

Para fines prácticos se decidió trabajar con la región codificante por lo que se realizó la extracción de cDNA en un sólo paso. En la figura 6 se muestra la región de interés.

ANÁLISIS POR FISH.

Mediante este método se detectó que 20% (transfección regular) de las células A9 transfectadas con el vector *pUC57 + STS* mutado tenían en el núcleo el marcador específico para el gen *STS* (figuras 12 c y d), las células A9 no transfectadas no tenían en el núcleo la señal del marcador para el gen *STS* (figuras 13 a y b). El control leucocitos normales tiene la señal para el gen *STS* (Figura 13 c)

ANÁLISIS BIOQUÍMICO

La cuantificación de la actividad enzimática en la SE, 48 h posterior a la transfección, se realizó en las células A9 sin transfección siendo ésta de 0.021 (pmol/ mg/ h), en las células A9 + *pUC57 + STS* mut la actividad fue de 0.184 (pmol/ mg/ h) y en el leucocito normal de 0.150 (pmol/ mg/ h). El blanco (control negativo) resultó de 0.013 (pmol/ mg/ h).

La actividad enzimática de la SE, 72 hrs posterior a la transfección se realizó, en las células A9 sin transfección siendo ésta de 0.015 (pmol/ mg/ h), en las células A9 + *pUC57 + STS* mut la actividad fue de 0.076 (pmol/ mg/ h) y en el leucocito normal de 0.149 (pmol/ mg/ h). El blanco (control negativo) resultó de 0.018 (pmol/ mg/ h). Estos mismos datos se muestran en la cuadro 2 y gráfico 1.

TIPO CELULAR	ACTIV. DE SE 48 H (<i>pmol/mg/h</i>)	ACTIV. DE SE 72 H (<i>pmol/mg/h</i>)
CELULAS A9 SIN TRANSFECCIÓN	0.023, 0.026, 0.015 PROMEDIO: 0.021	0.012, 0.011, 0.023 PROMEDIO:0.015
CELELULAS A9 TRANSFECTADAS (<i>pUC57 + STS</i> mutado)	0.183, 0.184, 0.187 PROMEDIO:0.184	0.078, 0.076, 0.076 PROMEDIO:0.076
LEUCOCITOS SANGRE PERIFÉRICA CONTROL SANO	0.152, 0.148 PROMEDIO:0.150	0.150, 0.148 PROMEDIO:0.149
BLANCO	0.016, 0.016, 0.018 PROMEDIO: 0.013	0.027, 0.024, 0.019 PROMEDIO: 0.018

Cuadro 2: Datos de actividad bioquímica.

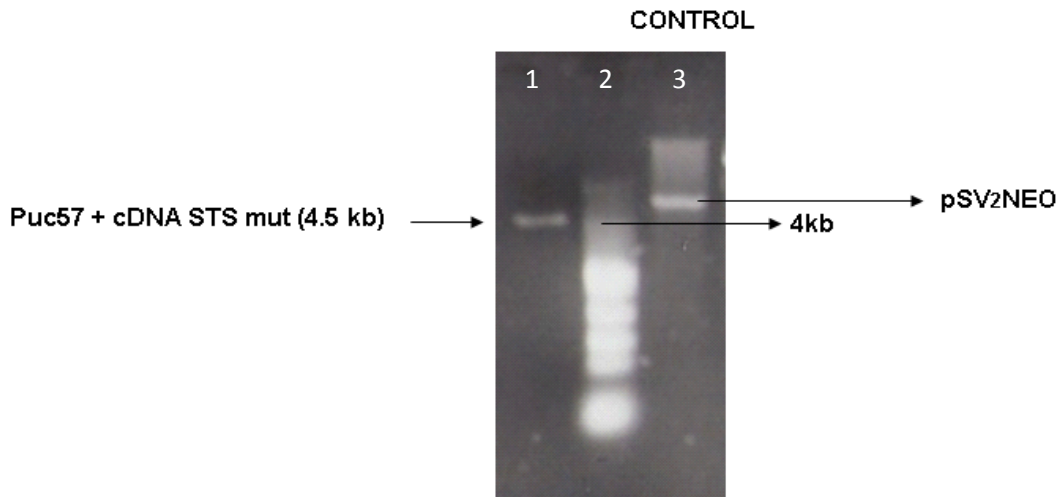


Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa que muestra el ligamiento entre pUC57 y cDNA-STS. El carril 1 es el pUC57 de 2710 pb ligado al cDNA-STS de 1752 pb (4.5 kb) al ser digerido con la enzima *EcoRI*. El carril 2 es el marcador de peso molecular (4 kb) y el 3 muestra el control pSV₂NEO de 6 kb.

