

*ANÁLISIS  
GENÉTICO Y MOLECULAR  
DEL SÍNDROME DE  
MAROTEAUX-LAMY*



ELENA GARRIDO FERNÁNDEZ

2008



*ANÁLISIS*  
*GENÉTICO Y MOLECULAR*  
*DEL SÍNDROME DE*  
*MAROTEAUX-LAMY*

Memoria presentada por

**ELENA GARRIDO FERNÁNDEZ**

para optar al grado de

**DOCTORA POR LA UNIVERSIDAD DE BARCELONA**

Tesis realizada bajo la dirección de los  
Dres. Bru Cormand, Daniel Grinberg y Lluïsa Vilageliu  
en el Departamento de Genética de la Facultad de Biología  
de la Universidad de Barcelona

Programa de Genética (Bienio 2001-2003)

Elena Garrido

Bru Cormand

Daniel Grinberg

Lluïsa Vilageliu

Barcelona  
2008



*«Antes de juzgar a un hombre, camina tres  
lunas con sus mocasines»*

*proverbio indio*



## ÍNDICE

<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> _____	<b>3</b>	<b>III. BIOQUÍMICA</b> _____	<b>33</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> _____	<b>5</b>	LA ENZIMA:	
<b>ABREVIATURAS</b> _____	<b>7</b>	N-ACETILGALACTOSAMINA	
<b>PRESENTACIÓN</b> _____	<b>11</b>	4-SULFATASA _____	<b>33</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> _____	<b>13</b>	1. LA FAMILIA DE LAS SULFATASAS ____	<b>33</b>
<b>I. CLÍNICA</b> _____	<b>15</b>	2. LOS SUSTRATOS Y LAS FUNCIONES BIOLÓGICAS DE LAS SULFATASAS	
1. LAS ENFERMEDADES DE ACUMULACIÓN LISOSÓMICA _____	<b>15</b>	EUCARIOTAS _____	<b>33</b>
2. LAS MUCOPOLISACARIDOSIS _____	<b>17</b>	3. LAS SULFATASAS HUMANAS _____	<b>33</b>
3. LA MUCOPOLISACARIDOSIS DE TIPO VI, O SÍNDROME DE MAROTEAUX-LAMY ____	<b>17</b>	4. SECUENCIAS CONSENSO DE LAS SULFATASAS _____	<b>35</b>
<i>Historia</i> _____	<b>17</b>	5. LA ARSB HUMANA _____	<b>38</b>
<i>Herencia</i> _____	<b>18</b>	<i>Estructura del sitio activo de la ARSB</i>	
<i>Prevalencia</i> _____	<b>18</b>	<i>humana</i> _____	<b>40</b>
<i>Manifestaciones y tipos clínicos</i> _____	<b>19</b>	<i>Mecanismo catalítico</i> _____	<b>41</b>
<i>Prognosis</i> _____	<b>21</b>	<b>EL SUSTRATO: EL DERMATÁN</b>	
<i>Diagnóstico</i> _____	<b>22</b>	SULFATO _____	<b>42</b>
<b>II. BIOLOGÍA CELULAR</b> _____	<b>24</b>	1. DEFINICIÓN _____	<b>42</b>
LOS LISOSOMAS _____	<b>24</b>	2. ESTRUCTURA QUÍMICA _____	<b>42</b>
1. DEFINICIÓN _____	<b>24</b>	3. BIOSÍNTESIS Y DEGRADACIÓN ____	<b>42</b>
2. FORMACIÓN Y DEGRADACIÓN EN LOS LISOSOMAS _____	<b>25</b>	4. LOCALIZACIÓN Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA _____	<b>43</b>
3. LAS HIDROLASAS LISOSÓMICAS ____	<b>26</b>	<b>IV. GENÉTICA MOLECULAR</b> _____	<b>44</b>
4. SÍNTESIS DE LAS HIDROLASAS LISOSÓMICAS _____	<b>26</b>	1. EL GEN DE LA 4-SULFATASA _____	<b>44</b>
<i>Función del núcleo oligosacárido</i> _____	<b>26</b>	2. MUTACIONES PATOLÓGICAS ____	<b>44</b>
<i>Estructura y síntesis del núcleo</i> <i>oligosacárido</i> _____	<b>27</b>	3. POLIMORFISMOS _____	<b>47</b>
<i>Efecto de los N-glicanos sobre el plegamiento</i> <i>de las proteínas</i> _____	<b>27</b>	4. CARACTERIZACIÓN DE ALELOS MUTADOS _____	<b>48</b>
<i>El ciclo calnexina-calreticulina</i> _____	<b>28</b>	5. RELACIÓN GENOTIPO-FENOTIPO ____	<b>49</b>
<i>Control de calidad en RE: Degradación asociada</i> <i>a RE (ERAD)</i> _____	<b>29</b>	6. MODELOS ANIMALES _____	<b>49</b>
<i>Control de calidad en el complejo de Golgi</i> ____	<b>29</b>	<b>V. TERAPIA</b> _____	<b>51</b>
5. TRANSPORTE DE LAS HIDROLASAS LISOSÓMICAS _____	<b>30</b>	1. TERAPIA DE SOPORTE _____	<b>51</b>
		2. TERAPIA GÉNICA _____	<b>51</b>
		3. TERAPIA DE RESTITUCIÓN ENZIMÁTICA _____	<b>53</b>
		4. OTRAS PERSPECTIVAS TERAPÉUTICAS _____	<b>55</b>
		<i>Terapia de reducción de sustrato</i> _____	<b>55</b>
		<i>Chaperonas químicas</i> _____	<b>55</b>

<i>Supresión de codones de terminación mediante antibióticos aminoglicósidos</i> _____	56	<b>DISCUSIÓN</b> _____	<b>151</b>
<i>Dianas terapéuticas contra la degradación del RNA</i> _____	59	1. MOTIVO DE LA TESIS _____	153
<i>Otros tipos de terapia</i> _____	60	2. FENOTIPO CLÍNICO DE LOS PACIENTES ESPAÑOLES Y ARGENTINOS DE MPS VI_	153
<b>OBJETIVOS</b> _____	<b>63</b>	3. DISTRIBUCIÓN Y PREVALENCIA DE LAS MUTACIONES ENCONTRADAS EN EL GEN ARSB _____	154
<b>RESULTADOS</b> _____	<b>65</b>	4. ANÁLISIS DEL GEN ARSB: BÚSQUEDA DE MUTACIONES CAUSANTES DEL SÍNDROME DE MAROTEAUX-LAMY _____	154
<b>CAPÍTULO I</b> _____	<b>67</b>	<i>Mutaciones de cambio de sentido</i> _____	155
1. PRIMER ARTÍCULO: " <i>Identification of the molecular defects in Spanish and Argentinian mucopolysaccharidosis VI (Maroteaux-Lamy syndrome) patients, including 9 novel mutations</i> " _____	68	<i>Mutaciones sin sentido</i> _____	159
2. MATERIAL COMPLEMENTARIO AL PRIMER ARTÍCULO _____	77	<i>Deleciones</i> _____	159
<b>CAPÍTULO II</b> _____	<b>84</b>	<i>Mutaciones implicadas en el mecanismo de corte y empalme de exones</i> _____	161
1. SEGUNDO ARTÍCULO: " <i>Maroteaux-Lamy syndrome: functional characterization of pathogenic mutations and polymorphisms in the arylsulfatase B gene</i> " _____	85	5. ESTUDIO DE POLIMORFISMOS EN EL GEN ARSB _____	163
2. MATERIAL COMPLEMENTARIO AL SEGUNDO ARTÍCULO _____	105	6. CORRELACIÓN GENOTIPO-FENOTIPO	165
<b>CAPÍTULO III</b> _____	<b>124</b>	7. ESTUDIOS DE EXPRESIÓN DE MUTACIONES EN EL GEN ARSB _____	165
1. TERCER ARTÍCULO: " <i>Gentamicin-induced supression of MPS VI-causing nonsense mutations:an assay for a possible aminoglycoside-mediated therapy</i> " _____	125	8. ESTUDIOS SOBRE LA DEGRADACIÓN DE mRNA MEDIANTE EL NMD _____	167
2. MATERIAL COMPLEMENTARIO AL TERCER ARTÍCULO _____	144	9. TERAPIA CON ANTIBIÓTICOS AMINOGLICÓSIDOS _____	168
		<b>CONCLUSIONES</b> _____	<b>175</b>
		<b>BIBLIOGRAFÍA</b> _____	<b>179</b>
		<i>Enlaces de internet</i> _____	194
		<b>AGRADECIMIENTOS</b> _____	<b>199</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

### INTRODUCCIÓN

#### I. CLÍNICA

**Tabla 1-1.** Principales enfermedades de acumulación lisosómica \_\_\_\_\_ 16

#### III. BIOQUÍMICA

**Tabla 3-1.** Sustratos y localización subcelular de las sulfatasas humanas y desórdenes hereditarios resultantes de la deficiencia de una única sulfatasa \_\_\_\_\_ 34

**Tabla 3-2.** Propiedades catalíticas de las arilsulfatasas humanas \_\_\_\_\_ 35

**Tabla 3-3.** Posición y funciones propuestas para los aminoácidos y cationes metálicos del sitio activo de la ARSB \_\_\_\_\_ 40

#### IV. GENÉTICA MOLECULAR

**Tabla 4-1.** Mutaciones sin sentido \_\_\_\_\_ 45

**Tabla 4-2.** Deleciones e inserciones \_\_\_\_\_ 45

**Tabla 4-3.** Mutaciones de cambio de sentido \_\_\_\_\_ 46

**Tabla 4-4.** Mutaciones en sitios de corte y empalme de exones (*splicing*) \_\_\_\_\_ 47

**Tabla 4-5.** Polimorfismos en regiones codificantes \_\_\_\_\_ 47

**Tabla 4-6.** Expresión de alelos mutados presentes en el gen *ARSB* de pacientes con MPS VI \_\_\_\_\_ 48

## RESULTADOS

### CAPÍTULO I

**Tabla 1-1.** Cebadores utilizados para la amplificación del gen *ARSB* \_\_\_\_\_ 78

**Tabla 1-2.** Tabla completa de mutaciones patogénicas y polimorfismos de pacientes MPS VI \_\_\_\_\_ 79

**Tabla 1-3.** Tabla completa de mutaciones patogénicas y polimorfismos de familiares de pacientes de MPS VI \_\_\_\_\_ 80

**Tabla 1-4.** Frecuencias alélicas de polimorfismos del gen *ARSB* en población control española \_\_\_\_\_ 80

**Tabla 1-5.** Enzimas y cebadores utilizados para el análisis de restricción de polimorfismos y mutaciones en el gen *ARSB* \_\_\_\_\_ 81

### CAPÍTULO II

**Tabla 2-1.** Cebadores empleados en la mutagénesis dirigida \_\_\_\_\_ 106

**Tabla 2-2.** Cuadro de actividades enzimáticas de mutaciones y polimorfismos en el gen *ARSB* \_\_\_\_\_ 109

**Tabla 2-3.** Cuadro de cuantificación de *western blot* de proteínas *ARSB* mutadas expresadas en células COS-7 \_\_\_\_\_ 111

### CAPÍTULO III

**Tabla 3-1.** Cebadores utilizados en la mutagénesis dirigida para la creación de mutaciones sin sentido \_\_\_\_\_ 145

**Tabla 3-2.** Cuadro de actividades enzimáticas de mutaciones sin sentido antes y después del tratamiento con gentamicina \_\_\_\_\_ 145



# ÍNDICE DE FIGURAS

## INTRODUCCIÓN

### I. CLÍNICA

<b>Figura 1-1.</b> Posible esquema de la patología de las enfermedades de acumulación lisosómica _____	15
<b>Figura 1-2.</b> Niños afectados por la forma severa de MPS VI _____	18
<b>Figura 1-3.</b> Toulouse-Lautrec, posible enfermo de MPS VI _____	18
<b>Figura 1-4.</b> Variabilidad en la progresión de la MPS VI _____	19
<b>Figura 1-5.</b> Rasgos posturales típicos de la MPS VI _____	20
<b>Figura 1-6.</b> Rasgos faciales típicos de la MPS VI _____	20
<b>Figura 1-7.</b> Anormalidades orales típicas de la MPS VI _____	21
<b>Figura 1-8.</b> Disostosis múltiple en pacientes de MPS VI _____	21
<b>Figura 1-9.</b> Mano en forma de garra en pacientes de MPS VI _____	21
<b>Figura 1-10.</b> Manifestaciones oculares en pacientes de MPS VI _____	21

### II. BIOLOGÍA MOLECULAR

<b>Figura 2-1.</b> Anatomía externa del lisosoma _____	24
<b>Figura 2-2.</b> Visualización histoquímica de los lisosomas _____	24
<b>Figura 2-3.</b> Vías de degradación en los lisosomas _____	25
<b>Figura 2-4.</b> Representación esquemática del transporte proteico y los pasos de procesamiento de las glicoproteínas lisosómicas a través del RE y el complejo de Golgi _____	26
<b>Figura 2-5.</b> Estructura del núcleo N-oligosacárido _____	27
<b>Figura 2-6.</b> Biosíntesis del enlace N-oligosacárido _____	28

<b>Figura 2-7.</b> Reconocimiento de las hidrolasas lisosómicas y reacción del marcador manosa-6-fosfato _____	30
--	----

<b>Figura 2-8.</b> Representación esquemática de los receptores manosa-6-fosfato (RM6P) _____	31
---	----

<b>Figura 2-9.</b> Transporte de las hidrolasas lisosómicas recién sintetizadas hacia el lisosoma _____	32
---	----

### III. BIOQUÍMICA

<b>Figura 3-1.</b> Esquema de la modificación post-transcripcional del residuo esencial de cisteína en el sitio activo de las sulfatasas _____	36
--	----

<b>Figura 3-2.</b> Conservación de la primera secuencia consenso de las sulfatasas humanas _____	36
--	----

<b>Figura 3-3.</b> Conservación interespecífica de las secuencias consenso de la ARSB _____	36
---	----

<b>Figura 3-4.</b> Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de cinco sulfatasas lisosómicas humanas _____	37
---	----

<b>Figura 3-5.</b> Esquema de la ARSB _____	38
---	----

<b>Figura 3-6.</b> Estructura tridimensional de la ARSB y superficie molecular de la ARSB en función de su potencial electrostático _____	38
---	----

<b>Figura 3-7.</b> Diagrama topológico del pliegue de la ARSB _____	39
---	----

<b>Figura 3-8.</b> El sitio activo de la ARSB _____	40
---	----

<b>Figura 3-9.</b> Esquema propuesto para la catálisis del sulfato éster por las sulfatasas _____	41
---	----

<b>Figura 3-10.</b> Sitios de corte del éster de sulfato en el dermatán sulfato _____	41
---	----

<b>Figura 3-11.</b> Principales unidades de disacárido repetidas en el dermatán sulfato y los condroitín sulfato _____	42
--	----

<b>Figura 3-12.</b> Vía de degradación del dermatán sulfato _____	43
---	----

### IV. GENÉTICA MOLECULAR

<b>Figura 4-1.</b> Representación de la estructura del gen ARSB _____	44
---	----

## V. TERAPIA

<b>Figura 5-1.</b> Terapias para las enfermedades de acumulación lisosómica _____	51
<b>Figura 5-2.</b> Modelo simplificado del NMD _____	59

## RESULTADOS

### CAPÍTULO I

<b>Figura 1-1.</b> Análisis de restricción de cDNA de los pacientes ML1, ML2 y ML3 _____	83
--	----

### CAPÍTULO II

<b>Figura 2-1.</b> Cuantificación de la recuperación de mRNA tras el tratamiento con cicloheximida (CHX) en células de los pacientes ML2, ML3, ML4 y ML16 _____	107
<b>Figura 2-2.</b> Cuantificación de los <i>western blots</i> de proteínas ARSB mutadas expresadas en células COS-7 _____	112
<b>Figura 2-3.</b> <i>Western blot</i> de fibroblastos de pacientes de MPS VI _____	112
<b>Figura 2-4.</b> Marcaje de lisosomas y endosomas secundarios mediante tinción por <i>Lysotracker Red</i> en fibroblastos _____	114
<b>Figura 2-5.</b> Marcaje de lisosomas con el anticuerpo H4B4 contra Lamp-2 en fibroblastos _____	114
<b>Figura 2-6.</b> Marcaje de retículo endoplasmático mediante transfección de fibroblastos humanos con el vector pDsRed _____	115
<b>Figura 2-7.</b> Marcaje de lisosomas y retículo endoplasmático mediante transfección con pDsRed y anticuerpo secundario anti-Lamp-2 en COS-7 _____	115

<b>Figura 2-8.</b> Colocalización de ARSB en retículo plasmático de lisosomas _____	117
<b>Figura 2-9.</b> Localización de ARSB en lisosomas de fibroblastos salvajes _____	118
<b>Figura 2-10.</b> Localización de ARSB en lisosomas de fibroblastos del paciente ML2 _____	119
<b>Figura 2-11.</b> Localización de ARSB en lisosomas de fibroblastos del paciente ML3 _____	120
<b>Figura 2-12.</b> Localización de ARSB en lisosomas de fibroblastos del paciente ML4 _____	121
<b>Figura 2-13.</b> Localización de ARSB en lisosomas de fibroblastos del paciente ML5 _____	122
<b>Figura 2-14.</b> Localización de ARSB en lisosomas de fibroblastos del paciente ML16 _____	123

### CAPÍTULO III

<b>Figura 3-1.</b> Localización de la proteína ARSB en fibroblastos control (p.358V; 384S) tras el tratamiento con geneticina (G418) y gentamicina _____	147
<b>Figura 3-2.</b> Localización de la proteína ARSB en fibroblastos ML4 (p.W322X; c.427delG) tras el tratamiento con geneticina (G418) _____	148
<b>Figura 3-3.</b> Localización de la proteína ARSB en fibroblastos ML4 (p.W322X; c.427delG) tras el tratamiento con gentamicina _____	149

## DISCUSIÓN

<b>Figura 1-1.</b> Distribución de las mutaciones encontradas en pacientes de MPS VI a lo largo del gen <i>ARSB</i> _____	154
---	-----

## ABREVIATURAS

4-MU: 4-metilumbeliferona	HS: heparán sulfato
4-MUS: 4-metilumbeliferil sulfato	Kb/pb: kilobases/ pares de bases
cDNA: DNA copia	Kd: constante de afinidad
mRNA/r/t: RNA mensajero/ribosómico/ de transferencia	KDa: kilodaltons de peso molecular
ADP/ATP: adenosín difosfato/ trifosfato	LB: <i>Luria-Bertani broth</i>
ARS: arilsulfatasa	LSD: <i>lysosomal storage disease</i> ,
ARSB: arilsulfatasa B	LTK-: <i>Mouse L cells lacking thymidine kinase</i>
CDMPR: <i>cation-dependent mannose- phosphate receptor</i>	M6P: manosa-6-fosfato
CEU: <i>Central European University</i>	Man: manosa
CFTR: <i>cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i>	<i>mdx: dystrophin-deficient mouse</i>
CHO: <i>chinese hamster ovary cells</i>	MEC: matriz extracelular
CIMPR: <i>cation-independent mannose- phosphate receptor</i>	ML: mucopolidosis
CNX: calnexina	MPS: mucopolisacaridosis
CS: condroitín sulfato	g: gramo
CRT: calreticulina	NB/ NN-DNJ: <i>N-butyl-y N-nonil- deoxinojirimicina</i>
DiFMUS: 6,8-difluoro-4-metilumbeliferil sulfato	NMD: <i>nonsense-mediated RNA decay</i>
dNTPs: desoxinucleótidos trifosfato	nt: nucleótido
DMD: distrofia muscular de Duchenne	p.?: efecto desconocido a nivel de proteína
DMS: deficiencia múltiple de sulfatasas	pNCS: sulfato de <i>p</i> -nitrocatecol
DMSO: dimetilsulfóxido	PNK: polinucleótido quinasa
DS: dermatán sulfato	pNPS: sulfato de <i>p</i> -nitrofenol
EDEM: <i>ER degradation-enhancing <math>\alpha</math>-mannosidasa-like protein</i>	PTC: <i>premature termination codon</i>
EGF: <i>epidermal growth factor</i>	QS: queratán sulfato
EJC: <i>exon junction complex</i>	RE: retículo endoplasmático
ERAD: <i>ER-associated protein degradation</i>	RM6P: receptor de manosa-6-fosfato
ERGIC: <i>ER-Golgi intermediate compartment</i>	r.0: no se puede detectar RNA
ERp57: <i>ER protein 57</i>	r.=: no hay cambios a nivel de RNA
FGH: hidrato de formilglicina	r.spl: efecto a nivel de <i>RNA splicing</i>
FGly: formilglicina	s: segundos
FGS: sulfato de formilglicina	SINE: <i>short interspersed element</i>
FAM: frecuencia del alelo minoritario	siRNA: <i>small interference RNA</i>
GAG: glicosaminoglicano	SNC: sistema nervioso central
GAPDH: gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa	SNP: <i>single nucleotide polymorphism</i>
Glc: glucosa	SUMF: <i>sulfatase modifying enzyme</i>
GlcNAc: <i>N-acetilglucosamina</i>	TRE: terapia de restitución enzimática
HGVS: <i>Human Genome Variation Society</i>	VIP36: <i>vesicular integral protein 36</i>
HPLC: <i>high performance liquid chromatography</i>	VIPL: <i>VIP36-like protein</i>
	U: unidad (de enzima)
	UDP: uridina-difosfato
	UV: ultravioleta
	WT: <i>wild-type</i>



# *Presentación*



## PRESENTACIÓN

El síndrome de Maroteaux-Lamy o mucopolisacaridosis de tipo VI (MPS VI) es una grave enfermedad hereditaria muy poco frecuente en humanos, provocada por la deficiencia de un único gen, que codifica la hidrolasa lisosómica N-acetilgalactosamino-4-sulfatasa o arilsulfatasa B.