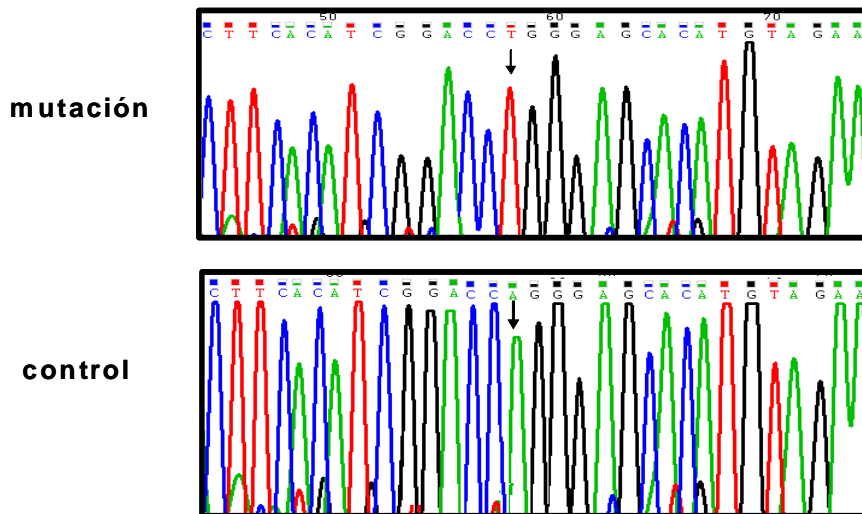


Figura 9. Electroferograma muestra el cambio c1028 CAG > CTG (flechas) en el cDNA del gen *STS* obtenido por mutagénesis dirigida.

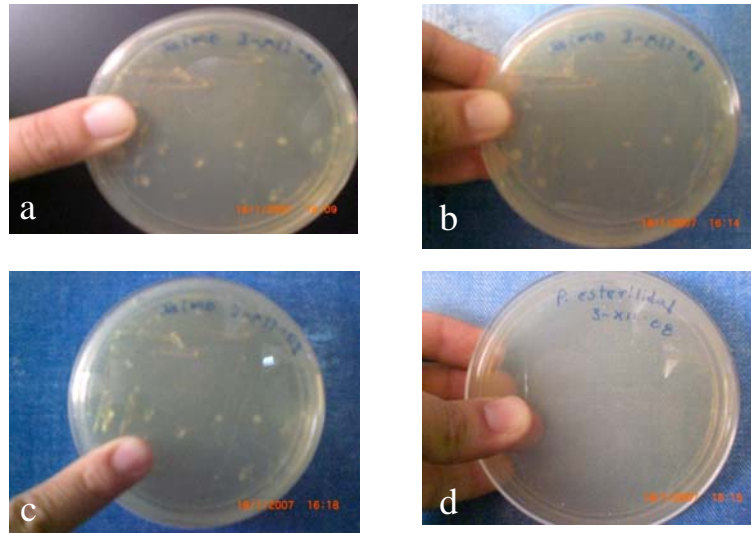


Figura 10. (a, b y c) Colonias de bacterias TOP 10 transformadas con el *pUC57 + STS* mutado seleccionadas con ampicilina. (d) prueba de esterilidad.

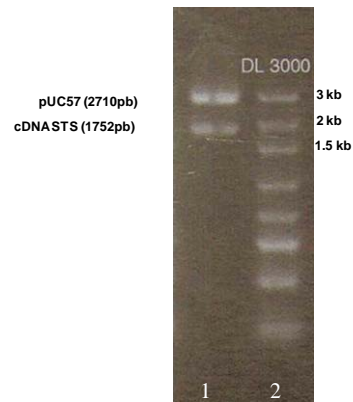


Figura 11. Digestión con las enzimas de restricción *EcoRI* y *BamHI* que separa el vector de clonación *pUC57* (2710pb) y el cDNA-*STS* (1752pb) previamente ligados (carril 1). Marcador de peso molecular (carril 2)

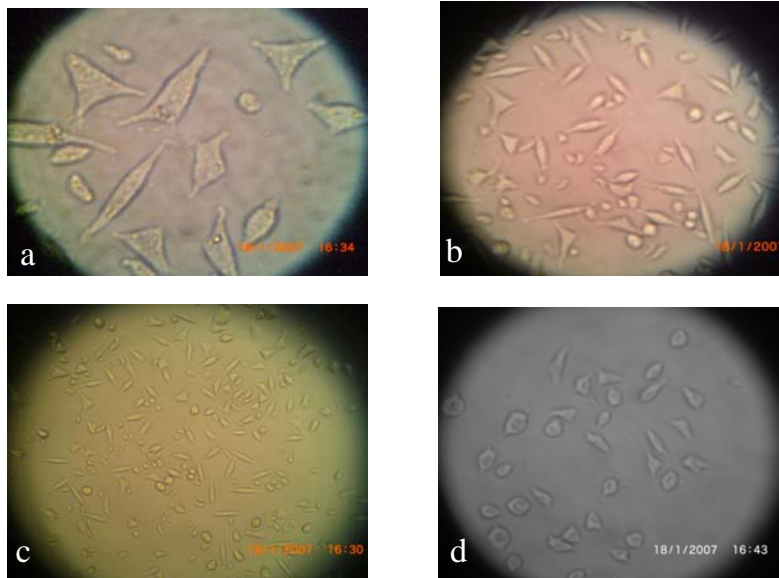


Figura 12. Células A9 (fibroblastos de ratón) en medio del Eagle modificado de Dulbecco (DMEM). (a) objetivo a 60X. (b y d) a 40X y (c) a 10X.

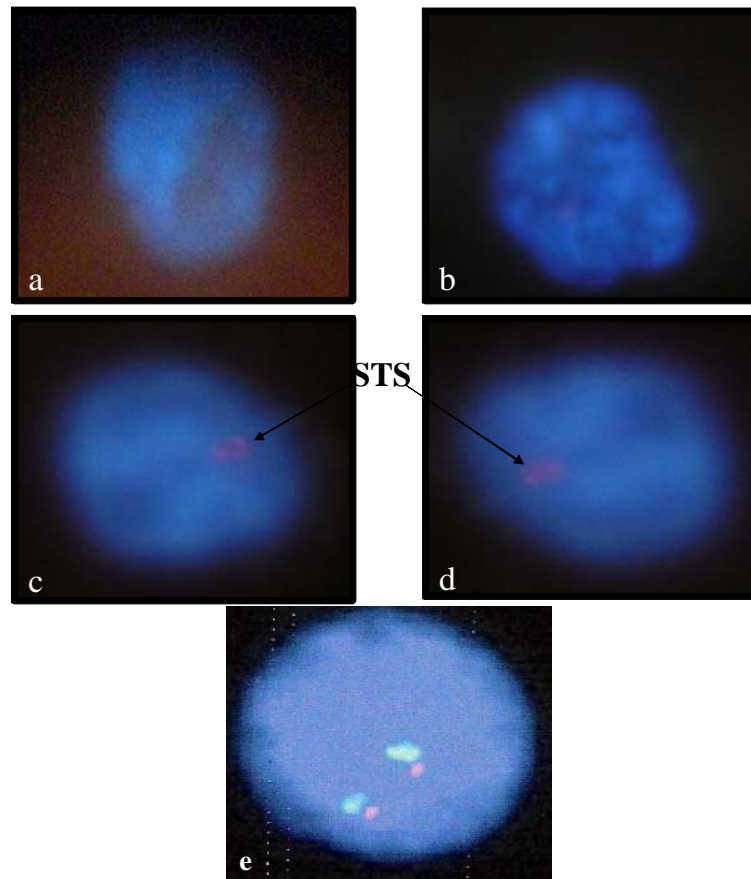


Figura 13. (a y b) núcleo de la célula A9 sin la señal de la sonda específica LSI para el gen *STS*. (c y d) señal de la sonda LSI (rojo) en el núcleo de las células A9 mediante la técnica de FISH. (e) leucocitos normales con la señal LSI y en verde el centromero del cromosoma X.

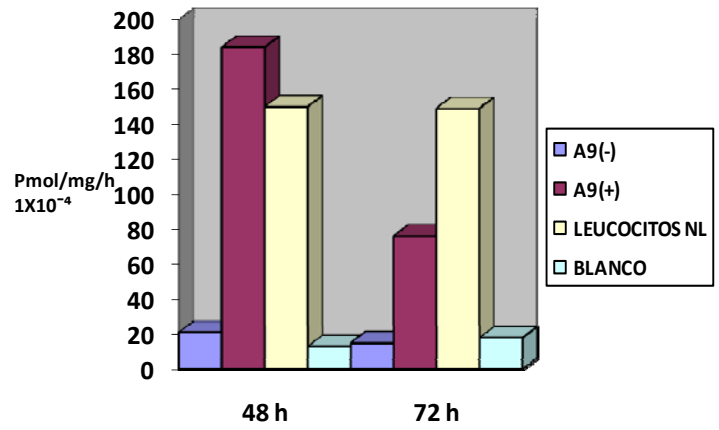


Gráfico 1. Actividad enzimática promedio (1×10^{-4} pmol/mg/h) realizada en células A9 sin transfección (-), con transfección (+), leucocitos normales (NL) y en el blanco a las 48 hrs y 72 h posterior a la transfección.

VIII. DISCUSIÓN

La desulfatación de los β -hidroxiesteroides es esencial para la función y biosíntesis de las hormonas esteroides. La acumulación del colesterol sulfatado se ve reflejada en la presencia de escamas en la piel de pacientes con ictiosis ligada al cromosoma X (ILX), genodermatosis que ha sido estudiada cuidadosamente en nuestro laboratorio. Mas del 90% de los pacientes pierden totalmente el gen *STS* el cual codifica para la enzima SE, mientras que 10 a 5 % corresponden a deleciones intersticiales y mutaciones puntuales (73-77). Datos disponibles en el Human Genome Mutation Database (HGMD: <http://www.hgmd.cf.ac>) indican hasta la fecha 11 mutaciones puntuales críticas para el gen *STS*, nueve conduciendo a sustituciones de aminoácidos y dos a codón de alto, éstas son: Ser341Leu, Gli344Term, Trp372Arg, Trp372Pro o Serina, Gli380Arg, Gln389Term, His444Arg, Cis446Tir, Arg454His, Arg454Cis, Gln560Pro (73-77). Cada una de estas mutaciones resulta en pérdida completa de la actividad enzimática, estas mutaciones puntuales, que casualmente se encuentran en el sitio carboxilo de la proteína, provoca la manifestación fenotípica de la ILX. Con relación a ello nos llama la atención que sucedería si alguna mutación se encontrara en el sitio catalítico de la enzima, teniendo claro que este sitio es de vital importancia para la unión con el sustrato, y así llevar a cabo su función.