Esta tesis es una contribución al conocimiento del síndrome de Maroteaux-Lamy en el terreno de la genética molecular. Constituye el primer trabajo de análisis mutacional y caracterización bioquímica de las mutaciones responsables de la enfermedad en pacientes españoles y argentinos con MPS VI. Además aborda una forma alternativa de terapia por supresión de codones prematuros de terminación en el gen *ARSB* mediante el tratamiento con antibióticos aminoglicósidos.

El cribaje mutacional es un paso indispensable para estudiar la patología molecular de una enfermedad hereditaria monogénica. No sólo supone poder ofrecer al paciente un diagnóstico molecular, sino que es necesario para poder establecer las correlaciones entre el genotipo y el fenotipo que potencialmente permitirían predecir la severidad

clínica y la probabilidad de éxito de la terapia para cada paciente. Además, abre las puertas al análisis funcional de las nuevas mutaciones identificadas y a estudios poblacionales (frecuencias alélicas en la población, origen de las mutaciones más frecuentes, etc.)

El estudio a nivel molecular de las causas de la MPS VI se inició hace algo más de una década y ya ha quedado relegado a un segundo plano por las investigaciones dirigidas a la terapia génica y de restitución enzimática. Además, pese a que las enfermedades monogénicas afectan globalmente a millones de personas en todo el mundo, su estudio se está convirtiendo en un empeño marginal comparado con el de las enfermedades complejas, a las cuales van destinadas actualmente la mayor parte de los esfuerzos.

Sin embargo, los estudios en el terreno de la genética molecular de las enfermedades monogénicas mejora el diagnóstico, la caracterización y la apreciación epidemiológica de estos trastornos, en cuyo conocimiento persisten aún numerosas lagunas. La colección de datos epidemiológicos, bioquímicos y moleculares es importante y debe continuar.



# *Introducción*



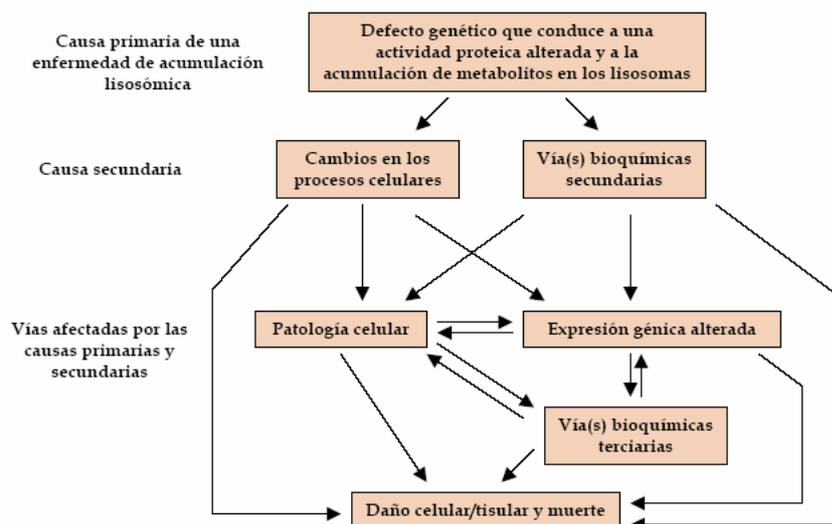
## I. CLÍNICA

### 1. Las enfermedades de acumulación lisosómica

Las enfermedades de acumulación lisosómica (en inglés *lysosomal storage diseases*, LSD) constituyen un conjunto extenso de enfermedades congénitas raras que se empezaron a caracterizar clínicamente a finales del siglo XIX y que están causadas por la deficiencia de alguna de las proteínas del sistema lisosómico de degradación (por ejemplo, hidrolasas, transportadores de membrana o activadores enzimáticos). La progresiva acumulación de macromoléculas sin digerir en el interior de los lisosomas da lugar a una disfunción celular (Figura 1-1). A nivel clínico los pacientes presentan deformaciones esqueléticas y daños en el cerebro, hígado, pulmones y otros órganos internos. Pese a que su rango de severidad es variable, todas se consideran enfermedades graves y suponen normalmente una reducción importante en la esperanza de vida de los pacientes.

Hasta la fecha se han descrito más de 40 enfermedades de acumulación lisosómica, que se suelen clasificar en función del sustrato acumulado. Las principales se resumen en la Tabla 1-1 (*página siguiente*). Actualmente se incluyen bajo este nombre las enfermedades provocadas por deficiencias de las enzimas lisosómicas, proteínas lisosómicas no catalíticas y otras anomalías de la función lisosómica. Todas ellas se consideran enfermedades monogénicas y la mayoría presentan una herencia autosómica recesiva.

Aunque las LSD constituyen uno de los grupos de enfermedades genéticas más prevalentes en humanos, son desórdenes raros con una incidencia individual muy baja. La incidencia conjunta puede ser de 1 caso cada 4000 a 12500 nacimientos vivos, según la población (Coelho *et al.*, 1997; Poorthuis *et al.*, 1999; Applegarth *et al.*, 2000; Dionisi-Vici *et al.*, 2002; Poupětová 2003; Pinto *et al.*, 2004; Hopwood, 2006). En España se han diagnosticado alrededor de 1000 pacientes con alguna LSD desde 1973 (Chabás y Coll, 2006).



**Figura 1-1.** Posible esquema de la patología de las enfermedades de acumulación lisosómica. La causa primaria de la enfermedad es la acumulación intralisosómica de sustratos sin metabolizar, pero el amplio rango y variedad de síntomas indica que debe haber vías bioquímicas y celulares secundarias activadas que provoquen la patología celular, la alteración de la expresión génica y la activación de las vías bioquímicas terciarias. (Adaptado de Futerman y van Meer, 2004).

**Tabla 1-1. Principales enfermedades de acumulación lisosómica**

Enfermedad	Proteína defectiva	Principales materiales almacenados
<b>Esfingolipidosis</b>		
Fabry	$\alpha$ -Galactosidasa A	Globotriaosilceramida
Lipogranulomatosis de Farber	Ceramidasa	Ceramida
Gaucher	$\beta$ -Glucosidasa Activador Saposina-C	Glucosilceramida Glucosilceramida
Niemann-Pick A y B	Esfingomielinasa	Esfingomielina
Deficiencia de activador de esfingolípidos	Activador de esfingolípidos	Glicolípidos
Gangliosidosis GM1	$\beta$ -Galactosidasa	Gangliósido GM1
Gangliosidosis GM2 (Tay-Sachs)	$\beta$ -Hexosaminidasa A	Gangliósido GM2 y glicolípidos relacionados
Gangliosidosis GM2 (Sandhoff)	$\beta$ -Hexosaminidasa A y B	Gangliósido GM2 y glicolípidos relacionados
Gangliosidosis GM2 (deficiencia de activador de GM2)	Proteína activadora de GM2	Gangliósido GM2 y glicolípidos relacionados
<b>Mucopolisacaridosis (MPS)</b>		
MPS I (Hurler, Scheie, Hurler/Scheie)	$\alpha$ -Iduronidasa	Dermatán sulfato y heparán sulfato
MPS II (Hunter)	Iduronato-2-sulfatasa	Dermatán sulfato y heparán sulfato
MPS IIIA (Sanfilippo A)	Heparán N-sulfatasa (sulfamidasa)	Heparán sulfato
MPS IIIB (Sanfilippo B)	N-Acetil- $\alpha$ -glucosaminidasa	Heparán sulfato
MPS IIIC (Sanfilippo C)	Acetil-CoA: $\alpha$ -glucosamida N-acetiltransferasa	Heparán sulfato
MPS IIID (Sanfilippo D)	N-Acetilglucosamina-6-sulfatasa	Heparán sulfato
MPS IV (MorquioA)	N-Acetilgalactosamina	Queratán sulfato, condroitín sulfato
MPS IV (Morquio B)	$\beta$ -Galactosidasa	Queratán sulfato
MPS VI (Maroteaux-Lamy)	N-Acetilgalactosamina-4-sulfatasa (arilsulfatasa B)	Dermatán sulfato
MPS VII (Sly)	$\beta$ -Glucuronidasa	Heparán sulfato, dermatán sulfato, condroitín sulfatos
<b>Oligosacaridosis y glicoproteínosis</b>		
Pompe (enfermedad acumulativa de glicógeno tipo II)	$\alpha$ -Glucosidasa	Glicógeno
<b>Enfermedades causadas por defectos en proteínas integrales de membrana</b>		
Cistinosis	Cistinosina	Cistina
Enfermedad de Danon	LAMP2	Restos citoplasmáticos y glicógeno
Enfermedad acumulativa infantil de ácido siálico y enfermedad de Salla	Sialina	Ácido siálico
Mucopolipidosis (ML) IV	Mucolipina-1	Lípidos y mucopolisacáridos ácidos
Niemann-Pick C (NPC)	NPC1 y 2	Colesterol y esfingolípidos
<b>Otras</b>		
Galactosialidosis	Catepsina A	Sialiloligosacáridos
Enfermedad de células de inclusión y polidistrofia pseudo-Hurler (ML II y ML III, respectivamente)*	N-acetilglucosaminil-fosfotransferasa	Oligosacáridos, mucopolisacáridos y lípidos
Deficiencia múltiple de sulfatasas	Enzima generadora de $\alpha$ -formilglicina	Sulfátidos
Lipofuscinosis ceroide neuronal (NCL1) (enfermedad de Batten)	CLN1 (proteína palmitoiltioesterasa-1)	Tioésteres lipidados
NCL2 (enfermedad de Batten)	CLN2 (tripeptidil amino peptidasa-1)	Subunidad c de la ATP sintasa mitocondrial
NCL3 (enfermedad de Batten)	Transportador de arginina	Subunidad c de la ATP sintasa mitocondrial

\*ML II y ML III fueron clasificadas inicialmente como mucopolipidosis, pero ahora se sabe que provocan una deficiencia en el transporte de enzimas lisosómicas en las células de origen mesenquimático, más que un defecto en las lipasas lisosómicas. (Adaptado de Futerman y van Meer, 2004).

## 2. Las mucopolisacaridosis

Las mucopolisacaridosis (MPS) constituyen un subgrupo dentro de las enfermedades de acumulación lisosómica en el cual la enzima deficiente es alguna de las hidrolasas lisosómicas encargadas del metabolismo de degradación de los mucopolisacáridos o glicosaminoglicanos (GAG), que son componentes básicos de la matriz extracelular. La acumulación de estas moléculas causa un daño progresivo en los tejidos.

La mayoría de MPS comparten ciertas manifestaciones clínicas (afectación del sistema nervioso, organomegalia y alteraciones del esqueleto, fundamentalmente), pero difieren mucho en el grado y severidad de los síntomas.

La incidencia global de todas las mucopolisacaridosis se estima cercana a 1 caso por cada 21000-51700 nacimientos, en función de la población (Nelson *et al.*, 1997 y 2003 en Irlanda del Norte; Poorthuis *et al.*, 1999 en Holanda; Meikle *et al.*, 1999 en Australia; Applegarth *et al.*, 2000 en Columbia Británica; Poupětová 2003 en Chequia y Eslovaquia; Pinto *et al.*, 2004 en Portugal; Baehner *et al.*, 2005 en Alemania). En España casi el 33% del total de enfermedades de acumulación lisosómica diagnosticadas son MPS (Chabás y Coll, 2006).

### 3. La mucopolisacaridosis de tipo VI, o síndrome de Maroteaux-Lamy

En el síndrome de Maroteaux-Lamy, el mucopolisacárido que se acumula es el dermatán sulfato, como consecuencia de la deficiencia de una de las proteínas responsables de su hidrólisis, la *N*-acetilgalactosamina-4-sulfatasa o arilsulfatasa B (ARSB).

## Historia

La enfermedad fue descrita inicialmente por los médicos franceses Pierre Maroteaux y Maurice Emile Joseph Lamy en el año 1963, que fueron los primeros en relacionar un cuadro clínico de disostosis múltiple similar al de las otras MPS ya descritas con una excreción excesiva en orina de condroitín y dermatán sulfato. Se clasificó como mucopolisacaridosis de tipo VI o MPS VI (Maroteaux *et al.*, 1963).

El primer test enzimático para el diagnóstico directo de la MPS VI mediante la determinación diferencial de glicosaminoglicanos en orina estuvo disponible en 1969. Posteriormente a esta fecha se fueron desarrollando otros sistemas de detección.

A principios de los años 70 se determinó que la enzima deficiente en la enfermedad era la arilsulfatasa B (Baron y Neufeld, 1972; Stumpf *et al.*, 1973), contra la cual Gibson y colaboradores purificaron el primer anticuerpo monoclonal en el año 1987.

El primer modelo animal que se describió fue un gato siamés que presentaba de forma natural la MPS VI (Jezyk *et al.*, 1977). Posteriormente fueron describiéndose otros modelos animales en rata y ratón (Yoshida *et al.*, 1983; Evers *et al.*, 1996, *ver página 49*).

El gen de la ARSB humana fue localizado y caracterizado en el año 1990 por Peters y colaboradores, pero hasta varios años más tarde no se conoció con precisión su extensión y los límites entre los exones y los intrones (Modaressi *et al.*, 1993). A partir de esa fecha se fueron sucediendo los estudios de análisis mutacional en pacientes de MPS VI en diversas poblaciones (*ver página 44*).

En 1997 se publicó la estructura cristalográfica de la proteína (Bond *et al.*, 1997), siendo una de las cuatro sulfatasas cuya estructura tridimensional ha sido determinada hasta la fecha.

Paralelamente se fueron realizando las primeras aproximaciones a la terapia génica sobre fibroblastos de pacientes (Anson *et al.*, 1992) y a la terapia de restitución enzimática mediante la administración exógena de ARSB humana recombinante en modelos animales (Brooks *et al.*, 1997 y Yogalingam *et al.*, 1997). La empresa farmacéutica *BioMarin Pharmaceutical Inc.* ha podido completar recientemente la Fase III de estudios clínicos en humanos y en 2006 se aprobó la comercialización en la Unión Europea de la enzima Naglazyme™ (galsufasa) como terapia de restitución a largo plazo para la MPS VI.

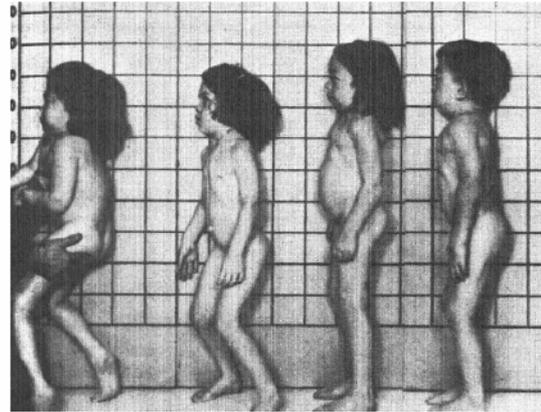
### Herencia

El síndrome de Maroteaux-Lamy presenta una herencia monogénica autosómica recesiva tanto en humanos como en los modelos animales identificados. No se atribuye ningún caso clínico a la presencia de mutaciones *de novo* en el gen de la arilsulfatasa B.

### Prevalencia

La incidencia estimada a nivel mundial para la MPS VI va de 1:125000 a 1:1300000 nacidos vivos según las poblaciones (Lowry *et al.*, 1990, en Columbia Británica; Nelson *et al.*, 1997 y 2003, en Irlanda del Norte; Meikle *et al.*, 1999, en Australia; Poorthuis *et al.*, 1999, en Holanda; Pinto *et al.*, 2004, en Portugal; Baehner *et al.*, 2005, en Alemania). En Portugal y Brasil la MPS VI parece ser relativamente frecuente, al igual que todas las LSD en general, con una prevalencia que duplica la de Australia y Holanda (Coelho *et al.*, 1997; Pinto *et al.*, 2004).

Se calcula que pueda haber unos 1100 individuos afectados en todo el mundo, de los cuales sólo un 10% han sido estudiados desde el punto de vista bioquímico y genético (Swiedler *et al.*, 2005). No existen datos de la incidencia de la MPS VI en España.



**Figura 1-2.** Niños afectados por la forma severa de MPS VI. (Extraído de Neufeld y Muenzer, 2001).



**Figura 1-3.** Toulouse-Lautrec, posible enfermo de MPS VI. Existe una controversia sobre si el pintor podría haber estado afectado de MPS VI (Maroteaux, 1995). Tuvo problemas esqueléticos y de crecimiento desde la pubertad. Su dolencia no correspondía a ninguna de las enfermedades conocidas en el siglo XIX.



**Figura 1-4. Variabilidad en la progresión de la MPS VI.** Los 4 individuos afectados de la fila de arriba (de entre 9 y 12 años de edad) ilustran el espectro de severidad de la enfermedad y la potencial sutileza de la severidad de la MPS VI en cuanto a señales y síntomas (de izquierda a derecha, de más rápido avance de la enfermedad a más lento). Un individuo con avance rápido de la enfermedad (fila del medio) muestra un desarrollo progresivo de macrocefalia, rasgos faciales gruesos, protusión abdominal y hernia umbilical (de izquierda derecha, imágenes del mismo paciente con 1, 5, 10 y 16 años de edad respectivamente). En cambio, un individuo con avance lento de la MPS VI (abajo) no presenta rasgos visuales obvios, pero hay una serie de síntomas que pueden hacer sospechar que se trata de MPS VI (de izquierda derecha, imágenes del paciente a los 7 meses, 3 años, 7 años y 11 años de edad, respectivamente; fotografías de la National MPS Society Inc., USA).