La enzima activa o funcional está formada por dos dominios determinados recientemente por cristalografía de rayos X (Fig. 2a) (10), uno globular o polar que contiene el sitio activo o catalítico y otro transmembranal que consiste de 2 α -hélices hidrofóbicas anti paralelas.

El mapeo de mutaciones puntuales sobre la estructura tridimensional ha sugerido que las mutaciones puntuales conocidas llevan a productos de transcripción inestables, interfiere el proceso de traducción, que resulta en el plegamiento inadecuado de productos intermedios, causando desestabilización severa de la arquitectura del sitio activo, con falla en su unión al sustrato o bien inactivando a la proteína (10-11, 78).

Por lo anterior y considerando que la transferencia de genes recombinantes en las células eucariontes cultivadas, conocida como transfección, es una herramienta utilizada ampliamente en estudios de expresión genica, decidimos provocar una mutación puntual dirigida en c1028 A>T del gen *STS* que produce el cambio Q343L ubicado en el sitio activo de la SE. Análisis mediante el software SIFT PROTEIN sugirió que el cambio Q343L sería deletéreo para la actividad enzimática de la SE. Para minimizar errores técnicos decidimos mutar, secuenciar y transfectar (utilizando lipofectamina) en células A9, las cuales carecen del gen *STS*. Para corroborar cualitativa y semicuantitativamente la introducción del gen mutado con el vector en las células A9 se realizó la técnica citomolecular FISH, se observó que la efectividad de la transfección y la hibridación de la sonda específica a la secuencia del cDNA *STS* fue de 20% de las células. Como se muestra en los resultados, la actividad de la enzima SE, utilizando DHEA-SO₄ como sustrato, estuvo presente en las células transfectadas y control sano, a diferencia de las células A9 sin transfección y del control negativo (blanco). La mutación puntual que origina el cambio de una glutamina por una leucina permitió sugerir que no existiría actividad, ya que la glutamina es un aminoácido hidrofílico, polar, no cargado a pH neutro a diferencia de la leucina que es un aminoácido hidrofóbico, apolar ramificado, no cargado a pH neutro. Resultado inesperado a nuestra hipótesis de trabajo ya que la modificación del aminoácido en el sitio activo no se tradujo en pérdida de la función catalítica total.

La mutación c1028 CAG>CTG, Q 343 L /glutamina > leucina, que produce un aminoácido hidrofílico por uno hidrofóbico ubicado en el sitio activo de la enzima de la SE no se traduce en pérdida de actividad enzimática total comparada con las células A9 no transfectadas y el blanco, sin embargo si mantiene su actividad, similar a los leucocitos normales.

Consideramos que nuestra mutación al cambiar un aminoácido hidrofílico por un hidrofóbico no afectó la arquitectura del sitio activo porque si hay actividad enzimática. Llama la atención que la actividad enzimática en las células A9(+) disminuyó de 24 a 72 hrs posterior a la transfección probablemente debido a que las mismas células expulsaron el plásmido.

Asumimos que el RNAm estuvo presente (aunque no se determinó) ya que existe actividad enzimática. Parecería ser que el aminoácido Q343, involucrado en la unión al Ca^{++} mantiene su actividad, no es requerido sustancialmente para que se lleve a cabo la catálisis de la SE. Con este resultado se prueba que el cambio Q343L no es deletéreo en la proteína.

Es importante seguir realizando estudios de mutagénesis dirigida en otros sitios del extremo catalítico, para ampliar y conocer más del funcionamiento o para confirmar la repercusión que se tiene en la conformación de la proteína total.

Las hipótesis de los cambios deletéreos o no consecuencia de mutaciones, no siempre corresponden a lo que ocurre con los estudios *in vitro*, como observamos en este estudio. El tamizar 100 o más individuos para confirmar si se trata o no de un polimorfismo es una herramienta útil, sin embargo la confirmación definitiva solo se lleva a cabo realizando los experimentos que indiquen con certeza la repercusión de este cambio en el DNA sobre la proteína implicada.

De igual forma sería interesante hacer un tamizaje poblacional para caracterizar polimorfismos en este gen ya que no se han informado en nuestra población y el cambio mutacional en el gen *STS* que se realizó, más bien representa un tipo de cambio neutro en la proteína SE.

IX. REFERENCIAS

- 1.-Cockayne EA. Inherited Abnormalities of the Skin and Its Appendages. London: Oxford University Press, 1933.
- 2.- Wells RS, Kerr CB. Genetic Classification of ichthyosis. *Arch Dermatol* 1965; 92: 1-6.
- 3.- Shwayer T, Ott F. All about ichthyosis. *Pediatric Clin North Am* 1991; 38: 597-602
- 4.- Wells RS, Kerr CB. The Histology of Ichthyosis. *J Invest Dermatol* 1966; 46: 530-5.
- 5.-Ballabio A, Beaudet A, Sly W, Scriver Ch. The metabolic and molecular bases of inherited disease, seventh edition. Mc Graw-Hill; 1995:2999-3017.
- 6.- Wells RS, Kerr CB. Clinical features of autosomal dominant and sex-linked ichthyosis in an English population. *Br Med J*. 1966; 1:947-49.
- 7.- Alpher J.C. Genetic disorders of skin, 2th edition. Toronto. Mosby year book; 1991:173-75.
- 8.- Sever R, Frost P, Weinstein GD, Eye changes in ichthyosis. *J A Med Assoc* 1968; 206: 2283-6
- 9.- Lykkesfeldt G, Nielsen MD, Lykkesfeldt AE. Placental steroid sulfatase deficiency: biochemical diagnosis and clinical review. *Obstet Gynecol* 1984; 64: 49-54.
- 10.- Merret JD, Wells RS, Kerr C, Barr A. Discriminant function analysis of phenotype variants in ichthyosis. *Am J Hum Genet* 1967; 19 (4): 575-85.
- 11.- Shapiro LJ. *Adv Human Genetic*. 1985; 14: 331-381.
- 12.- Shapiro LJ, Buxman MM, Vidgoff J, Dimond RL. Enzymatic basis of typical X-linked ichthyosis. *Lancet* 1978; 2: 756.
- 13.- Ballabio A, G. Parenti, R. Carrozzo, G. Sebastio, G. Andria, V. Buckle, et al., Isolation and characterization of a steroid sulfatase cDNA clone: genomic deletions in patients with X-chromosome-linked ichthyosis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1987; 84: 4519-4523.
- 14.- French AP, Warren JC. Properties of steroid sulfatase and arylsulfatase activities of human placenta *Biochem J*, 1969; 105: 410-14.
- 15.- Vaccaro AM, Salviolo R, Renola I. Purification and properties of arylsulfatase C from human placenta. *Enzyme*. 1987; 37: 115-26.
- 16.- G.R.J. Burns, Purification and partial characterization of arylsulphatase C from human placental microsomes, *Biochim. Biophys. Acta* 1983; 759: 199- 204. 1987; 7: 115.
- 17.- Yen PH, Allen E, Birgit M, Mohandas T, Wang N, Tagart RT, Shapiro LJ. Cloning and expression of steroid sulfatase cDNA and the frequent occurrence of deletions in STS deficiency: implications for X-Y interchange. *Cell* 1987; 49: 443.
- 18.- C. Stein, A. Hille, J. Seidel, S. Rijnbout, A. Waheed, B. Schmidt, H. Gueze, K. von Figura, Cloning and expression of human steroid sulfatase, *J. Biol. Chem.* 1989; 264: 13865- 13872.
- 19.-Hobkirk R. Steroid sulfotransferases and steroid sulfate sulfatases: characteristics and biological role. *Can J Biochem Cell Biol* 1985, 63: 1127-44.
- 20.-Dibbelt L, Kuss E. Human placental steroid sulfatase: Interaction of the isolated enzyme with substrates, products, transition-state, analogues, amino-acid modifiers and anion transport inhibitors. *Biol Chem Hoppe-Seyler* 1991; 372: 173-85.
- 21.-Chang PL, Mueller OT, Lafrenie RM, Varey PA, Rosa EN, Davidson RG, Henry WM, Shows TB. The human arylsulfatase-C isoenzymes: two distinct genes that escape from X inactivation. *Am J Hum Genet* 1990; 46: 729-37.
- 22.-Miyakawa Y, Kawano Y, Taniyama K, Mori N. Steroid sulfatase activity in human leukocytes. *Gynecol Obstet Invest* 1994; 38: 191-3.
- 23.- Stein C, Hile A, Seidel J, Rijnbout S, Waheed A, Schmid, Geuze H. Cloning and expression of human steroid-sulfatase. *J Biol Chem* 1989; 264: 13865-72.
- 24.- F.G. Hernandez-Guzman, T. Higashiyama, Y. Osawa, D. Ghosh, Purification, characterization and crystallization of human placental estrone/dehydroepiandrosterone sulfatase, a membrane-bound enzyme of the endoplasmic reticulum, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2001; 78: 441- 50.
- 25.- F.G. Hernandez-Guzman, T. Higashiyama, W. Pangborn, Y. Osawa, D. Ghosh, Structure of human estrone sulfatase suggests functional roles of membrane association, *J. Biol. Chem.* 2003; 278: 22989- 22997.
- 26.-Li XM, Alperin ES, Salido E, Gong Y, Yen P, Shapiro LJ. Characterization of the promoter region of human steroid sulfatase: a gene which escapes X inactivation. *Somat Cell Moll Genet* 1996; 22: 105-17.
- 27.-Hirato K, Suzuki T, Hondo T, Saito H, Yanahira T. Steroid sulfatase activities in human leukocytes: biochemical and clinical aspects. *Endocrinol Jpn* 1991; 38: 597-602.
- 28.-Shapiro LJ, Yen P, Pomerantz D, Martin E, Rolewie L, Mohandas T. Molecular studies of deletions at the human steroid sulfatase locus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 8477-81.
- 29.-Bonifas JM, Morley BJ, Oakey RE, Waikon Y, Epstein EH. Cloning of cDNA for steroid sulfatase: frequent occurrence of gene deletions in patients with recessive X-chromosome-linked ichthyosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 9248-51.
- 30.-Basler E, Grompe M, Parenti G, Yates J, Ballabio A. Identification of point mutations in the steroid sulfatase gene of three patients with X-linked ichthyosis. *Am J Hum Genet.* 1992; 50: 483-91.
- 31.-Morita E, Katoh O, Shinoda S, Hiragon T, Tanaka T, Kameyoshi Y, Yamamoto S. A novel point mutation in the steroid sulfatase gene in X-linked ichthyosis. *J Invest Dermatol* 1997; 109: 244-45.
- 32.-Cuevas-Covarrubias SA, Kofman-Alfaro SH, Maya-Nuñez G, Diaz-Zagoya JC, Orozco OE. X-linked ichthyosis in Mexico: High frequency of deletions in the steroid sulfatase encoding gene. *Am J Med Genet* 1997; 72: 415-16.
- 33.-Alperin ES, Shapiro LJ: Characterization of point mutations in patients with X-linked ichthyosis. Effects on the structure and function of the steroid sulfatase protein. *J Biol Chem.* 1997; 272: 20756- 63,.
- 34.-Cuevas Covarrubias S, Kofman S, Orozco E, Diaz JC. The biochemical identification of carrier state in mother of sporadic cases of recessive X-linked ichthyosis. *Genet Counsel* 1995; 6: 103-107.
- 35.-Oyama N, Satoh M, Iwatsuki K, Kaeko F: Novel point mutation in the steroid sulfatase gene in patients with X-linked ichthyosis: transfection analysis using the mutated genes. *J Invest Dermatol.* 2000; 114: 1195-99,.
- 36.- Crystal RG. Transfer of genes to humans: early lessons and obstacles to success. *Science.* 1995; 270: 404-410.