### Manifestaciones y tipos clínicos

La MPS VI provoca afectaciones somáticas serias, pero no suele producir alteraciones intelectuales. Sólo se ha descrito retraso mental en unos pocos casos, y no son atribuibles del todo a la MPS (Taylor *et al.*, 1978; Paterson *et al.*, 1982; Vestermark *et al.*, 1987).

Clásicamente se ha dividido la enfermedad en tres tipos básicos: la MPS VI de tipo B, que sería la subvariante leve o de avance lento, marcada por una infancia normal hasta los 6 años de edad y supervivencia hasta la edad adulta; el tipo intermedio, con fenotipo similar a la MPS III y *facies* similar a la de los pacientes de síndrome de Hurler; y el tipo severo o MPS VI de tipo A, con aparición alrededor de los dos años de edad, un desarrollo más rápido de la enfermedad y un patrón de efectos somáticos más amplio y acusado (Figura 1-4).

En un trabajo reciente, Petry y colaboradores (2005) clasificaron a los pacientes de MPS VI según los siguientes criterios:

*Forma leve:* edad de inicio de los síntomas superior a los 36 meses, estatura superior a los 140 cm y supervivencia más allá de los 20 años.

*Forma intermedia:* edad de inicio de los síntomas después de los 36 meses, estatura inferior a 140 cm en la última evaluación y supervivencia más allá de los 20 años.

*Forma intermedia a severa:* edad de inicio de los síntomas antes de los 36 meses de edad y estatura superior a 90 cm en la última evaluación.

*Forma severa:* pacientes que fallecieron antes de los 10 años de edad y los que miden menos de 90 cm a los 10 años.

A continuación se detallan las diversas manifestaciones clínicas de la MPS VI.

**Manifestaciones del sistema nervioso central:** inteligencia normal durante todo el curso de la enfermedad, compresión de la médula espinal debido a luxaciones o engrosamientos de la duramadre, mielopatía cervical con debilidad en las piernas, paraplegia y parálisis. Ocasionalmente aparece hidrocefalia, que comporta un incremento de la presión intracraneal.

**Manifestaciones musculares y esqueléticas:** retraso del crecimiento y enanismo (los adultos miden unos 110-140 cm de altura; Figura 1-5), medida de la cabeza en el momento del nacimiento superior a la media, tronco y cuello cortos, *facies* tosca característica (narices, mandíbulas y labios anchos, mejillas carnosas; Figura 1-6), ligera exoftalmia e hipertelorismo (separación excesiva de los ojos), anomalías en el desarrollo dental (Figura 1-7, *página siguiente*), esternón prominente y costillas anchas (*pectus carinatum*), cifosis lumbar, lordosis, disminución de la movilidad de las articulaciones (caderas, rodillas, codos), disostosis múltiple (Figura 1-8, *página siguiente*), necrosis en la epífisis del fémur, fragilidad ósea con elevado riesgo de fractura (sobre todo en las extremidades inferiores), displasia de caderas, problemas pélvicos severos (con hipoplasia del acetábulo y crestas ilíacas pequeñas), deformidad ovoidal de los cuerpos vertebrales, *genu valgum*, síndrome del túnel carpal (que cursa con dolores y pérdida de funcionalidad de las manos por la inflamación de los tendones que comprimen el nervio medio del brazo), y deformidades de las manos y los pies, que adquieren forma de garra como consecuencia de la contracción de los dedos (Figura 1-9, *página siguiente*).



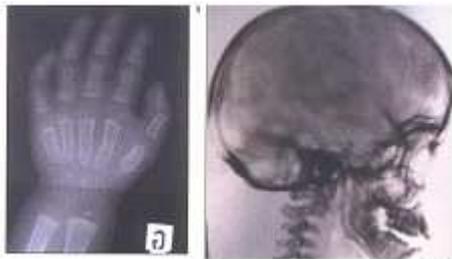
**Figura 1-5. Rasgos posturales típicos de la MPS VI.** La baja estatura y la posición con rodillas flexionadas, cuello corto y abdomen prominente son típicas de los pacientes con avance rápido de la enfermedad (izquierda). Los pacientes con avance lento (derecha) no presentan rasgos faciales tan marcados ni postura encorvada, especialmente en los primeros años. (Fotografías de la National MPS Society, Inc., USA).



**Figura 1-6. Rasgos faciales típicos de la MPS VI.** En los individuos con progresión rápida de la enfermedad (izquierda), se manifiesta una nariz ancha y puente nasal plano, labios y lengua grandes y cuello corto. En los individuos con progresión lenta de la enfermedad (derecha) quizá no se observen anomalías, pero hay ligeras diferencias con respecto a los otros miembros de la familia. (Fotografías de la National MPS Society, Inc., USA).



**Figura 1-7. Anormalidades orales típicas de la MPS VI.** Incluyen dientes pequeños, irregulares, muy separados, lengua y labios grandes y encías hiperplásicas, sobretodo en los pacientes con rápido avance de la enfermedad (izquierda), aunque también en menor grado en los pacientes con avance lento de la enfermedad (derecha; fotografías de la National MPS Society, Inc., USA).



**Figura 1-8: Disostosis múltiple en pacientes de MPS VI.** Placas irregulares en el metafisis, epífisis supernumerarias y metacarpos cortos y anchos en un paciente de 1 año de edad (izquierda). Macrocefalia y dolicocefalia en un paciente de 13 años (derecha; fotografías de la National MPS Society, Inc., USA).



**Figura 1-9: Mano en forma de garra en pacientes de MPS VI.** La deformación se caracteriza por dedos cortos y anchos, con flexión fija y escasa destreza. (Fotografías de la National MPS Society, Inc., USA).



**Figura 1-10. Manifestaciones oculares en pacientes de MPS VI.** Opacidad corneal severa en pacientes de MPS VI debido al acúmulo de glicosaminoglicanos. (Extraído de Ashworth et al., 2005 y de la National MPS Society, Inc., USA).

**Manifestaciones respiratorias:** apnea del sueño y enfermedad restrictiva del pulmón, debida a que la cifoescoliosis y la estenosis traqueal impiden los movimientos respiratorios del pecho.

**Manifestaciones cardiovasculares:** disfunciones aórticas debidas a calcificaciones estenóticas de la válvula, así como insuficiencia mitral.

**Manifestaciones gastrointestinales:** hernias inguinales y/o umbilicales, hepatoesplenomegalia.

**Manifestaciones oftalmológicas y auditivas:** pérdida de transparencia de la córnea (opacidad corneal, Figura 1-10), debilidad visual, pérdida de audición conductiva.

La MPS VI no compromete la fertilidad pero a las mujeres afectadas con la forma severa se les aconseja no quedarse embarazadas debido al riesgo para su salud.

## Prognosis

La detección temprana de la MPS VI (y de cualquier enfermedad de acumulación lisosómica) puede ser crítica para evitar que ocurran complicaciones irreversibles. Sin embargo, aunque algunos síntomas aparecen en los primeros años de vida del paciente, el diagnóstico se retrasa con frecuencia. Los síntomas iniciales pueden ser sutiles, sobre todo en pacientes con avance lento de la enfermedad. De media, sólo se sospecha la afectación por MPS VI hasta los 2,5 años después de la primera presentación de los síntomas. Durante este tiempo el paciente es analizado por múltiples especialistas. Para los individuos con avance lento de la enfermedad, el diagnóstico preciso puede ocurrir incluso más tarde, entrada la adolescencia.

La esperanza de vida de los enfermos con síndrome de Maroteaux-Lamy es de dos o tres décadas, aunque se conocen casos de pacientes para la variante intermedia de la enfermedad con mayor longevidad (más de 40 años; Pilz *et al.*, 1979). La muerte acostumbra a producirse por fallo cardíaco, aunque puede adelantarse como consecuencia de las complicaciones cardiorrespiratorias o neurológicas, según cuál sea la severidad.

### **Diagnóstico**

Los pacientes de MPS VI son detectados después de la aparición de los síntomas clínicos, lo cual ocurre generalmente antes de los dos años de edad para los pacientes con la forma clínica severa. El diagnóstico se confirma con la presencia de dermatán sulfato en orina y la demostración de la deficiencia de la actividad catalítica de la proteína ARSB, y posteriormente el análisis genético-molecular.

#### *Diagnóstico morfológico*

El retraso en el ritmo de crecimiento y los rasgos faciales toscos a menudo son la primera pista evidente de la enfermedad. A nivel radiológico se pueden poner de manifiesto síntomas como la disostosis múltiple y las anomalías en el cráneo, vértebras, cadera y huesos largos.

#### *Diagnóstico histológico*

La acumulación de GAG en los lisosomas de las células produce una excesiva vacuolización que puede detectarse histológicamente y/o ultraestructuralmente en diversos tipos celulares y tejidos, sobre todo en fibroblastos, células endoteliales y parenquimales, macrófagos y leucocitos. Las acumulaciones de GAG en el citoplasma de los

granulocitos son un rasgo típico que recibe el nombre de granulaciones de Adler.

En los modelos murino y felino (Yoshida *et al.*, 1993; Evers *et al.*, 1996; Yogalingam *et al.*, 1998) se han encontrado pruebas histológicas de acumulación de GAG en hígado, corazón, pulmón, riñón, vasos sanguíneos, bazo, tráquea, esófago, estómago, intestino grueso y delgado, páncreas, glándulas salivares, testículos, piel, glándula adrenal y nódulos linfáticos. Estudios preclínicos en gatos han documentado que la acumulación se concentra principalmente en los macrófagos de hígado y bazo (Yogalingam *et al.*, 1999).

#### *Diagnóstico enzimático*

El diagnóstico enzimático de la MPS VI se realiza mediante la valoración de la actividad enzimática ARSB en leucocitos y fibroblastos de piel cultivados.

El valor de la actividad ARSB normal varía según los tejidos. En fibroblastos es de  $326 \pm 136$  nmol/h·mg aproximadamente.

Los sistemas más usados para medir la actividad de la arilsulfatasa B son el método fluorométrico que utiliza como sustrato la molécula fluorogénica 4-metilumbeliferil sulfato (4-MUS, Gibson *et al.*, 1987), y el espectrofotométrico, que utiliza como sustrato el *p*-nitrocatecol sulfato (modificación del método de Baum *et al.*, 1959).

Las arilsulfatasas en general actúan óptimamente a unos valores de pH inferiores al  $pK_a$  (7,8) del producto de la reacción del 4-MUS, la 4-metilumbeliferona (4-MU). En el caso de la ARSB, el pH óptimo está entre 5 y 6.

Recientemente se ha probado el 6,8-difluoro-4-metilumbeliferil sulfato (DiFMUS) como nuevo sustrato de las arilsulfatasas, que permite el ensayo enzimático continuo de las arilsulfatasas A, B y C placentarias humanas (Ahmed *et al.*, 2005). El problema del sustrato fluorogénico es que puede ser potencialmente catabolizado por otras arilsulfatasas.

Para medir la concentración enzimática existen otros métodos, como la HPLC (Leznicki y Bialkowski, 1997) y la detección mediante anticuerpos específicos contra la ARSB en gotas de sangre fresca o seca (Hein *et al.*, 2005), con capacidad de discriminar entre controles sanos, heterocigotos y afectados.

También se puede analizar la concentración de dermatán sulfato excretado en muestras de orina de 24 horas, y discriminarlo de los otros GAG en geles de gradiente (Byers *et al.*, 98). Dichos sistemas pueden servir además para monitorizar los niveles terapéuticos de enzima en muestras de pacientes de MPS VI que estén recibiendo terapia de restitución enzimática. Hasta ahora, el único biomarcador para monitorizar la eficacia del tratamiento eran los niveles de GAG en sangre y orina, pero se están investigando nuevos biomarcadores para profundizar en la patofisiología de la enfermedad (Fuller, 2006).

Los valores altos de GAG en orina se han correlacionado con una menor

estatura y menor peso corporal de los pacientes, así como con parámetros clínicos que indican una progresión de la enfermedad más rápida. En cambio, no es posible predecir la clínica en función de los niveles enzimáticos residuales, pues individuos a lo largo de todo el espectro fenotípico muestran similar actividad de la enzima endógena deficiente (Swiedler *et al.*, 2005).

#### *Diagnóstico genético*

El análisis mutacional se realiza a partir de DNA obtenido a partir de muestras de sangre u otros tejidos como siguiente paso a la sospecha del estado de portador o afecto en base al análisis enzimático. El elevado número de alelos privados y la ausencia de mutaciones altamente prevalentes dificulta el cribado poblacional. El análisis mutacional se suele realizar mediante secuenciación directa de la región codificante del gen.

#### *Diagnóstico antenatal*

En las familias con riesgo elevado de MPS VI se puede realizar el diagnóstico antenatal. En esos casos se mide la actividad enzimática ARSB en cultivos de vellosidades coriónicas o en amniocitos de forma análoga a como se realiza en leucocitos o fibroblastos.

## II. BIOLOGÍA CELULAR

### LOS LISOSOMAS

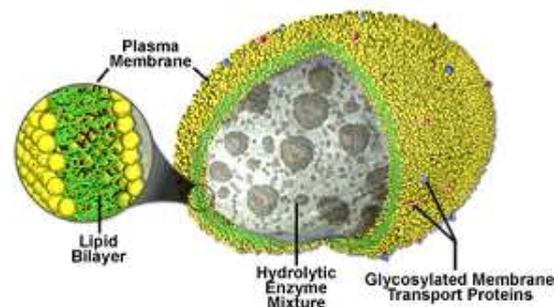
#### 1. Definición

Los lisosomas son una familia heterogénea de vesículas membranosas con la característica común de que contienen un elevado número de enzimas hidrolíticas. Se trata de orgánulos especializados en la digestión intracelular de macromoléculas. Se encuentran en casi todas las células eucariotas y presentan una gran diversidad en cuanto a forma y tamaño (oscilan entre 0,05 y 0,5  $\mu\text{m}$  de diámetro). Están rodeados por una única membrana, que contiene proteínas de transporte que permiten el paso de los productos finales de la digestión de macromoléculas hacia el citosol (Figura 2-1). Una bomba de protones se encarga de utilizar la energía de hidrólisis del ATP para bombear  $\text{H}^+$  y mantener el lumen a pH ácido (próximo a 5), que es el que requiere la dotación enzimática de los lisosomas para funcionar a su máxima actividad (estas enzimas no actúan al pH del citosol, 7,2).

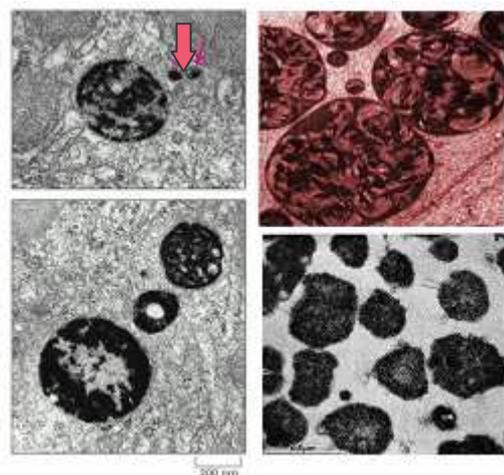
Los lisosomas llevan a cabo funciones muy diversas, como la digestión controlada de macromoléculas de deshecho intra y extracelulares, la digestión de microorganismos fagocitados, e incluso la nutrición celular y la regulación osmótica y homeostática. Las vacuolas de plantas y hongos son equivalentes a los lisosomas de las células animales, pues contienen gran variedad de enzimas hidrolíticas y algunas de sus funciones son similares.

Los lisosomas fueron descritos por de Duve y colaboradores en 1949 como «un nuevo grupo de partículas con propiedades líticas» que se obtuvieron a partir del fraccionamiento de extractos celulares. Más tarde pudieron verse claramente en el microscopio electrónico.

Pueden ser identificados mediante inmunotinción con anticuerpos específicos y técnicas histoquímicas, usando el precipitado producido por la acción de una hidrolasa ácida sobre su sustrato que indica qué orgánulos contienen dicha hidrolasa (Figura 2-2).



**Figura 2-1.** Anatomía externa del lisosoma. La membrana única protege al resto de la célula de las enzimas digestivas que contiene. El orgánulo evita la auto-digestión mediante glicosilación de las proteínas de la membrana interna. (Extraído de [micro.magnet.fsu.edu/cells/lysosomes/lysosomes.html](http://micro.magnet.fsu.edu/cells/lysosomes/lysosomes.html)).



**Figura 2-2.** Visualización histoquímica de los lisosomas. Izquierda: Micrografías electrónicas que muestran dos secciones de la célula teñidas para revelar la localización de la fosfatasa ácida, una enzima marcadora de lisosomas. La flecha señala dos pequeñas vesículas que supuestamente transportan hidrolasas ácidas desde el complejo de Golgi. Arriba derecha: fotografía de lisosomas purificados cargados de hierro. Abajo derecha: microfotografía electrónica de lisosomas. (Adaptado de Alberts et al., 2002 y Dean, 1979).

## 2. Formación y degradación en los lisosomas

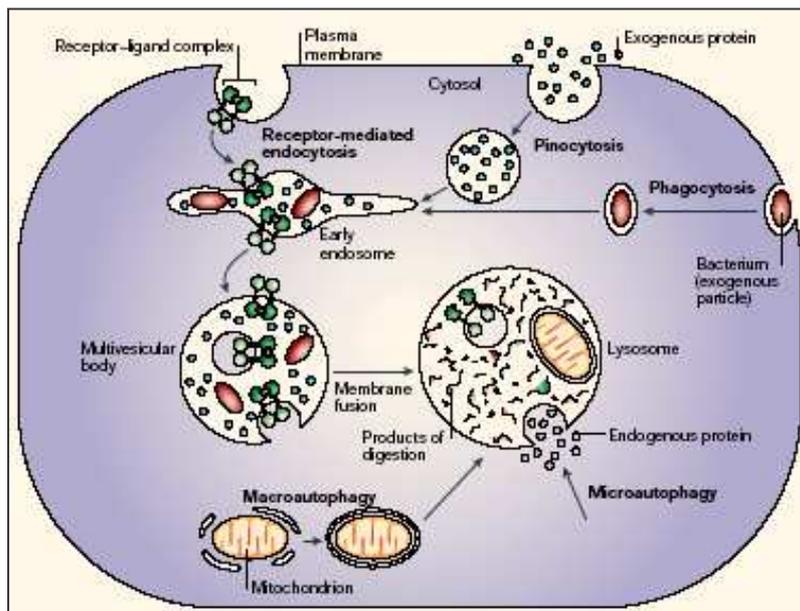
En los lisosomas convergen diferentes vías de tráfico intracelular (Figura 2-3). En función del origen de los materiales a digerir distinguimos:

*Endocitosis:* las macromoléculas ingeridas del fluido extracelular son envueltas en vesículas (se habla de pinocitosis si la endocitosis no está mediada por receptor) y descargadas en orgánulos pequeños e irregulares (endosomas primarios). Desde aquí, algunas de las moléculas son recuperadas selectivamente y recicladas a la membrana plasmática, mientras que otras pasan a los endosomas secundarios o tardíos. Estos orgánulos ya contienen las primeras hidrolasas lisosómicas activas (el pH interior es próximo a 6), provenientes del complejo de Golgi. Cuando los endosomas secundarios maduran y baja aún más su pH interno, se habla ya de lisosomas. Las proteínas de membrana de los endosomas son recuperadas en vesículas de transporte y devueltas a los endosomas o a la red *trans*-Golgi.

*Autofagia:* el orgánulo envejecido o las proteínas endógenas que se desea degradar son encerrados en membranas, creando un autofagosoma, que después se fusiona con el lisosoma o el endosoma secundario. Se trata de un proceso regulado y que requiere de un marcaje previo de los componentes celulares que se quieren remodelar para su posterior destrucción por el lisosoma.

*Fagocitosis:* se produce en los fagocitos (como los macrófagos y neutrófilos en vertebrados), células especializadas en la degradación de grandes partículas y microorganismos, que son englobadas formando fagosomas. Después se fusionan con el lisosoma de forma análoga a los autofagosomas.

Existe una vía alternativa, la secreción lisosómica o defecación, por la cual los lisosomas se fusionan con la membrana citoplasmática y eliminan los desechos imposibles de digerir. Para la mayoría de las células ésta es una vía minoritaria que se usa sólo cuando están estresadas, pero algunos tipos celulares (los melanocitos de la piel, por ejemplo) tienen lisosomas especializados con la maquinaria necesaria para esta fusión.



**Figura 2-3.** Vías de degradación en los lisosomas. Mecanismos principales de degradación lisosómica: endocitosis (que puede ser mediada por receptor o no, en cuyo caso se denomina pinocitosis), autofagia (microfagia si se trata de proteínas intracelulares y macrofagia cuando se trata de orgánulos) y fagocitosis. Explicación en el texto. (Extraído de Ciechanover, 2005).

### 3. Las hidrolasas lisosómicas

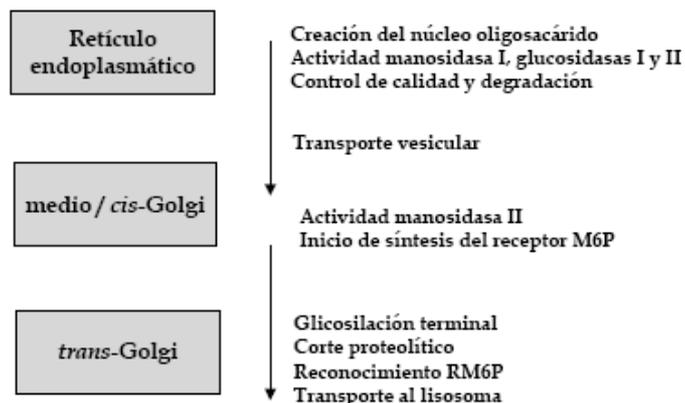
La dotación enzimática característica de los lisosomas incluye unos 60 tipos de enzimas hidrolíticas, las hidrolasas ácidas, entre las que figuran proteasas, ribonucleasas, glucosidasas, lipasas, fosfolipasas, fosfodiesterasas, fosfatasas, sulfatasas, sulfamidadas y otras, aparte de al menos 7 proteínas integrales de membrana. Todas ellas presentan actividad máxima a un pH aproximado de 5, y la mayoría son glicoproteínas cargadas negativamente. Los productos de degradación finales son transportados al citosol para que puedan ser excretados o reutilizados por la célula.

Las enzimas lisosómicas y sus sustratos pueden encontrarse en la superficie externa o interna de la membrana o en fase soluble en el lumen. Estas enzimas acaban siendo degradadas en el lisosoma por la acción de las propias enzimas lisosómicas proteolíticas.

### 4. Síntesis de las hidrolasas lisosómicas

Todas las enzimas lisosómicas, incluyendo la ARSB, al igual que más de la mitad de todas las proteínas que se sintetizan en una célula eucariota, son glicoproteínas. La ruta biosintética de las glicoproteínas es compleja y está extremadamente conservada entre los eucariotas. Es una tarea compartida por el RE y el complejo de Golgi. Junto con el citosol, el RE es responsable de la síntesis del polipéptido y del núcleo oligosacárido, de la formación del enlace covalente entre el glicano y el polipéptido, y del inicio de las modificaciones de los glicanos. Una vez las glicoproteínas se han plegado y oligomerizado correctamente, son transportadas hasta el complejo de Golgi, donde los enlaces *N*-glicanos son

sometidos a posteriores modificaciones. A menudo se añaden nuevos sacáridos para generar los glicanos complejos que se encuentran en las glicoproteínas maduras. Si las glicoproteínas no se plegan o ensamblan correctamente, son retenidas en el RE para su degradación. Estos procesos se esquematizan en la Figura 2-4 y se explican en detalle más adelante.



**Figura 2-4.** Representación esquemática del transporte proteico y los pasos de procesamiento de las glicoproteínas lisosómicas a través del RE y el complejo de Golgi. Explicación en el texto.

#### Función del núcleo oligosacárido

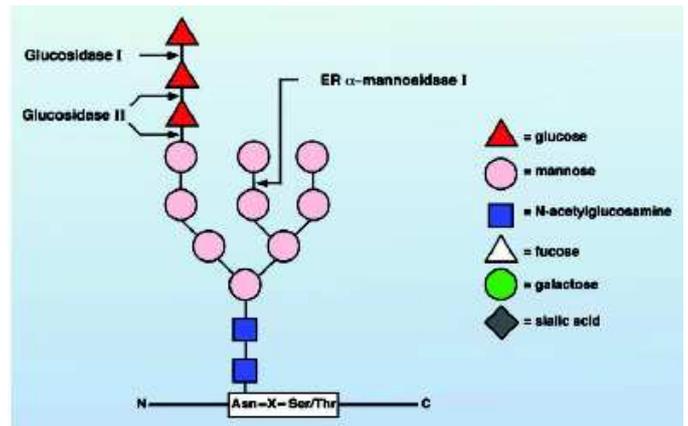
La adición de oligosacáridos (mediante enlaces *O*-glicano o *N*-glicano) a una cadena polipeptídica que por fuerza es lineal, creando moléculas híbridas (las glicoproteínas), es una manera versátil de producir y secretar proteínas más complejas y específicas con mayor eficiencia, sumando funcionalidades y especificidades nuevas mediante la generación de múltiples combinaciones de estructuras ramificadas sin alterar la secuencia aminoacídica. La creación o eliminación de sitios de glicosilación mediante mutaciones puntuales supone una fuente de versatilidad genética para la síntesis de proteínas a lo largo de la evolución.

Casi un 90% de las glicoproteínas eucariotas contienen enlaces *N*-glicano, cuyas funciones son muy diversas: estabilizan las proteínas a fin de evitar su desnaturalización y proteólisis, incrementan su solubilidad, regulan la tasa de recambio proteico, afinan la carga y el punto isoeléctrico, facilitan la orientación de las proteínas con respecto a una membrana, confieren rigidez estructural a las proteínas, modulan las respuestas inmunes y median en las interacciones con patógenos. Pero, ante todo, sirven como ligandos en multitud de procesos de reconocimiento y aportan información sobre el estado de plegamiento de la molécula, el tiempo empleado durante su síntesis en el RE y su orgánulo de destino.

### Estructura y síntesis del núcleo *N*-oligosacárido

Los glicanos que se añaden en el RE a los polipéptidos nacientes consisten en un núcleo homogéneo y relativamente simple (Figura 2-5) que posteriormente es modificado mientras la glicoproteína está en el RE. Estas modificaciones introducen una diversidad adicional limitada, dado que son compartidas por todas las glicoproteínas. El mayor grado de diversificación estructural se alcanza cuando la glicoproteína llega al complejo de Golgi, dado que la serie de modificaciones que tienen lugar allí ya no son uniformes. En las glicoproteínas maduras, los grupos *N*-glicanos tienen una estructura muy diversa en cuanto a número, tamaño y composición de sus ramificaciones de azúcares, tanto entre los glicanos de una misma proteína, como entre glicoproteínas diferentes, y también entre tipos distintos de células, tejidos y especies.

La esquematización del proceso de síntesis del núcleo *N*-oligosacárido tal y como tiene lugar en células de mamífero está representada en la Figura 2-6 (página siguiente).

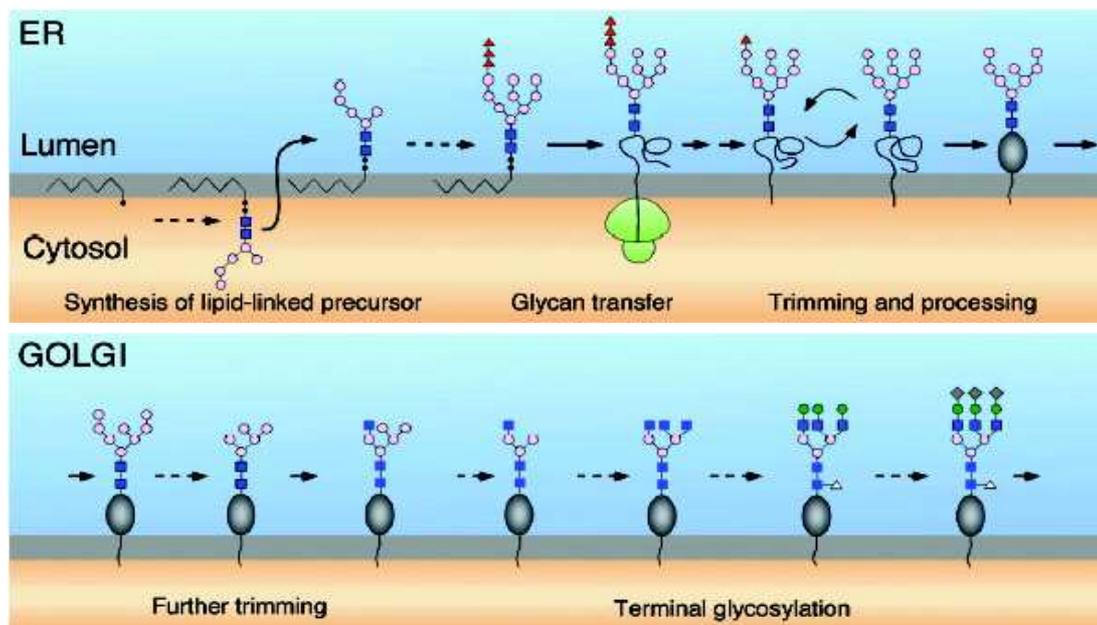


**Figura 2-5.** Estructura del núcleo *N*-oligosacárido. Los glicanos se unen a los polipéptidos en el RE mediante un enlace *N*-glicosídico con la cadena lateral de la asparagina de la secuencia consenso Asn-X-Ser/Thr de las proteínas que se tienen que glicosilar. La glucosa terminal y las manosas son eliminada por glucosidasas y manosidasas. Los símbolos para los diferentes azúcares se mantienen en la figura siguiente. (Adaptado de Helenius y Aebi, 2001).

### Efecto de los *N*-glicanos sobre el plegamiento de las proteínas

En los eucariotas, los *N*-glicanos pueden tener un efecto directo sobre el proceso de plegamiento, manteniendo a las proteínas en solución y mimetizando el papel de algunas chaperonas moleculares. Por ello la adición del enlace *N*-glicano ocurre antes de que el proceso de plegamiento haya empezado. Cuando la glicosilación está inhibida, el principal efecto que se observa es la generación de proteínas mal plegadas y agregadas que no pueden alcanzar un estado funcional. Aunque un enlace *N*-glicano no determina la estructura secundaria permanente de una proteína, altera las preferencias conformacionales próximas al lugar de glicosilación, dando lugar a conformaciones más compactas.

La presencia de un sacárido polar grande también puede afectar de forma local al proceso de plegamiento, orientando ese segmento del polipéptido hacia la superficie de la proteína.



**Figura 2-6. Biosíntesis del enlace N-oligosacárido.** La síntesis se inicia en la membrana citosólica del RE con la adición de los 14 azúcares a un precursor dolicolfosfato gracias a unas enzimas de membrana. Tras añadir dos N-acetilglucosaminas y 5 manosas, el oligosacárido se transloca a la cara luminal y se añaden 7 azúcares más. Cuando se transfieren las tres últimas glucosas, una oligosacaryltransferasa transfiere el núcleo oligosacárido a los residuos asparragina del polipéptido naciente. Las 3 glucosas son eliminadas por las glucosidasa I y II, y las manosas terminales, por una o varias manosidasas. Existe una glucosiltransferasa que puede volver a glicosilar cadenas sin glucosa, formando un ciclo con la glucosidasa II. Cuando la glicoproteína ya conformada (óvalo gris) alcanza el complejo de Golgi, se eliminan dos residuos más de manosa y se añade un residuo GlcNAc, seguido de la hidrólisis de más manosas. Después se añaden nuevos azúcares, incluyendo GlcNAc, galactosa, ácido siálico y fucosa. Del núcleo glicano original quedan sólo 5 azúcares. Las formas de glicosilación terminal son variables y en la figura sólo se ha representado una. (Adaptado de Helenius y Aebi, 2001).

Normalmente los glicanos no son esenciales para mantener la estructura en conjunto una vez la glicoproteína se ha plegado, aunque la presencia de oligosacáridos puede tener una influencia pequeña en las propiedades del polipéptido (por ejemplo, aumentando la estabilidad). Algunos sitios individuales de glicosilación son más importantes que otros. Aunque los apéndices oligosacáridos pueden tener efectos locales en el plegamiento de la proteína, cuando se modifican múltiples sitios el plegamiento global puede verse comprometido, incluso aunque ninguno de los glicanos se necesite individualmente. Por lo tanto, los glicanos como norma general pueden ser eliminados de la glicoproteína sin producir grandes alteraciones en su conformación.

### El ciclo calnexina-calreticulina

El efecto indirecto más importante de los glicanos en el proceso de plegamiento es el de permitir que una glicoproteína pueda entrar en el ciclo calnexina-calreticulina, que se encuentra en el RE de casi todos los eucariotas y que parece ser esencial *in vivo*. La calnexina (CNX, unida a membrana) y la calreticulina (CRT, soluble) son dos lectinas (proteínas capaces de unirse a carbohidratos) homólogas del RE que se unen transitoriamente a casi todas las glicoproteínas recién sintetizadas e interactúan con los grupos glicano de las glicoproteínas sustrato después de que las glucosidasas I y II las hayan dejado monoglucosiladas (Helenius y Aebi, 2004). Después de terminar la cadena, la unión a las lectinas continúa y la proteína es expuesta al factor ERp57, una cochaperona que sirve de intermediaria

en la formación de enlaces disulfuro cuando las glicoproteínas contienen cisteínas. Si la glicoproteína no ha sido plegada del todo en este tiempo, el oligosacárido es reglucosilado por la UDPglucosa-glicoproteína glucosiltransferasa del RE, que actúa como sensor de plegamiento, y la proteína vuelve a asociarse a las lectinas. El ciclo se repite hasta que la proteína es degradada o doblada. Una vez correctamente doblada, la glicoproteína ya no puede ser reconocida por la glucosiltransferasa y escapa del ciclo CNX/CRT, pudiendo salir del RE.

El ciclo CNX/CRT promueve el plegamiento correcto, bloquea la oligomerización prematura, regula la degradación en el RE y proporciona un control de calidad que impide que las glicoproteínas plegadas de forma incompleta salgan al complejo de Golgi. En algunos casos el control de calidad se rompe y salen del RE proteínas mal plegadas. En otros casos las glicoproteínas se asocian a BiP, una chaperona del RE que coopera y compete con los sustratos del ciclo de la calnexina. Este parece ser el caso de la ARSB (Bradford *et al.*, 1999). No obstante, en dicho trabajo BiP pareció interactuar de forma similar con la ARSB salvaje y la mutada (p. C91T) y no hubo evidencias de la intervención de BiP en la degradación de la ARSB mutada. El papel de BiP sería proteger las secuencias hidrofóbicas y las superficies de la agregación antes de su ocultamiento dentro de la molécula plegada.

#### **Control de calidad en RE: Degradación asociada a RE (ERAD)**

La degradación asociada a RE (ERAD) ocurre cuando la glicoproteína mal plegada ha estado un tiempo en el lumen del RE, es reconocida como inmadura y se lleva a cabo su translocación al citoplasma

a fin de ser degradada por el proteosoma mediante la vía de las ubiquitinas.

El reconocimiento de los sustratos para ERAD depende de la manosidasa I del RE y de la proteína conocida como EDEM (*ER degradation enhancing  $\alpha$ -mannosidase-like protein*). La manosidasa I elimina uno o más residuos de manosa del núcleo N-glicano; esto hace menos eficiente el ciclo de desglucosilación y reglucosilación de la UDPglucosa-glicoproteína glucosiltransferasa y libera a la glicoproteína del ciclo CNX/CRT. Además, el bajo número de manosas en el núcleo N-glicano de proteínas mal plegadas determina la asociación con EDEM.

Dado que la manosidasa I es relativamente lenta actuando, se ha propuesto que esto determina que exista un periodo de tiempo máximo para que toda glicoproteína madure en el RE. En células de mamífero, si en un margen de 30–90 minutos no se ha producido el procesamiento correcto, se inicia la degradación de la glicoproteína de forma exponencial (Helenius y Aebi, 2004).

Que se generen productos mal plegados es algo común en la célula incluso aunque no exista estrés celular, por lo que el ERAD juega un papel clave, aunque su mecanismo de actuación no es del todo conocido aún. Dado que las proteínas solubles del lumen del RE debieran tener unos requisitos de degradación diferentes a los de las proteínas transmembrana, se sospecha que el mecanismo de ERAD consta en realidad de varias rutas alternativas, aún no bien conocidas.

#### **Control de calidad en el complejo de Golgi**

A diferencia del RE, el complejo de Golgi no tiene un sistema riguroso para controlar la fidelidad de sus procesos biosintéticos. Por regla general, la

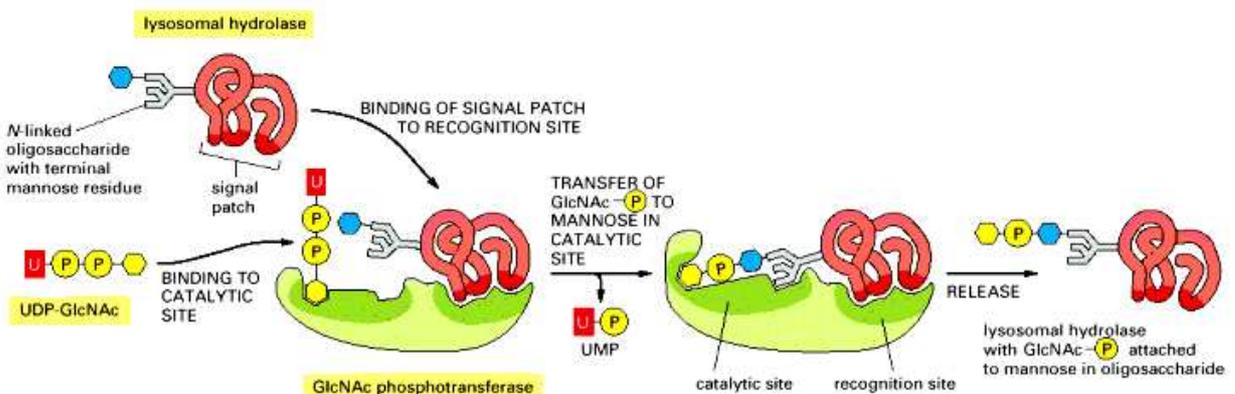
glicosilación defectuosa o deficiente es tolerada por el Golgi sin que medie retención ni degradación de proteínas. Pero el análisis de los productos secretados de células normales muestran que están modificados apropiadamente. Por lo tanto, aunque falten unos sistemas de degradación y de control de calidad como los del RE, el complejo de Golgi no exporta productos inacabados.