- 37.- Yang Y, Nunes FA, Berencsi K, Furth EE, Gonczol E, Engelhardt JE. Inactivation of E2a in recombinant adenoviruses improves the prospect for gene therapy for cystic fibrosis. *Nat. Genet.* 1994c; 7:362-369.
- 38.- Yang Y, Ertl HC, Wilson JM. MHC class I-restricted cytotoxic T lymphocytes to viral antigens destroy hepatocytes in mice infected with E1-deleted recombinant adenovirus. *Immunity.* 1994a; 1:433-442.
- 39.- Yang Y, Nunes FA, Berencsi K, Furth EE, Gonczol E, Wilson JM. Cellular immunity to viral antigens limits E1-deleted adenoviruses for gene therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1994b; 91: 4407-4411.
- 40.- Smith AE. Viral vector in gene therapy vector. *Annu. Rev. Microbiol.* 1995;55:5493-5498.
- 41.- Alton EW, Middleton PG, Caplen NJ, Smit SN, Steel DM, Munkonge FM y col. Non-invasive liposomes-mediated gene delivery can correct the ion transport defect in cystic fibrosis mutant mice. *Nat. Genet.* 1993; 5: 135-142.
- 42.- Qing-Rong C, Dhruv K, Sanford A, James M. Liposomes complex to plasmids encoding angiostatin and endostatin inhibit breast cancer nude mice. *Cancer Res.* 1999; 59: 3308-3312.
- 43.- Mitani K, Graham FL, Caskey CT. Transduction of human bone marrow by adenoviral vector. *Human Gene Ther.* 1994; 5: 941-948.
- 44.- Kruger M, Berger C, Wong-Staal F. Use of ribozymes to inhibit gene expression. *Meth. Enzymol.* 1999; 306: 207-225.
- 45.- Shinoura N, Sakurai S, Asai A, Kirino T, Hamada H. Transduction of a fiber-mutant adenovirus for the HSVtk gene highly augments the cytopathic effect towards gliomas. *Jap. J. Cancer Res.* 2000;91: 1028-1034.
- 46.- Hodgson J. UK rules out new gene therapy laws. *Nature.* 1993; 366: 194.
- 47.- Mclachlin JR, Mittereder N, Daucher MB, Kadan M, Eglitis MA. Factors affecting retroviral vectors function and structural integrity. *Virology.* 1993; 195: 1-5.
- 48.- Otto E, Jones-Trower A, Vanin EF, Stambaugh K, Mueller SN. Characterization of a replication-competent retrovirus resulting from recombination of packaging and vectors sequences. *Hum. Gene Ther.* 1994; 567-575.
- 49.- Miller AD. Human gene therapy comes of age. *Nature.* 1992; 357: 455-460.
- 50.- Skotzko M, Wu L, Anderson WF, Gordon EM, Hall FL. Retroviral vector-mediated gene transfer of antisense cyclin G1(GYCG1) inhibits proliferation of human osteogenic sarcoma cells. *Cancer Res.* 1995; 49: 807-838.
- 51.- Horwitz MS. Adenoviridae and their replication. In *virology*, ed. BN Fields, DM Knipe, New York: Raven, 1990; 1679-1721.
- 52.- Mittal SK, McDermott MR, Johnson D, Prevec L, Graham FL. Monitoring foreign gene expression by human adenovirus-based vector using the fire-fly luciferase gene as reporter. *Virus Res.* 1993; 28: 67-90.
- 53.- Snyder RO, Miao CH, Patijn GA, Spratt SK, Danos O, Nagy D, y cols. Persistent and therapeutic concentrations of human factor IX in mice after hepatic gene transfer of recombinant AAV vector. *Nature Genet.* 1997; 16(3): 270-276.
- 54.- Glorioso JC, Deluca NA, Fink DJ. Development and application of herpes simplex virus vectors for human gene therapy. *Annu. Rev. Microbiol.* 1995; 49: 675-710.
- 55.- Mulligan RC. The basic science of gene therapy. *Science.* 1993; 260: 926-932.
- 56.- Lazo PA. Human gene therapy: Trends and current problems. *Medicina clinica.* 1996; 106(12) 469-476.