Esto puede explicarse por la arquitectura multicompartimentada del complejo de Golgi. Las moléculas sustrato son modificadas mientras se mueven desde el lado de entrada (*cis*) al lado de salida (*trans*). Las glicoproteínas deben recorrer el camino completo antes de poder ser exportadas, y la mayoría emplea para ello la misma cantidad de tiempo (normalmente de 5 a 15 minutos), expuestas al panel completo de enzimas modificadoras en el Golgi. El movimiento de *cis* a *trans* (ya sea por transporte vesicular, percolación, o progresión mediante cisternas) ya asegura un alto grado de finalización de los procesos biosintéticos sin tener que imponer un control de calidad directo, además de

posibilitar la producción de una amplia diversidad de estructuras.

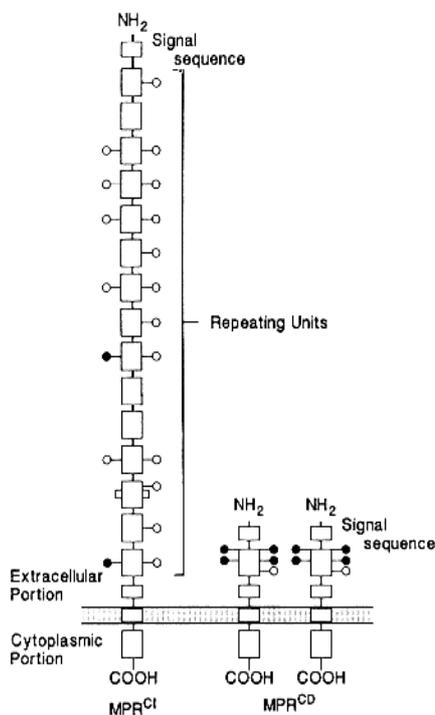
## 5. Transporte de las hidrolasas lisosómicas

El transporte selectivo de las hidrolasas lisosómicas desde la red *trans*-Golgi hasta los endosomas y lisosomas depende de dos enzimas que actúan secuencialmente. La primera es la glucosa *N*-acetil (GlcNAc) fosfotransferasa, una enzima compleja residente en la membrana del *cis*-Golgi que reconoce específicamente todas las enzimas lisosómicas de entre todo el cargamento proveniente del RE en función de una secuencia de aminoácidos concreta de la superficie de la proteína y añade un grupo GlcNAc-fosfato a una o dos manosas terminales o subterminales de las hidrolasas lisosómicas. Después se elimina el residuo GlcNAc por una fosfoglicosidasa que actúa secuencialmente, y el grupo manosa-6-fosfato (M6P) resultante es reconocido por los receptores de manosa-6-fosfato (RM6P) en la red *trans*-Golgi (Figura 2-7).



**Figura 2-7.** Reconocimiento de las hidrolasas lisosómicas y reacción del marcador manosa-6-fosfato. La enzima GlcNAc fosfotransferasa, que reconoce las hidrolasas lisosómicas en el complejo de Golgi, tiene un dominio catalítico y un dominio de reconocimiento. El dominio catalítico se une tanto a los *N*-oligosacáridos ricos en manosa como a UDP-GlcNAc. El dominio de reconocimiento se une a un motivo presente sólo en la superficie de las hidrolasas lisosómicas. El grupo GlcNAc es eliminado por una segunda enzima, dejando la M6P expuesta (este paso no se muestra; *adaptado de Alberts et al., 2002*).

Se han identificado dos receptores manosa-6-fosfato diferentes, que son glicoproteínas de tipo I integrales de membrana y homólogas que difieren en tamaño, estado de oligomerización y dependencia de pH en la unión al ligando (Figura 2-8), aunque en todo caso tendrían funciones complementarias (Pohlmann *et al.*, 1995; Yamashita *et al.*, 1999): el receptor IGF-II/CIMPR, de 275-300 kDa, que también reconoce el *insuline-like growth factor-II* (IGF-II) y es independiente de cationes, y el receptor M6P dependiente de cationes (CDMPR), dimérico y con 46 kDa de peso molecular. Ambos receptores muestran baja afinidad por los ligandos monovalentes (con un solo grupo M6P):  $K_d = 6-8 \times 10^{-6}$  M; en cambio en los casos de ligandos multivalentes y oligosacáridos portando muchos grupos M6P, la afinidad del receptor de 300 kDa es mayor ( $K_d = 2 \times 10^{-9}$  M frente a  $2 \times 10^{-7}$  M del receptor de 46 kDa; Hille-Rehfeld, 1995).



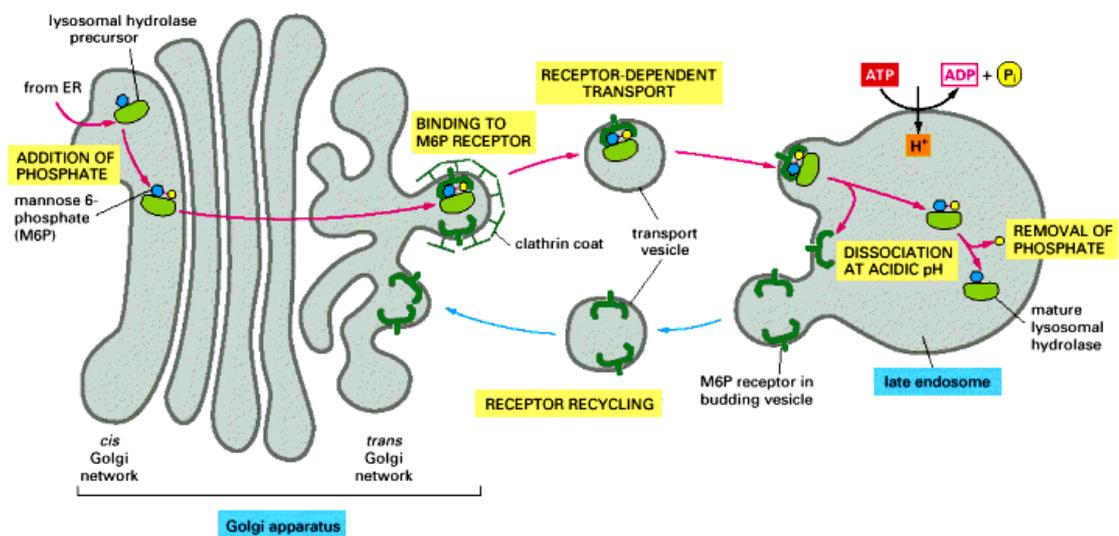
**Figura 2-8. Representación esquemática de los receptores manosa-6-fosfato (RM6P).** Los círculos negros representan los sitios de N-glicosilación conocidos y los círculos abiertos representan los sitios potenciales de glicosilación. (Adaptado de Kornfeld y Mellman, 1989).

Los dos receptores tienen una unión óptima a su ligando a pH 5,7 y se disocian rápidamente del ligando a pH menor de 5,1. La dependencia de pH de los receptores es crítica para el transporte. En la red *trans*-Golgi (pH 6,3 a 6,7) hay más afinidad por el ligando que en el compartimento donde se libera la carga, el endosoma secundario (pH 5-6). El IGF-II/CIMPR también une M6P a pH neutro y por lo tanto es capaz de endocitar enzimas lisosómicas desde la superficie de la célula, a diferencia del CDMPR.

La unión entre el receptor y la hidrolasa se produce en la cara luminal de la membrana, y el receptor se une a adaptinas en vesículas de transporte específicas revestidas de clatrina en la cara citosólica, que se fusionan posteriormente con los endosomas primarios. Cuantos más residuos M6P tengan las hidrolasas en sus oligosacáridos, más se incrementa la afinidad por el receptor. Una vez disociadas del receptor, las enzimas lisosómicas empiezan a digerir el material endocitado transferido desde los endosomas primarios. Después, los RM6P son reciclados y devueltos a la membrana del *trans*-Golgi también en vesículas de transporte para su reutilización. La posterior eliminación del fosfato de la manosa de las hidrolasas disminuye la probabilidad de que las hidrolasas vuelvan al complejo de Golgi unidas al receptor. Las hidrolasas lisosómicas que escapan del proceso de reconocimiento y empaquetamiento en la red del *trans*-Golgi son transportadas por la vía habitual a la superficie celular y secretadas al fluido extracelular. Algunos RM6P también van a la membrana plasmática para interceptar estas hidrolasas lisosómicas y devolverlas por endocitosis a los lisosomas vía endosomas primarios y secundarios (Figura 2-9, *página siguiente*). La abundancia y distribución del RM6P en diferentes tejidos y su exposición a la circulación son diferentes.

Aparte del RM6P, hay evidencias que apuntan a la existencia de alguna otra vía desconocida de direccionalización independiente de M6P de las hidrolasas a los lisosomas específica de algunos tipos celulares (en la MLII, por ejemplo, los lisosomas de algunos tipos celulares tienen un complemento de enzimas lisosómicas normal). Además, las proteínas de membrana del lisosoma se transportan desde el *trans*-Golgi a los endosomas secundarios de forma independiente al RM6P en todas las

células. Por lo tanto deben existir otros receptores específicos presentes en diferentes concentraciones según los diversos tipos celulares, y que podrían ser útiles como dianas de la enzima suministrada de forma exógena (Kornfeld y Mellman, 1989). Un ejemplo es el de la sortilina, que junto con el RM6P está implicada en el transporte de la esfingomielinasa ácida, cuyo déficit causa la enfermedad de Niemann-Pick de tipo A/B (Ni y Morales, 2006).



**Figura 2-9.** Transporte de las hidrolasas lisosómicas recién sintetizadas hacia el lisosoma. Los precursores de las hidrolasas lisosómicas son modificados covalentemente por la adición de grupos manosa-6-fosfato (M6P) en la red *cis* Golgi. Entonces se segregan de los demás tipos de proteínas en la red *trans* porque las adaptinas del recubrimiento de clatrina se unen a los receptores M6P, los cuales, a su vez, se unen a las hidrolasas lisosómicas modificadas. Las vesículas recubiertas de clatrina brotan de la red *trans* Golgi y se fusionan con los endosomas secundarios. Debido al bajo pH del endosoma secundario, las hidrolasas se disocian del receptor M6P, y los receptores vacíos son reciclados al complejo de Golgi para las siguientes rondas de transporte. No se conoce qué tipo de recubrimiento media en las vesículas de la vía de reciclamiento de los receptores M6P. En los endosomas secundarios, el fosfato es eliminado de los azúcares de manosa unidos a las hidrolasas, asegurándose de que las hidrolasas no vuelvan al complejo de Golgi con el receptor. (Adaptado de Alberts et al., 2002).

### III. BIOQUÍMICA

#### LA ENZIMA: N-ACETILGALACTOSAMINA 4-SULFATASA

##### 1. La familia de las sulfatasas

Las sulfatasas (EC. 3.1.5.6) catalizan la desulfonación hidrolítica de ésteres de sulfato (CO-S) y sulfamatos (CN-S). Constituyen una clase de enzimas altamente conservadas a nivel de secuencia, estructura y mecanismo catalítico tanto en eucariotas como en procariontes (Hanson *et al.*, 2004).

Los genes que las codifican son miembros de una familia con un ancestro común y están conservados a lo largo de la evolución. El gen ancestral ha padecido seguramente duplicaciones a lo largo de la evolución, y los genes resultantes presentan diferentes localizaciones cromosómicas.

Las similitudes más notables compartidas por las sulfatasas incluyen poseer un 20–60% de homología de secuencia de la proteína, una región N-terminal especialmente conservada que contiene los motivos consenso de las sulfatasas, y un residuo único en el sitio activo, una formilglicina (FGly) que se crea post-traduccionalmente y que es clave para llevar a cabo la actividad catalítica.

Todas las sulfatasas de vertebrados, invertebrados, eucariotas simples y procariontes tienen entre 500 y 600 aminoácidos. La región C-terminal de las sulfatasas es la que presenta mayor diversidad estructural y es candidata probable a ser la región que reconoce el sustrato.

La existencia de las sulfatasas se conoce desde hace casi 90 años. Al principio se creyó que sólo estaban implicadas en la degradación de los

sulfatos orgánicos, y a partir de los años 60 empezó a descubrirse su implicación en un gran número de enfermedades hereditarias humanas.

##### 2. Los sustratos y las funciones biológicas de las sulfatasas eucariotas

Muchas sulfatasas eucariotas se identificaron inicialmente basándose en su actividad enzimática respecto a sulfatos aromáticos pequeños, tales como el sulfato de *p*-nitrofenol (pNPS), el sulfato de *p*-nitrocatecol (pNCS), y el sulfato de 4-metilumbeliferona (4MUS). Esta actividad fue la causa de que durante largo tiempo se atribuyeran a las sulfatasas unos papeles fisiológicos equivocados, y se ha utilizado para clasificar de forma general las sulfatasas en arilsulfatasas y no arilsulfatasas. Cabe decir que ambas clases de enzimas son activas con arilsustratos, pero las arilsulfatasas tienen unas tasas de hidrólisis enzimática notablemente más altas.

En contraste con su inespecificidad para los arilsustratos, estas enzimas muestran una fuerte especificidad para sus sustratos biológicos. Entre los sustratos naturales de las sulfatasas humanas se cuentan los sulfatos de esteroides y una variedad de sulfonatos de carbohidratos, inclusive monosacáridos, oligosacáridos, proteoglicanos y glicolípidos.

##### 3. Las sulfatasas humanas

En total se conocen 19 sulfatasas humanas (Tabla 3-1, *página siguiente*). A causa de su papel en las enfermedades de acumulación lisosómica, varios genes de sulfatasas lisosómicas humanas y de otros mamíferos han sido caracterizados extensamente.

Las sulfatasas humanas se encuentran en varias ubicaciones subcelulares, donde juegan papeles clave en procesos biológicos importantes, incluyendo la síntesis de hormonas, la degradación de glicosaminoglicanos y glicolípidos en el lisosoma, y la modulación de señales entre la célula y la matriz extracelular. Algunas sulfatasas humanas se han identificado pero sus funciones biológicas son aún desconocidas.

Las sulfatasas lisosómicas fueron las primeras que se asociaron a una función fisiológica y son, con diferencia, las mejor caracterizadas. Debido a su localización subcelular, estas enzimas tienen un pH óptimo en la franja ácida (pH 5). Muestran una gran especificidad de

sustrato y escasa redundancia funcional entre ellas (Tabla 3-2, página siguiente).

Ocho de las diferentes sulfatasas humanas conocidas actúan en el lisosoma para desulfatar glicosaminoglicanos, glicolípidos y glicopéptidos. La *N*-acetilgalactosamina-4-sulfatasa (o ARSB), cuya deficiencia origina la MPS VI, actúa en el tercer paso de la vía de degradación del dermatán y el condroitín-4-sulfato (*ver* página 42).

En eucariotas superiores, las sulfatasas siguen la vía secretora y son glicosiladas para su transporte hacia la matriz extracelular o su ubicación subcelular (*ver* página 30). Las sulfatasas lisosómicas y extracelulares son solubles, mientras que las residentes del RE y el complejo de Golgi están asociadas a membrana.

**Tabla 3-1. Sustratos y localización subcelular de las sulfatasas humanas y trastornos hereditarios resultantes de la deficiencia de una única sulfatasa**

Sulfatasa	Abreviación	Sustrato fisiológico	Localización subcelular	Desorden genético asociado
Arilsulfatasa A (cerebrósido sulfatasa)	ARSA	sulfátidos	lisosoma	Leucodistrofia metacromática
Arilsulfatasa B ( <i>N</i> -acetilgalactosamina-4-sulfatasa)	ARSB	DS	lisosoma	Síndrome de Maroteaux-Lamy (MPS VI)
Arilsulfatasa C (esteroide sulfatasa)	ARSC	esteroides sulfatados	RE	Ictiosis ligada al X
Arilsulfatasa D	ARSD	desconocido	RE	
Arilsulfatasa E	ARSE	desconocido	Golgi	Condrodisplasia punctata
Arilsulfatasa F	ARSF	desconocido	RE	
Arilsulfatasa G	ARSG	desconocido	RE	
Galactosamino-6-sulfatasa	GalN6S	CS, QS	lisosoma	Síndrome de Morquio A (MPS IV A)
Glucosamino-3-sulfatasa*	GlcN3S	HS	lisosoma	
Glucosamino-6-sulfatasa	GlcN6S	HS	lisosoma	Síndrome de Sanfilippo D (MPS IIID)
Glucuronato-2-sulfatasa*	GlcA2S	HS	lisosoma	
Heparán- <i>N</i> -sulfatasa (sulfamidasa)	GlcNS	HS	lisosoma	Síndrome de Sanfilippo A (MPS IIIA)
Iduronato-2-sulfatasa	IdoA2S	HS, DS	lisosoma	Síndrome de Hunter (MPS II)
Endosulfatasa 1	SULF1	HS	MEC	
Endosulfatasa 2	SULF2	HS	MEC	

Además de las enfermedades que resultan de una deficiencia en una única sulfatasa, la deficiencia múltiple de sulfatasas (DMS) disminuye notablemente la actividad en todas las sulfatasas. DS= dermatán sulfato, CS= condroitín sulfato, HS= heparán sulfato, QS= queratán sulfato, RE=retículo endoplasmático, MEC=matriz extracelular. \* Genes que todavía no han sido clonados. Aparte de los genes humanos, se han clonado ortólogos de otros muchos vertebrados (ratón, rata, gato, cerdo, codorniz, cabra...). No se han incluido las recién descubiertas arilsulfatasas ARSH, ARSI, ARSJ y ARSK por no conocerse su sustrato fisiológico o su localización subcelular. (*Adaptado de Hanson et al., 2004*).

Tabla 3-2. Propiedades catalíticas de las arilsulfatasas humanas

Enzima	Sustrato	Tasa (nmol sustrato/ min· mg enzima)	Km ( $\mu$ m)	pH óptimo
ARSA	4MUS	40000	12500	5,7
	pNCS	160000	400	5,5
	Ácido ascórbico 2S	85000	2800	4,8
	Cerebrosidasa 3S*	6600	105	4,5
	Seminolípido 3S*	5000	180	4,5
	Psicosina 3S*	3000	200	4,5
ARSB	Tirosina S	6700	3500	5,5
	4MUS	48500	1180	5,6
	GalN4S-(CS/DS)*(a)	2000	60	5,6
ARSC	tirosina-S	871	<300000	5,5
	4MUS	7000	800	7,0
	pNCS	4000	400	7,0
	Estrona-S*	2900	0,8	7,0
	Pregnenolona-S*	1600	0,6	7,0
	Colesterol-S*	1400	2	7,0
	DHEA-S*	1000	1,7	7,0
	Testosterona-S	1	40	7,0
Vitamina D3 S	<1		7,0	
ARSD	4MUS	n.d.		7,0
ARSE	4MUS	663		7,0
ARSF	4MUS	1353		7,0
ARSG	4MUS	n.d.		7,0

\* : sustratos fisiológicos. (a) Actividad en el extremo no reductor del GAG. n.d.=actividad no detectable. No se han incluido la ARSH, ARSI, ARSJ y ARSK. (*Adaptado de Hanson et al., 2004*).

#### 4. Secuencias consenso de las sulfatasas

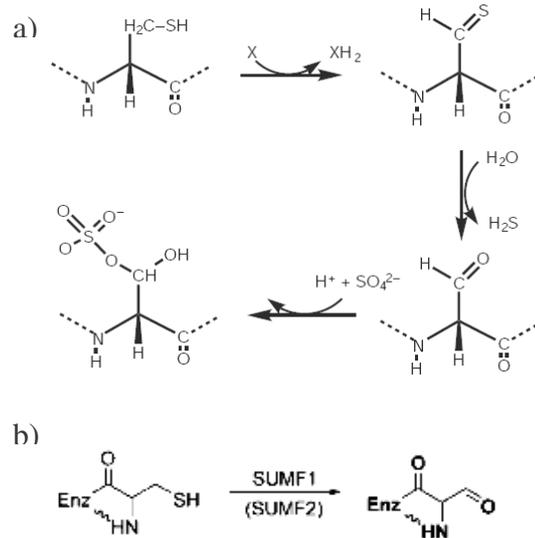
La información sobre el sitio activo de las sulfatasas se ha obtenido gracias a estudios cristalográficos y de mutagénesis (Hanson *et al.*, 2004). Todas las sulfatasas hidrolíticas conocidas tienen dos motivos de aminoácidos sumamente homólogos que se encuentran en el primer tercio de la secuencia N-terminal.

La primera de las secuencias comprende los aminoácidos C/S-X-P- S/X-R-X-X-X- L/X- T/X- G/X- R/X, y es crítica para dirigir la modificación post-traduccional en el RE del residuo inicial de cisteína o serina al residuo catalíticamente activo formilglicina o FGly (Brooks *et al.*, 1995; Schmidt *et al.*, 1995; Figura 3-1, página siguiente). El gen que codifica para la FGE (*formylglycine-generating enzyme*), se llama SUMF1 (*sulfatase-modifying factor 1*) y su ausencia provoca la deficiencia múltiple de sulfatasas. Dicha secuencia está sumamente conservada en organismos eucariotas y procariotas, como se muestra

en las alineaciones parciales de secuencias de las Figuras 3-2 y 3-3 (página siguiente). El motivo central C/S-X-P-X-R (que en la mayoría de arilsulfatasas es CTPSR) se conserva en toda la familia de enzimas. Aparte del residuo de cisteína, los residuos de arginina y prolina de esta secuencia parecen actuar también como elementos estructurales críticos que dirigen y estabilizan la modificación hacia FGly. En la ARSB, este motivo comprende los codones 91-95 de la proteína. La secuencia auxiliar LTGR podría ser importante para el reconocimiento molecular.

La segunda de las secuencias consenso entre las sulfatasas contiene los aminoácidos G-Y/V-X- S/T-X-X-X-G-K-X-X-H. Los residuos conservados de la lisina y la histidina forman parte del sitio activo y son importantes para la catálisis del éster de sulfato y el ensamblaje del lugar activo de la sulfatasa (Simonaro *et al.*, 1995). En la ARSB, este motivo es concretamente GYTTHMVGKWH y comprende los codones 137-147.

**Figura 3-1.** Esquema de la modificación post-transcripcional del residuo esencial de cisteína en el sitio activo de las sulfatasas. a) Pasos de la reacción, incluyendo la formación del éster de sulfato. b) Simplificación del mecanismo de generación de FGly en eucariotas por la familia de genes SUMF, unas oxigenasas esenciales para la generación de residuos de FGly a partir de precursores de cisteína en eucariotas (*Adaptado de Bont et al., 1997 y Hanson et al., 2004*).



**Human sulfatasas:**

	53	54	91	95	145	147	171	242	300	301	318
Arylsulfatase A	..LIFADDLG..	..LCTPSR..	..AGKWHLG..	..LGIPYSH..	..HHTHPQ..	..FTADNG..	..CGKGT..				
Arylsulfatase B	..FLLADDLG..	..LCTPSR..	..VGKWHLG..	..FGYLLGS..	..SVHEPL..	..FSTDNG..	..GRKWSL..				
Arylsulfatase C (Steroid sulfatase)	..LVMADDLG..	..LCTPSR..	..IGKWHLG..	..YGISLTN..	..HVHTAL..	..FTSDQG..	..GGKANN..				
Arylsulfatase D	..LLMADDLG..	..LCTPSR..	..IGKWHQG..	..YGMPTL..	..HVHPL..	..FTSDHG..	..GGKMG..				
Arylsulfatase E	..LLMADDLG..	..LCTPSR..	..IGKWHLG..	..YGMPTL..	..HVHPL..	..FTSDHG..	..GGKMG..				
Arylsulfatase F	..LTMVDDL..	..LCSFSR..	..IGKWHQG..	..YGMPTL..	..HVHTPL..	..FTSDHG..	..GGKMG..				
N-Acetylgalactosamine 6-sulfatase	..LLLMDDMG..	..LCSFSR..	..VGKWHLG..	..FGSPNCH..	..ATHAPV..	..FTSDNG..	..CGKQTT..				
N-Acetylglucosamine 6-sulfatase	..LLLTDQD..	..LCSFSR..	..AGKYLNE..	..YALEKNS..	..QAKTPM..	..YTSDNG..	..IDKRQL..				
Iduronate sulfatase	..LTIVDLDR..	..VCAPSR..	..VGKVFHP..	..SSEKYEN..	..NISVPY..	..FTSDHG..	..WAKYSN..				
Sulfamidase	..LLLADDGG..	..SCSFSR..	..IGKKHVG..	..NGSVLQV..	..DVLVPY..	..FTSDNG..	..SGRTNL..				

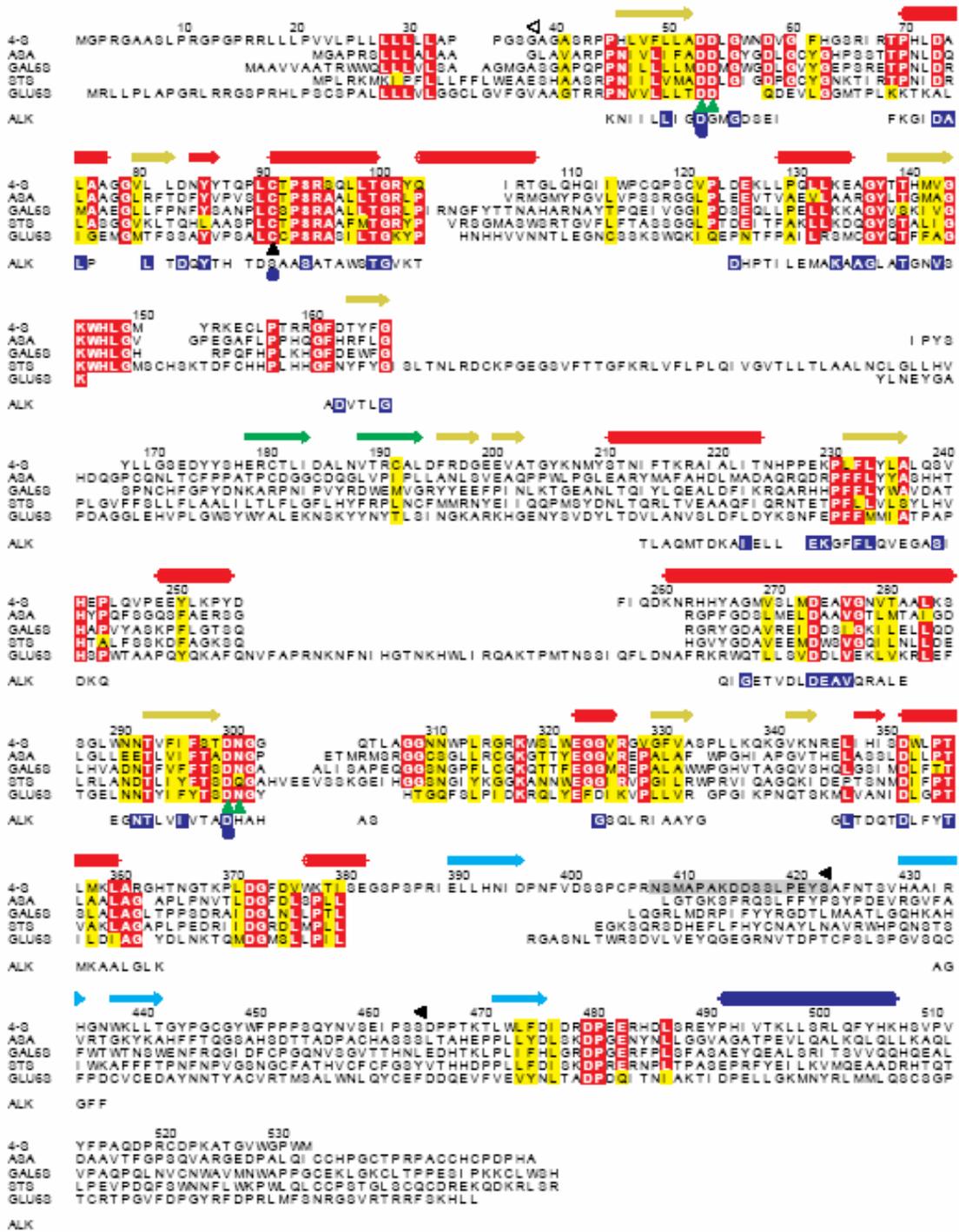
**Figura 3-2.** Conservación de la primera secuencia consenso de las sulfatasas humanas. Alineación parcial de todos los genes de las sulfatasas humanas que han sido clonadas. Esta secuencia consenso es importante para dirigir la oxidación del primer residuo aminoacídico a la FGly catalíticamente activa. Se muestran las partes de las secuencias que contienen residuos idénticos u homólogos al posible sitio activo de la ARSA humana. (*Adaptado de Waldow et al., 1999 y Hanson et al., 2004*).

	60	70	80	90	100	110	120
<i>Rattus/1-528</i>	A P P H V M F V L A D D L G W N D L G F H G S - V I R T P H L D A L A A G G V V L D N Y Y V Q P - L C T P S R S Q L L T G R Y Q I H M L Q L Q H Y						
<i>Mus/1-388</i>	T Q P P H V M F V L A D D L G W N D L G F H G S - V I R T P H L D A L A A G G V V L D N Y Y V Q P - L C T P S R S Q L L T G R Y Q I H L G L Q H Y						
<i>Homo/1-533</i>	S R P P H L V F L L A D D L G W N D V G F H G S - R I R T P H L D A L A A G G V L L D N Y Y T Q P - L C T P S R S Q L L T G R Y Q I R T G L Q H Q						
<i>Macaca/1-399</i>	S R P P H L V F V L A D D L G W N D V G F H G S - R I R T P H L D A L A A G G V L L D N Y Y T Q P - L C T P S R S Q L L T G R Y Q I R T G L Q H Q						
<i>Canis/1-535</i>	A G P P H L V F V L A D D L G W H D V G F H G S - R I R T P H L D A L A A G V L L D N Y Y T Q P - L C T P S R S Q L L T G R Y Q I H T G L Q H Q						
<i>Felis/1-535</i>	D R P P H L V F V L A D D L G W N D V S F H G S - N I R T P H L D E L A A G G V L L D N Y Y T Q P - L C T P S R S Q L L T G R Y Q I H T G L Q H Q						
<i>Drosophila/1-579</i>	S T K P N I V I I L I D D M G M N D Y S F H S N Q L L T P N I D A L A Y N G I L L N K H Y V P N - L C T P S R A T L L T G R Y P I H T G M Q H F						
<i>Pirellula/1-520</i>	S T P P N I V V I L A D D M G Y G D M G C M S Q T L Q T P N L D R L A E S G V L C S Q A Y V A S A V C S P S R A G L L T S R D P R R F G Y E G N						
<i>Bacteroides/1-458</i>	V E R P N I V I V L A D D L G W G D V G F H G - S E I K T P C N A L A A E G V V L D R F Y T A P - I S T P T R A G L M T G R Y P N R F G I R T T						

	140	150	160	170	180	190
<i>Rattus/1-528</i>	Q P - - - - - N C V P L D E K L L P Q L L K D A S Y A T - H M V G K W H L G M Y R K E C L F T R R G F D T Y F G Y L L G S E D Y Y T I					
<i>Mus/1-388</i>	Q P - - - - - S C V P L D E K L L P Q L L K E A S Y A T - H M V G K W H L G M Y R K E C L F T R R G F D T Y F G Y L L G S E D Y Y T I					
<i>Homo/1-533</i>	Q P - - - - - S C V P L D E K L L P Q L L K E A S Y T T - H M V G K W H L G M Y R K E C L F T R R G F D T Y F G Y L L G S E D Y Y S I					
<i>Macaca/1-399</i>	Q P - - - - - S C V P L D E K L L P Q L L K E A S Y T T - H M V G K W H L G M Y R K E C L F T R R G F D T Y F G Y L L G S E D Y Y S I					
<i>Canis/1-535</i>	Q P - - - - - S C V P L D E K L L P Q L L K E A S Y T T - H M V G K W H L G M Y R K E C L F T R R G F D T Y F G Y L L G S E D Y Y S I					
<i>Felis/1-535</i>	Q P - - - - - S C V P L D E K L L P Q L L K E A S Y T T - H M V G K W H L G M Y R K E C L F T R R G F D T Y F G Y L L G S E D Y Y S I					
<i>Drosophila/1-579</i>	E P - - - - - W G L P Q R E R L M P E I F R D A S Y S T - H L V G K W H L G F W R K D L T P T M R G F D H H F G Y Y N G Y I D Y Y D I					
<i>Pirellula/1-520</i>	E N Y A T R P E L L G L P T S E K T L A D H L G A A S Y A T - A L I G K W H L G M G - E M H H P N R R G F D H F C M L T G S H H Y F P					
<i>Bacteroides/1-458</i>	R - - - - - E D G L D E N E E T L A D M L A R N G Y S N R A I I G K W H L G H T R K V H Y E I N R G F S H F Y G H L N G A I D M F D I					

**Figura 3-3.** Conservación interespecífica de las secuencias consenso de la ARSB. Alineación parcial del gen ARSB de diferentes especies de eucariotas y procariontes en la que se muestran las regiones que concentran la mayor homología (gris oscuro; *realizado con ClustalW, www.ebi.ac.uk/clustalw*).



**Figura 3-4.** Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de cinco sulfatasas lisosómicas humanas: *N*-acetilgalactosamina-4-sulfatasa (4-S), galactosa-3-sulfatasa (ASA), *N*-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GAL6S), esteroide sulfatasa (STS) y *N*-acetilglucosamina-6-sulfatasa (GLU6S). Los residuos idénticos en al menos cuatro de las cinco sulfatasas están marcados en rojo, y los residuos sustituidos conservativamente en amarillo. La numeración de la secuencia para la 4-S y la asignación de estructuras secundarias están indicadas. Los cilindros representan hélices  $\alpha$  y las flechas representan láminas  $\beta$ . El código de colores de los elementos de la estructura secundaria es el mismo que el de la Figura 3-7 (ver página 39). Triángulos verdes: residuos que se unen al metal en la 4-S. ▲: cisteína modificada. ◀: lugares de corte proteolítico de la 4-S. Triángulo abierto: secuencia líder N-terminal. Se incluye además la secuencia de 169 residuos de la fosfatasa alcalina (ALK) que es estructuralmente equivalente a la 4-S. Los residuos idénticos entre las dos se marcan en azul. Los círculos azules indican los ligandos al metal de  $Zn^{2+}$  especialmente equivalentes al  $Ca^{2+}$  en la 4-S. (Adaptado de Bond et al., 1997).

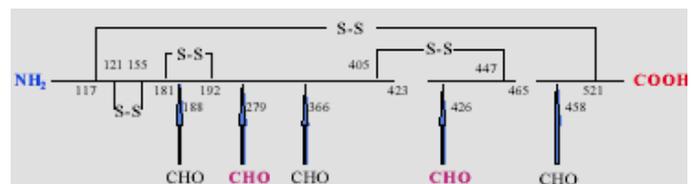
## 5. La ARSB humana

La ARSB humana fue purificada a partir de placenta humana para obtener su secuencia de aminoácidos por Steckel y colaboradores (1983). La ARSB es específica para el éster de sulfato en la posición 4 de los residuos de la *N*-acetilgalactosamina (GalNAc) que se encuentra en el dermatán sulfato (*ver página 42*). Es monomérica y se encuentra soluble en el lumen del lisosoma.

La secuencia proteica deducida tiene 533 aminoácidos, y contiene un péptido señal N-terminal de 36 o 38 aminoácidos (hay varios lugares de corte proteolítico potenciales). El polipéptido resultante de la traducción tiene un tamaño aproximado de 55,8 kDa y es glicosilado y transportado al lisosoma vía receptor manosa-6-fosfato. Durante el transporte desde el RE al Golgi, la ARSB adquiere una masa molecular de 66 kDa, pero es procesada a una forma de 57 kDa, que posteriormente es cortada durante al transporte a una forma N-terminal de 43 kDa, una central de 7 kDa y una C-terminal de 8 kDa unidas entre ellas por medio de puentes disulfuro (Figura 3-5).

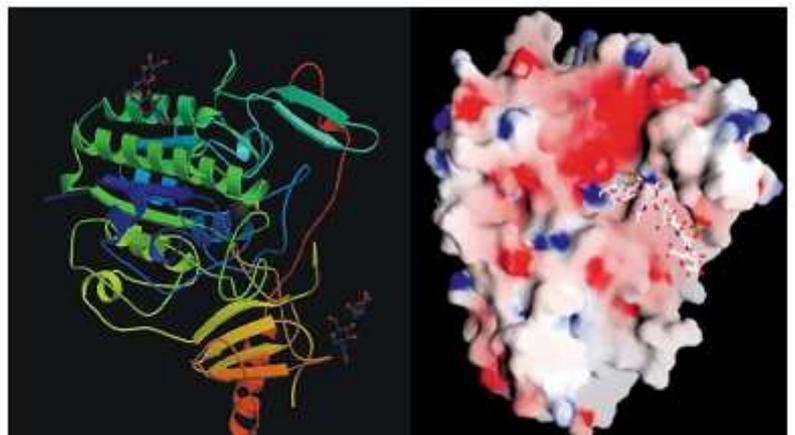
La masa del polipéptido maduro, calculada a partir de la secuencia desde los residuos 38 al 533, es de 56 kDa. La diferencia de 10 kDa con la masa calculada por electroforesis o espectrometría de masas puede explicarse por la ocupación de hasta 5 lugares de unión a carbohidratos (Bond *et al.*, 1997).