- 57.- Nabel EG, Gordon D, Yang ZH, Xu L, San H, Plautz GE and cols. Gene transfer in vivo with DNA-liposome complexes: lack of autoimmunity and gonadal localization. *Hum. Gene Ther.* 1992; 3:649-656.
- 58.- Xu M, Kumar D, Srinivas S, Detolla LJ, Yu SF, Stass SA. Parenteral gene therapy with p53 inhibits human breast tumors in vivo through a bystander mechanism without evidence of toxicity. *Hum Gene Ther.* 1997; 8: 177-185.
- 59.- Khan SA. Rolling-circle replication of bacterial plasmids. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1997; 61: 442-455.
- 60.- Romero D y Palacios R. Gene amplification and genomic plasticity in prokaryotes. *Annu Rev Genet.* 1997; 31: 91-111.
- 61.- Khan SA. Plasmid rolling-circle replication: recent development. *Mol. Microbiol.* 1997; 61: 442-455.
- 62.- Lopez-Meza JE. Biología molecular de los plásmidos RC y su función en *Bacillus thuringiensis*. *Ciencia Nicolaita.* 2000; 29: 23-30.
- 63.- Del Solar G, Alonso JC, Espinoza M, Diaz Oreja R. Broad-host-range plasmid replication: an open question. *Mol Microbiol.* 1996; 21: 661-666.
- 64.- Pari GS, and Keown WA. Experimental strategies in efficient transfection of mammalian cells: calcium phosphate and DEAE-dextran. *Methods Mol Bio.* 1997; 62: 301-316.
- 65.- Smith JG, Walzem RL and German JB. Liposome as agents of ADN transfer. *Biochim Biophys Acta.* 1993; 1154: 327-340.
- 66.- Felgner PL, Gadek TR, Holm M, Roman R, Chan HW, Wenz et al., Lipofection: A highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1987;84: 7413-7417.
- 67.- Weiskirchen R, Kneifel J, Weiskirchen S, Van de Leur E, Kunz D and Gressner AM. Comparative evaluation of gene delivery devices in primary cultures of rat hepatic stellate cells and rat myofibroblasts. *BMC Cell Biology.* 2000;1: 4
- 68.- Felgner PL, Ringold GM. Cationic liposome-mediated transfection. *Nature.* 1989;337: 387-388.
- 69.- Toral Lopez J, Gonzalez Huerta LM, Cuevas Covarrubias SA. Segregation analysis in X-Linked ichthyosis: Paternal transmission of the affected X-Chromosome. *Br J Dermatol.* 2008, April, 158(4): 818-20.
- 70.- Gillar EF, Affara NA, Yates JR, Goudie DR, Lambert J, Aitken DA, Ferguson MA. Deletion of a DNA sequence in eight of nine families with X-Linked ichthyosis. (steroid sulphatase deficiency). *Nucleic Acids Research.* 1987; (15):3977-3985.
- 71.- Ballabio A, Bardoni B, Guillioli S, et al. Two families of low-copy-number repeats are interspersed on Xp22.3: implications for the high frequency of deletions in this region. *Genomics.* 1990;8:263-270.
- 72.- Yen P, Xiao-Miao L, Siao-Ping T, et al. Frequent deletions of the human X chromosome distal short arm result from recombination between low copy repetitive elements. 1990; 51: 603-610.
- 73.- Li X-M, Yen PH, Shapiro LJ. Characterization of a low copy repetitive element S232 involved in the generation of frequent deletions of the distal short arm of the human X Chromosome. *Nucleic Acid Res.* 1992; 20 : 1117.
- 74.- Yen PH, Li X-M, Tsai S-P, Johnson C, et al. Frequent deletions of the human X-chromosome distal short arm result from recombination between low copy repetitive elements. *Cell.* 1990; 61: 603.
- 75.- Saeki H, Kuwata S, Nakagawa H, et al. Deletion pattern of steroid sulphatase gene in Japanese patients with X-linked ichthyosis. *Br.J.Dermatol.* 1998; 139: 96-99.