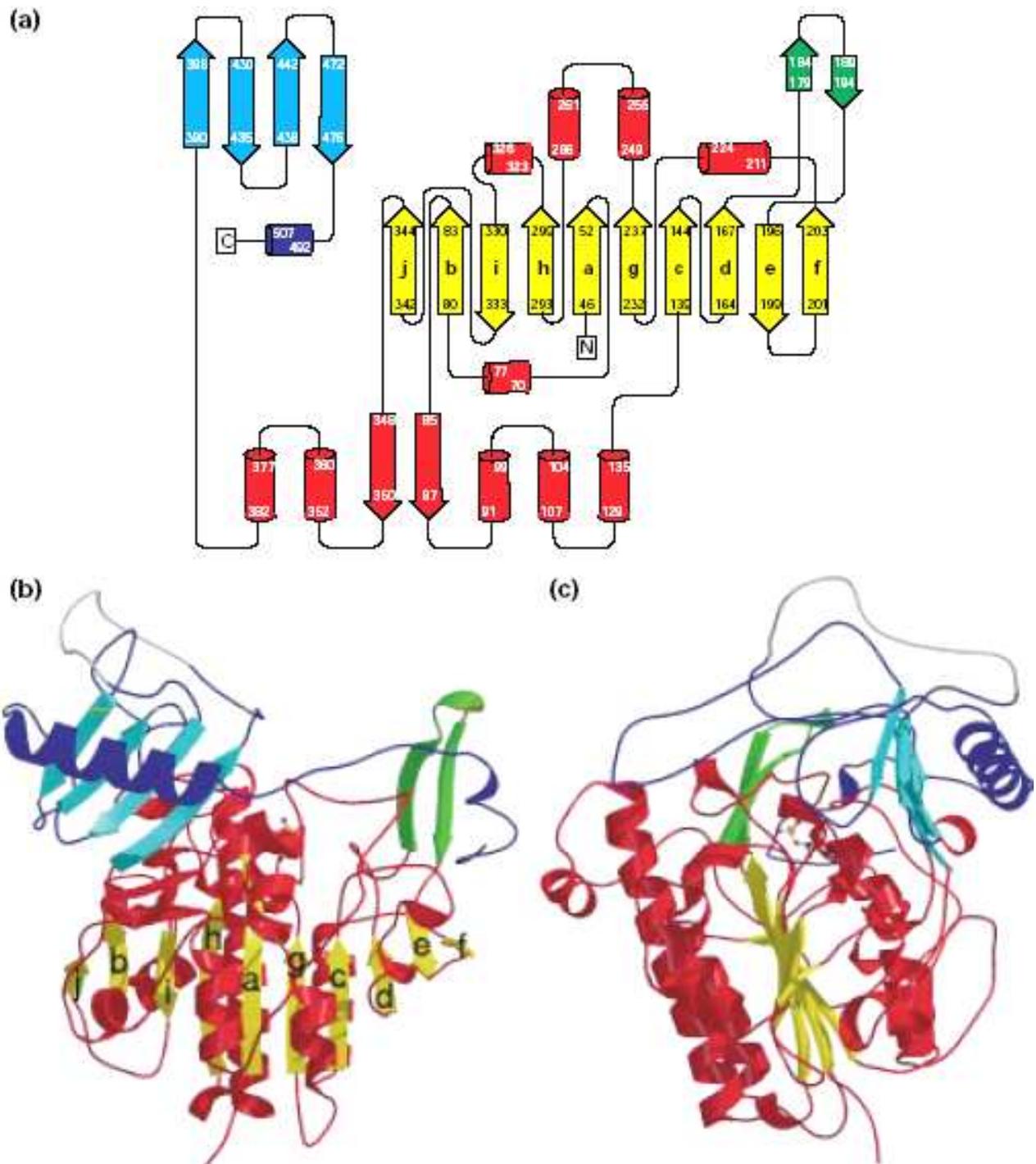
El procesamiento de la ARSB precursora a su forma madura requiere el corte proteolítico en el extremo C-terminal de los residuos 423 y 465 (Figura 3-5). Los cuatro puentes disulfuro de la molécula mantienen la estructura terciaria después del corte proteolítico. La estructura molecular tridimensional de la ARSB humana se representa en la Figura 3-6.



**Figura 3-5.** Esquema de la ARSB. Se muestra la localización de los puentes disulfuro (S-S), los lugares de corte proteolítico en la forma madura de la enzima (agujeros en el polipéptido) y las 5 posiciones consenso de *N*-glicosilación (CHO; en color rosa se indican los lugares de glicosilación potencial). (*Adaptado de Bond et al.*, 1997).

**Figura 3-6.** Estructura tridimensional de la ARSB (izquierda; extraída de Protein Data Bank, [www.rcsb.org](http://www.rcsb.org)) y superficie molecular de la ARSB en función de su potencial electrostático (derecha, adaptado de Bond *et al.*, 1997). Las cargas negativas están en rojo y las positivas en azul. El tetrasacárido situado en el sitio activo está representado por barras; los átomos se muestran en sus colores estándar. La base del surco del sitio activo es positiva debido a los residuos básicos que se unen al sulfato.





**Figura 3-7. Diagrama topológico del pliegue de la ARSB.** Las flechas representan las láminas  $\beta$ , y los cilindros, las hélices  $\alpha$ . Color amarillo: dominio grande de láminas  $\beta$ . Azul claro: dominio pequeño de láminas  $\beta$ . Azul oscuro: otros elementos del dominio pequeño. Verde: la horquilla  $\beta$  identificada como posible elemento de reconocimiento para la direccionalización al lisosoma. a) Diagrama topológico del pliegue del polipéptido. b) Estructura molecular de la 4-S. El gran dominio N-terminal está en la parte baja de la figura, y el dominio C-terminal, en la esquina superior izquierda. El residuo modificado del sitio activo, Cys91, está representado con esferas y bastones. El elemento de reconocimiento putativo hacia el lisosoma queda a la derecha de la imagen. (c) Vista de la molécula rotada  $90^\circ$  respecto a la figura b. (Adaptado de Bond et al., 1997)

### Estructura del sitio activo de la ARSB humana

La estructura cristalográfica de la ARSB fue determinada hasta una resolución de 2,5 Å por Bond y colaboradores en 1997. La molécula consiste en un monómero globular casi esférico con una mezcla de tipología  $\alpha/\beta$ , que se divide en dos dominios (Figura 3-7, página anterior). El dominio más grande es el N-terminal y contiene una gran hoja  $\beta$  central flanqueada por dos hélices  $\alpha$ . El dominio C-terminal, más pequeño, contiene una pequeña lámina  $\beta$  antiparalela unida estrechamente a una larga hélice  $\alpha$  expuesta hacia el solvente y que rodea la molécula.

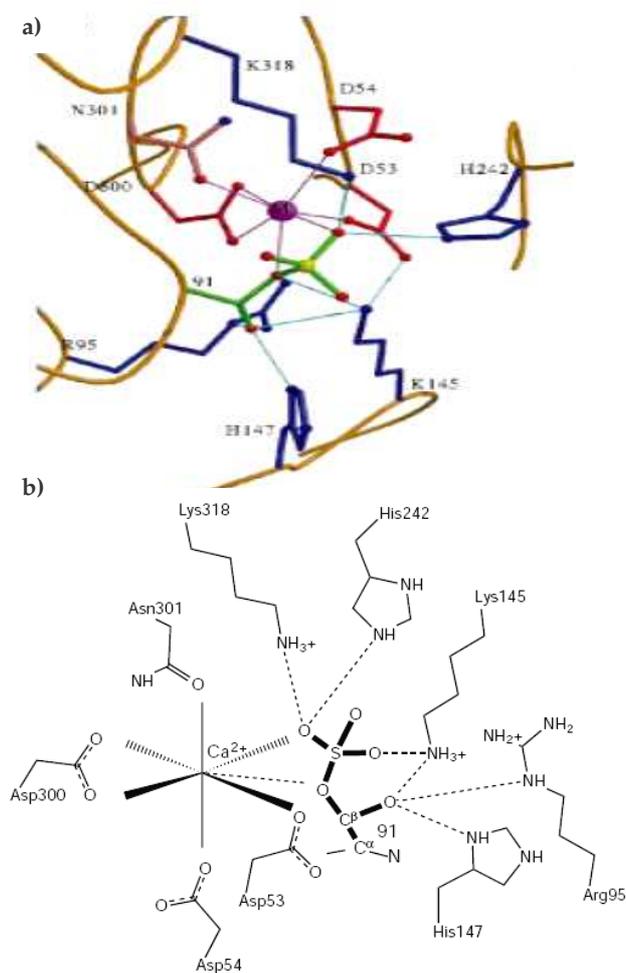
Como suele ocurrir en la familia de enzimas  $\alpha/\beta$ , la cavidad del sitio activo se encuentra en el extremo C-terminal de la hoja grande, con el residuo de FGly en forma de hidrato (FGH) localizado en el fondo de un surco estrecho formado por aminoácidos cargados positivamente. El sitio activo comprende 10 residuos polares sumamente interconectados y un catión bivalente de metal (Hanson *et al.*, 2004). Las posiciones y funciones propuestas para estos componentes se resumen en la Tabla 3-3.

**Tabla 3-3. Posición y funciones propuestas para los aminoácidos y cationes metálicos del sitio activo de la ARSB**

Residuo	Función propuesta
Ca <sup>2+</sup>	unión al sustrato y activación, estabilización de FGH
Asp53	coordinación metal
Asp54	coordinación metal
91 (FGly)	nucleófilo catalítico como FGH
Arg95	estabilización de FGH
Lys145	unión al sustrato y activación, estabilización de FGH
His147	estabilización de FGH, eliminación de FGS
His242	unión al sustrato y activación, protonación de alcohol
Asp300	coordinación metal
Asn301	coordinación metal, activación de FGH
Lys318	unión al sustrato y activación, protonación de alcohol

FGH: hidrato de formilglicina. FGS: sulfato de formilglicina. (Adaptado de Hopwood y Ballabio, 2001 y Hanson *et al.*, 2004).

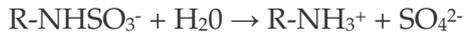
El ion metálico que se coordina *in vivo* con la ARSB parece ser el Ca<sup>2+</sup>, y lo hace mediante siete ligandos. El ion metálico actúa probablemente ayudando a estabilizar la carga negativa en el átomo de oxígeno coordinado del ion sulfato (Figura 3-8). Los residuos que determinan la especificidad por el sustrato son en gran parte desconocidos, pero se supone que el reconocimiento de los sustratos naturales debe ocurrir fuera del surco que contiene los residuos conservados del sitio activo.



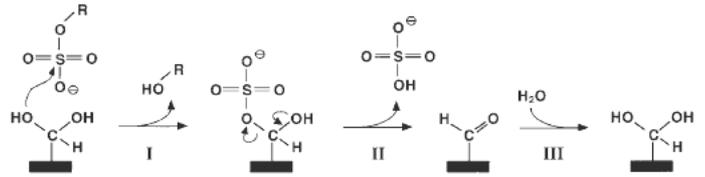
**Figura 3-8. El sitio activo de la ARSB.** (a) Principales residuos del sitio activo. Las cadenas ácidas se representan en rojo y las cadenas básicas en azul. El residuo 91 se marca en verde, el sulfato en amarillo y los átomos de oxígeno en rojo. (b) Esquema del sitio catalítico. Líneas punteadas: enlaces de hidrógeno principales que estabilizan el éster de sulfato. El ion metálico está a la izquierda. Por claridad, no se muestran las cargas localizadas, algunos de los enlaces dobles, ni varias interacciones. (Adaptado de Bond *et al.*, 1997).

### Mecanismo catalítico

Las sulfatasas catalizan la hidrólisis de ésteres de sulfato como *O*-sulfatos y *N*-sulfatos:

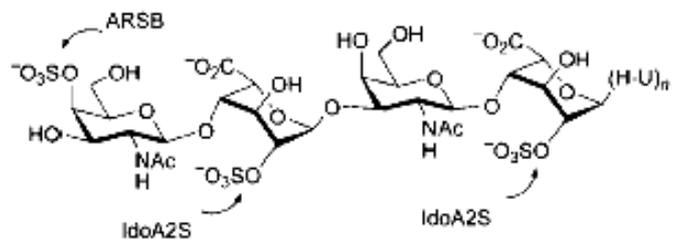


La reacción química parece compartir propiedades con las de la ARSA y la fosfatasa alcalina (Hanson *et al.*, 2004; Ghosh *et al.*, 2005). Durante la reacción catalítica, el extremo no reductor del éster 4-sulfato del sustrato GAG se une a la enzima para formar un éster covalente con el residuo FGly en la posición 91. Este intermediario puede llevar a término una hidrólisis después de un ataque nucleofílico para liberar el GAG y el sulfato unido a la enzima. El orden preciso de adición y liberación de los reactivos y productos entre el residuo  $\alpha$ -formilglicina y la sulfatasa, el sustrato éster y el agua no se ha establecido todavía. Un nucleófilo (que no se sabe si es una molécula de agua, un residuo de la proteína, o un grupo OH del sustrato) se supone que ataca el átomo de sulfuro, formando un intermediario penta-coordinado, el cual, después de romper el enlace S-O (galactosa), resulta en el sulfato de ARSB. Este mecanismo es análogo al que se propone para la fosfatasa alcalina, y en contraste con el que se propone para la ARSA, requiere inversión de la configuración del grupo sulfato (Figura 3-9).



**Figura 3-9.** Esquema propuesto para la catálisis del sulfato éster por las sulfatasas.

En la primera parte del ciclo (I) uno de los hidroxilos del hidrato de aldehído ataca el sulfuro del sulfato éster formando un éster sulfato-enzima, donde se elimina un alcohol residual. El sulfato es eliminado en la segunda parte del ciclo (II) por un reajuste intramolecular que corta el enlace éster y forma un grupo aldehído en la enzima. Finalmente el hidrato de aldehído se regenera por la entrada de agua (III). (Adaptado de Waldow *et al.*, 1999 y Ghosh *et al.*, 2005).



**Figura 3-10.** Sitios de corte del éster de sulfato en el dermatán sulfato (indicados por flechas; adaptado de Hanson *et al.*, 2004).

## EL SUSTRATO: EL DERMATÁN SULFATO

### 1. Definición

La molécula que se acumula en exceso en la MPS VI como consecuencia de la ausencia de actividad ARSB es el dermatán sulfato.

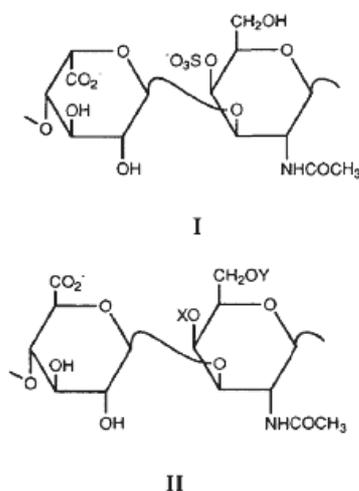
El dermatán sulfato (DS) es miembro de la familia de los glicosaminoglicanos (GAG), unos componentes ubicuos de los tejidos conectivos que constan de una cadena larga y lineal formada por repeticiones de disacáridos, los cuales a su vez están compuestos por ácido urónico y una hexosamina acetilada, pudiendo estar ésta última sulfatada. Los otros miembros de esta familia de moléculas son la heparina, el heparán sulfato, los sulfatos de condroitina (o condroitín sulfatos, CS) y el ácido hialurónico. El dermatán y los condroitín sulfatos tienen una estructura similar y componen la subfamilia de los galactosaminoglicanos.

### 2. Estructura química

El DS es un polímero lineal heterogéneo formado por una secuencia de 70 a 200 unidades sucesivas de *N*-acetil-*D*-galactosamina (*D*-GalNAc) unida mediante enlaces  $\beta(1, 3)$  a residuos de ácido *L*-idurónico y ácido *D*-glucurónico. La proporción de ácido glucurónico y *L*-idurónico varía según la fuente de tejido, siendo el ácido *L*-idurónico más frecuente (entre el 1 y el 90% del contenido del polímero de DS). El DS contiene aproximadamente un grupo *O*-sulfato por cada unidad de disacárido, encontrándose normalmente en la posición 4- de la *D*-GalNAc y en menor frecuencia en la posición 6- de la *D*-GalNAc y la posición 2- del ácido *L*-idurónico.

El DS, también llamado condroitín sulfato B, se diferencia de los condroitín sulfatos A (4-sulfato) y C (6-sulfato) por la presencia de ácido *L*-idurónico en su estructura, obtenido por epimerización del ácido glucurónico del CS en ácido idurónico (Figura 3-11). Es por ello que en la bibliografía a menudo se considera que el CS también se acumula en la MPS VI, aunque en cantidades menores con respecto al DS. En general se considera que el DS es la molécula principal que se acumula en la MPS VI.

El peso molecular del DS varía entre 12 y 45 kDa, con un peso molecular medio entre 20 y 30 kDa.



**Figura 3-11.** Principales unidades de disacárido repetidas en el dermatán sulfato (estructura I y II) y los condroitín sulfato (estructura II). En el condroitín sulfato A, X= SO<sub>3</sub><sup>-</sup> e Y=H, mientras que en el condroitín sulfato C, X=H e Y=SO<sub>3</sub><sup>-</sup> (Adaptado de Linhardt y Hileman, 1995).

### 3. Biosíntesis y degradación

La biosíntesis del DS requiere de varios pasos. En primer lugar, la proteína principal que forma parte del proteoglicano es sintetizada, y después se forman una o varias regiones de encadenamiento del polisacárido a la proteína, iniciando la síntesis de la cadena polisacáridica mediante la adición secuencial de ácido *D*-glucurónico UDP activado y residuos *D*-GalNAc. De forma

simultánea o inmediata se produce el alargamiento, y el polisacárido es modificado enzimáticamente por epimerización y *O*-sulfatación en algunas posiciones.

La enzima *N*-acetilgalactosamina-4-sulfatasa hidroliza los grupos 4-sulfato del extremo no reductor del polisacárido en el tercer paso de la vía de degradación del DS y el condroitín 4-sulfato (Figura 3-12).

#### 4. Localización y actividad biológica

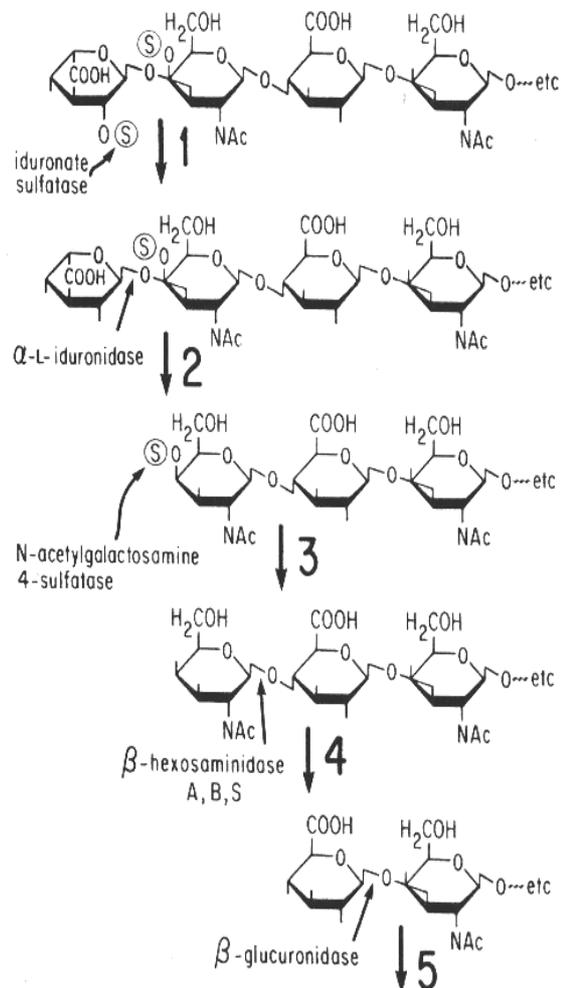
Los GAG regulan la actividad de ciertas proteínas, son responsables de la turgencia celular, intervienen en las actividades de la membrana y participan en otras muchas funciones.

Para su degradación, los GAG extracelulares y los asociados a la superficie de la célula tienen que ser internalizados por endocitosis. Entonces son degradados en el lisosoma por la acción de las exosulfatasas y exoglicosidasas. En general, los GAG sulfatados no están presentes en forma libre, sino asociados a proteínas, formando así las macromoléculas conocidas como proteoglicanos. Los proteoglicanos se localizan en la matriz extracelular y pericelular de la mayoría de las células eucarióticas, donde juegan un papel importante en las interacciones entre células y se unen a una variedad de proteínas de gran importancia biológica, además de controlar el flujo de agua y nutrientes a través del tejido conectivo denso.