- 76.- Aviram-Goldring A, Goldman B, Netanelov-Shapira I, et al. Deletion patterns of the STS gene and flanking sequences in Israeli X-linked ichthyosis patients and carriers: Analysis by polymerase chain reaction and fluorescence in situ hybridization techniques. *In J Dermatol.* 2000;39:182-187.
- 77.- Jiménez-Vaca AL, Valdes-Flores M, Rivera-Vega MR, González-Huerta LM, Kofman-Alfaro SH, Cuevas-Covarrubias SA. Deletion Pattern of the STS Gene in X-linked Ichthyosis in a Mexican Population. *Molecular Medicine.* 2001;72(12):845-849.
- 78.- Petronczki M, Siomos M, Nasmyth. Un Ménage à Quatre: The Molecular Biology of Chromosome Segregation in Meiosis. *Cell.* 2003; 112: 423-440.
- 79.- Kunz C and Schär. Meiotic Recombination: Sealing the Partnership at the Junction. *Current Biology.* 2004;14: 962-964.
- 80.- McDougall A, Elliot D, Hunter N. Pairing, connecting, exchanging, pausing and pulling chromosomes. *EMBO reports.* 2005;6:2: 120-125.
- 81.- Stankiewicz P, Lupski JR. Genome architecture, rearrangements and genomic disorders. *Trends in Genetics. Review* 2002;(2) 18:74-81.
- 82.- Shaw CJ, Lupski JR. Implications of human genome architecture for rearrangement-based disorders: the genomic basis of disease. *Human Molecular Genetics, Review* 2004;13: 57-64.
- 83.- Cooper DN, Krawczak M. The slipped mispairing mechanism. *Human Gene Mutation, BIOS Scientific Publishers, Oxford.*
- 84.- Gonzalez LM, Messina O, Toral J, Rivera MR, Kofman SH, Cuevas SA. Point Mutation in the Gene STS in Severely Affected Patient with X-linked Recessive Ictiosis. *Acta Derm Venereol.* 2006;86:78-9.
- 85.-Basler E, Grompe H, Parenti G, Yates J, Ballabio A. Identification of point mutation in steroid sulfatase gene of three patients with X-Linked ichthyosis. *Am J Hum Genet.* 1992; 3: 483-91.
- 86.- Valdes Flores M, Jimenez Vaca AL, Kofman Alfaro SH, Cuevas Covarrubias SA. Characterization of a novel point mutation(Arg432His) in X- Linked ichthyosis. *Acta Derm Venereol.* 2001, Jan-Feb;81(1): 54-5.
- 87.- Gonzales-Huerta LM, Rivera Vega MR, Kofman-Alfaro, Cuevas Covarrubias SA. Novel missense mutation (Arg432Cys) in patient with steroid sulfatase deficiency. *Clin endocrinol.* 2003(Oxf); 59 (2): 263-4.
- 88.- Sugawara T, Shimizu H, Hoshin N, Fujimoto Y, Nakajima A, Fujimoto S. PCR Diagnosis of X- Linked ichthyosis: Identification of a novel mutation(E560P) of steroid sulfatase gene. *Hum Mutat.* 2000 Mar;15:296-303
- 89.- Ghosh D. Mutation in X-Linked ichthyosis disrupt the active site structure of estrone/DHEA sulfatase. *Biochim Biophys Acta.* 2004 (1739): 1-4.
- 90.-Perera J, Tormo A, Garcia JL. Preparación , análisis, manipulación y clonaje de DNA. *Ingeniería Genética.* 2002, vol 1. Editorial Sintesis. España.
- 91.-Oyama N, Satoh M, Iwatsuki K, Kaneko F. Novel point mutations in the Steroid Sulfatase Gene in Patients with X-Linked Ichthyosis: Transfection Analysis Using the Mutated Genes. *J Inv Dermatology.* 2000; 6: 1195-1199.
- 92.-Sugawara T, Nomura E, Hoshi N. Both N-terminal and C-terminal regions of steroid sulfatase are important for enzyme activity. *Journal of Endocrinology.* 2006; 188:365-374.
- 93.-Stengel C, Newman SP, Day J M, Tutill HJ, Reed MJ, Purohit A. Effects of mutations and glycosylations on STS activity: A site- directed mutagenesis study. *Molecular and cellular Endocrinology.* 2008; 283: 76-82.