El DS se encuentra en los tejidos conjuntivos fibrosos como piel, tendón y esclera, así como en músculo esquelético, vasos sanguíneos, corazón y válvulas cardíacas, hueso y cartílago.

Entre los GAG sulfatados sintetizados en fibroblastos de piel humana, el dermatán sulfato es el más abundante. Es un importante anticoagulante y anti-

trombótico, pues inhibe la agregación de las plaquetas inducida por trombina y puede activar la vía fibrinolítica. Se está evaluando su uso como antitrombótico clínico en sustitución a la heparina. Además participa en el metabolismo lipídico, pues al igual que otros GAG se une y promueve la liberación de la lipoproteína lipasa desde las células endoteliales a la circulación en su forma activa. Muchas de las actividades biológicas del DS están determinadas por sus cadenas GAG (Lindhardt y Hileman, 1995).



**Figura 3-12.** Vía de degradación del dermatán sulfato. Las enfermedades provocadas por una deficiencia enzimática correspondientes a las reacciones numeradas son: 1= MPS de tipo II, 2= MPS I, 3= MPS VI, 4= enfermedad de Sandhoff; 5= MPS VII. (Adaptado de Neufeld y Muenzer, 2001).

## IV. GENÉTICA MOLECULAR

### 1. El gen de la 4-sulfatasa

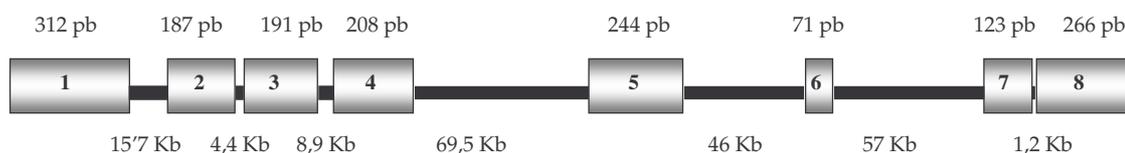
La secuencia de cDNA de la ARSB fue determinada por Peters y colaboradores en 1990. La caracterización del gen entero, con la identificación de la división entre exones y intrones, fue presentada por Modaressi y colaboradores en 1993. El gen tiene algo más de 209 Kb ([www.genome.ucsc.edu](http://www.genome.ucsc.edu)), contiene 8 exones (Figura 4-1) y está situado en la región cromosómica 5q13-q14. Las secuencias flanqueantes al codón de iniciación ATG en la posición +1 están en concordancia con las secuencias consenso para los codones de iniciación propuestas por Kozack en 1986.

Los estudios de *Northern blot* permitieron observar tres especies de mRNA de 4,8, 2,5 y 1,8 Kb en fibroblastos humanos (Peters *et al.*, 1990). Sin embargo, en las bases de datos actuales sólo constan dos variantes transcripcionales del gen ARSB. La segunda variante tiene una secuencia 3' alternativa a la primera variante, con un extremo C-terminal distinto y más corto comparado con la isoforma 1. La segunda variante codifica para una proteína de 413 aminoácidos, de los cuales sólo los nueve últimos son diferentes a los de la isoforma 1. Ambas variantes son idénticas hasta el exón 6.

Dos de las arilsulfatasas humanas, I y J, comparten un 45-48% de identidad de aminoácidos con la ARSB, mientras que manifiestan un menor parecido con otras sulfatasas humanas. Los genes de la ARSI y la ARSJ, que sólo tienen dos exones, pueden ser considerados parálogos del gen ARSB, y pudieron haberse originado a partir de un único evento de retrotranscripción del mRNA de la ARSB, seguido de una inserción intrónica y una duplicación de locus (Sardiello *et al.*, 2005).

### 2. Mutaciones patológicas

Hasta la fecha se han caracterizado unas 120 mutaciones patológicas en el gen ARSB (Tablas 4-1 a 4-4, páginas siguientes), y la mayoría de ellas son privadas. Se han estudiado pacientes provenientes de distintas poblaciones: Brasil, Chile, Australia, Estados Unidos, China, Rusia, Italia, Francia, Alemania y Portugal (Wicker *et al.*, 1991; Jin *et al.*, 1991 y 1992; Litjens *et al.*, 1992 y 1996; Arlt *et al.*, 1994; Isbrandt *et al.*, 1994 y 1996; Voskoboeva *et al.*, 1994 y 2000; Simonaro y Schuman, 1995; Villani *et al.*, 1998 y 1999; Wu *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2001; Karageorgos *et al.*, 2004, 2007a y 2007b; Brooks *et al.*, 2005; Petry *et al.*, 2005 y 2006; Dou *et al.*, 2006). La mayoría de los pacientes caracterizados son heterocigotos compuestos.



**Figura 4-1. Representación de la estructura del gen ARSB.** Los exones (cajas) y los intrones (barras) están representados a escalas diferentes. En los exones 1 y 8 se ha representado sólo la parte codificante por problemas de espacio.

**Tabla 4-1. Mutaciones sin sentido**

Mutación	Efecto predicho	Exón	Referencia
c.289C>T	p.Q97X	1	Karageorgos <i>et al.</i> (2004)
c.438G>A	p.W146X	2	Voskoboeva <i>et al.</i> (2000)
c.478C>T	p.R160X	2	Voskoboeva <i>et al.</i> (1994)
c.571C>T	p.R191X	3	Karageorgos <i>et al.</i> (2007b)
c.589C>T	p.R197X	3	Petry <i>et al.</i> (2005)
c.765T>G	p.Y255X	4	Lam <i>et al.</i> (2004)
c.943C>T	p.R315X	5	Voskoboeva <i>et al.</i> (2000)
c.979C>T	p.R327X	5	Karageorgos <i>et al.</i> (2004)
c.1130G>A	p.W377X	5	Karageorgos <i>et al.</i> (2007b)
c.1261G>T	p.E421X	7	Xu <i>et al.</i> (1996)
c.1366C>T	p.Q456X	8	Villani <i>et al.</i> (1998)
c.1419G>A	p.W473X	8	Karageorgos <i>et al.</i> (2007b)
c.1507C>T	p.Q503X	8	Villani <i>et al.</i> (1999)
c.1539C>G	p.Y513X	8	Voskoboeva <i>et al.</i> (2000)

**Tabla 4-2. Deleciones e inserciones**

Mutación	Efecto predicho	Exón	Referencia
c.108_120del13	p.S37PfrX16	1	Karageorgos <i>et al.</i> (2007b)
c.114delG <sup>a</sup>	-	1	Karageorgos <i>et al.</i> (2007b)
c.116_123del	p.A39EfsX85	1	Karageorgos <i>et al.</i> (2007b)
c.219delC	p.D73EfsX41	1	Isbrandt <i>et al.</i> (1996)
c.221_230del	p.L75AfrX36	1	Isbrandt <i>et al.</i> (1996)
c.237_243del GGT GCTC	p.V80WfsX32	1	Voskoboeva <i>et al.</i> (1994)
c.238delG	p.V80CfsX34	1	Litjens <i>et al.</i> (1992)
c.245delT	p.L82RfsX32	1	Voskoboeva <i>et al.</i> (2000)
c.256_258delTAC	p.Y86del	1	Karageorgos <i>et al.</i> (2004)
c.427delG	p.V143SfsX41	2	Karageorgos <i>et al.</i> (2004)
c.489_491delTAC <sup>a</sup>	-	2	Karageorgos <i>et al.</i> (2007b)
c.629_635del	p.Y210X	3	Karageorgos <i>et al.</i> (2007b)
c.743delC	p.P248LfsX5	4	Isbrandt <i>et al.</i> (1996)
c.899-1142del	p.D300VfsX193	5	Arlt <i>et al.</i> (1994)
c.1036delG	p.E346SfsX13	5	Karageorgos <i>et al.</i> (2007b)
c.1161_1162insC	p.R388QfsX3	6	Karageorgos <i>et al.</i> (2007b)
c.1279delA	p.T427HfsX147	7	Petry <i>et al.</i> (2005)
c.1285_1286insT	p.V429CfsX5	7	Isbrandt <i>et al.</i> (1994)
c.1482delC	p.I494MfsX80	8	Karageorgos <i>et al.</i> (2007b)
c.1533_1555del <sup>b</sup>	-	8	Petry <i>et al.</i> (2003)
c.1534_1556del	p.V512PfsX3	8	Karageorgos <i>et al.</i> (2007b)
c.1577delC	p.T526MfsX48	8	Isbrandt <i>et al.</i> (1994)
c.1582_1596del	p.V528_W532del	8	Karageorgos <i>et al.</i> (2007b)

<sup>a</sup> La nomenclatura publicada no se corresponde con la secuencia real de la ARSB. <sup>b</sup> Pudiera tratarse de una confusión de los autores con la c.1534\_1556del, o a la inversa.

El elevado número de alelos privados dificulta el análisis rutinario de mutaciones en la población general, así como el establecimiento de correlaciones genotipo-fenotipo (Litjens y Hopwood, 2001). No obstante, se han descrito algunos alelos frecuentes, como p.R152W en Rusia, (25% de los 20 alelos mutados; Voskoboeva *et al.*, 2000), o p.Y210C (18% en 105 pacientes, Karageorgos *et al.*, 2007b) y p.H393P (8% de alelos mutantes en un total de 25 pacientes australianos y británicos; Litjens *et al.*, 1996).

El cambio p.Y210C es relativamente común en Francia y Australia, y da lugar a un inicio tardío de los síntomas y un avance lento de la enfermedad. Otro alelo mutado, c.1534\_1556del, parece común en pacientes brasileños y se encontró en el 23,1% de los alelos descritos en esa población (6/26, Petry *et al.*, 2006; publicada como c.1533\_1555del). La mutación p.R315Q fue la segunda más prevalente en esa población y da lugar a un inicio temprano de los síntomas y progresión rápida (Petry *et al.*, 2003). La p.R315Q apareció en el 11,4% de los pacientes estudiados por Karageorgos *et al.* (2007b).

El cambio p.S384N apareció en un 12,4% de los alelos de 105 pacientes (Karageorgos *et al.*, 2007b). Esta sustitución se ha encontrado en homocigosis en unos pocos casos, y más frecuentemente en heterocigosis compuesta o asociada a otros dos alelos patogénicos (Voskoboeva *et al.*, 2000, Karageorgos *et al.*, 2007b). Las mutaciones p.R315Q y p.S384N se han encontrado asociadas en el mismo alelo en pacientes de Portugal y Brasil y parece claro que pudiera existir un efecto fundador (Karageorgos *et al.*, 2007b).

Las mutaciones se han analizado en regiones exónicas y periexónicas. Los casos de pacientes con un alelo sin identificar se asumen como cambios en la

secuencia promotora, cambios intrónicos, deleciones parciales del gen en el alelo sin identificar u otro tipo de reordenamientos.

**Tabla 4-3. Mutaciones de cambio de sentido**

Mutación	Efecto predicho	Exón	Referencia	Mutación	Efecto predicho	Exón	Referencia
c.98C>T	p.A33V	1	Karageorgos <i>et al.</i> (2007b)	c.707T>C	p.L236P	4	Jin <i>et al.</i> (1992)
c.171G>C	p.W57C	1	Karageorgos <i>et al.</i> (2007b)	c.716A>G	p.Q239R	4	Wu <i>et al.</i> (2000)
c.160G>A	p.D54N	1	Karageorgos <i>et al.</i> (2007b)	c.797A>C	p.Y266S	4	Karageorgos <i>et al.</i> (2007b)
c.175G>A	p.D59N	1	Petry <i>et al.</i> (2005)	c.803G>T	p.G268V	4	Karageorgos <i>et al.</i> (2007b)
c.194C>T	p.S65F	1	Villani <i>et al.</i> (1999)	c.887T>A	p.I296N	4	Karageorgos <i>et al.</i> (2007b)
c.215T>A	p.L72Q	1	Isbrandt <i>et al.</i> (1996)	c.900T>A	p.D300E	5	Karageorgos <i>et al.</i> (2007b)
c.215T>G	p.L72R	1	Petry <i>et al.</i> (2005)	c.904G>A	p.G302R	5	Villani <i>et al.</i> (1998)
c.247G>T	p.D83Y	1	Karageorgos <i>et al.</i> (2007b)	c.936G>T	p.W312C	5	Karageorgos <i>et al.</i> (2004)
c.264G>C	p.Q88H	1	Petry <i>et al.</i> (2005)	c.937C>G	p.P313A	5	Brooks <i>et al.</i> (2005)
c.275C>T	p.T92M	1	Litjens <i>et al.</i> (1996)	c.937C>T	p.P313S	5	Karageorgos <i>et al.</i> (2007b)
c.275C>A	p.T92L	1	Karageorgos <i>et al.</i> (2007b)	c.944G>A	p.R315Q	5	Villani <i>et al.</i> (1999)
c.277C>T	p.P93S	1	Petry <i>et al.</i> (2005)	c.960C>G	p.S320R	5	Voskoboeva <i>et al.</i> (2000)
c.284G>A	p.R95Q	1	Litjens <i>et al.</i> (1996)	c.962T>C	p.L321P	5	Isbrandt <i>et al.</i> (1994)
c.288C>G	p.S96R	1	Karageorgos <i>et al.</i> (2007b)	c.971G>T	p.G324V	5	Karageorgos <i>et al.</i> (2007b)
c.293T>C	p.L98P	1	Voskoboeva <i>et al.</i> (2000b)	c.1028A>T	p.K343M	5	Karageorgos <i>et al.</i> (2007b)
c.293T>A	p.L98Q	1	Karageorgos <i>et al.</i> (2007b)	c.1032C>G	p.N344K	5	Karageorgos <i>et al.</i> (2007b)
c.305G>A	p.R102H	1	Karageorgos <i>et al.</i> (2007a)	c.1057T>C	p.W353R	5	Karageorgos <i>et al.</i> (2007a)
c.312G>C	p.Q104H	1	Karageorgos <i>et al.</i> (2007b)	c.1079T>C	p.L360P	5	Voskoboeva <i>et al.</i> (2000)
c.317G>A	p.R106H	2	Karageorgos <i>et al.</i> (2007b)	c.1151G>A	p.S384N	6	Voskoboeva <i>et al.</i> (2000)
c.323G>T	p.G108V	2	Karageorgos <i>et al.</i> (2007a)	c.1178A>C	p.H393P	6	Litjens <i>et al.</i> (1996)
c.347C>A	p.P116H	2	Villani <i>et al.</i> (1999)	c.1197C>G	p.F399L	7	Yang <i>et al.</i> (2001)
c.349T>C	p.C117R	2	Jin <i>et al.</i> (1992)	c.1214G>A	p.C405Y	7	Jin <i>et al.</i> (1992)
c.389C>T	p.P130L	2	Karageorgos <i>et al.</i> (2007a)	c.1289A>G	p.H430R	7	Karageorgos <i>et al.</i> (2007a)
c.410G>T	p.G137V	2	Wicker <i>et al.</i> (1991)	c.1301G>T	p.R434I	7	Karageorgos <i>et al.</i> (2007b)
c.426G>C	p.M142I	2	Simonaro y Schuchman (1995)	c.1315A>G	p.K439E	7	Karageorgos <i>et al.</i> (2007b)
c.430G>A	p.G144R	2	Isbrandt <i>et al.</i> (1994)	c.1325C>T	p.T442M	7	Karageorgos <i>et al.</i> (2007b)
c.436T>C	p.W146R	2	Simonaro y Schuchman (1995)	c.1325C>T	p.T442R	7	Karageorgos <i>et al.</i> (2007b)
c.437G>C	p.W146S	2	Simonaro y Schuchman (1995)	c.1336G>C	p.G446R	7	Karageorgos <i>et al.</i> (2007b)
c.437G>T	p.W146L	2	Simonaro y Schuchman (1995)	c.1340G>T	p.C447F	8	Karageorgos <i>et al.</i> (2007b)
c.454C>T	p.R152W	2	Voskoboeva <i>et al.</i> (1994)	c.1340G>C	p.C447S	8	Karageorgos <i>et al.</i> (2007b)
c.479G>A	p.R160Q	2	Voskoboeva <i>et al.</i> (1994)	c.1415T>C	p.L472P	8	Karageorgos <i>et al.</i> (2007b)
c.509T>G	p.L170R	3	Dou <i>et al.</i> (2006)	c.1442C>T	p.P481L	8	Brooks <i>et al.</i> (2005)
c.511G>A	p.G171S	3	Karageorgos <i>et al.</i> (2007a)	c.1450A>G	p.R484G	8	Karageorgos <i>et al.</i> (2004)
c.512G>A	p.G171D	3	Karageorgos <i>et al.</i> (2007b)	c.1493T>C	p.L498P	8	Litjens <i>et al.</i> (1996)
c.533A>T	p.H178L	3	Karageorgos <i>et al.</i> (2007b)	c.1562G>A	p.C521Y	8	Isbrandt <i>et al.</i> (1994)
c.574T>C	p.C192R	3	Isbrandt <i>et al.</i> (1994)	c.1592C>G	p.P531R	8	Villani <i>et al.</i> (1999)
c.629A>G	p.Y210C	3	Litjens <i>et al.</i> (1996)	c.1600T>C	p.X534Q	8	Arlt <i>et al.</i> (1994)
c.667A>G	p.I223V	3	Karageorgos <i>et al.</i> (2007b)				

**Tabla 4-4. Mutaciones en sitios de corte y empalme de exones (*splicing*)**

Mutación	Efecto predicho sobre RNA	Efecto predicho sobre proteína	Exón (E) / intrón (I)	Referencia
c.312G>C	r.0	p.Q104H	E1	Karageorgos <i>et al.</i> (2007b)
c.691-1G>A	r.691_718del	p.P231_Q239del	I3	Karageorgos <i>et al.</i> (2007b)
c.1142+1G>T	r.spl?	p.?	I5	Karageorgos <i>et al.</i> (2007b)
c.1143-1G>C	r.spl?	p.?	I5	Karageorgos <i>et al.</i> (2007b)
c.1143-8T>G	r.1143_1213del	p.S381RfsX12	I5	Petry <i>et al.</i> (2005)
c.1213+5G>A	r. [899_1142del, 1143_1213del]	p.[D300VfsX193, p.S381RfsX12]	I6	Karageorgos <i>et al.</i> (2007a)
c.1214-2A>G	r.1214_1336del	p.P406_G446del	I6	Karageorgos <i>et al.</i> (2007a)
c.1214G>A	r.=	p.C405Y	E7	Jin <i>et al.</i> (1992)
c.1336+2T>G	r. spl?	p.?	I7	Karageorgos <i>et al.</i> (2004)

**Tabla 4-5. Polimorfismos en regiones codificantes**

Mutación	Efecto predicho	Exón	Código SNP	FAM*	Referencia
c.246G>A	p.L82L	1	-	-	Karageorgos <i>et al.</i> (2007b)
c.342C>T	p.I114I	2	-	-	Villani <i>et al.</i> (1999)
c.370C>T	p.L124L	2	-	-	Villani <i>et al.</i> (1999)
c.972A>G	p.G324G	5	-	-	Villani <i>et al.</i> (1999)
c.1068A>T	p.T356T	5	rs16876029	0 (T)	-
c.1072G>A	p.V358M	5	rs1065757	0,44 (A)	Jin <i>et al.</i> (1991)
c.1126G>A	p.V376M	5	rs17220759	0,167 (A)	Wicker <i>et al.</i> (1991)
c.1151G>A	p.S384N	6	rs25414	0,067 (A)	Voskoboeva <i>et al.</i> (2000)
c.1191G>A	p.P397P	6	rs25413	0,158 (A)	Schuchman <i>et al.</i> (1990)
c.1362G>A	p.P454P	8	rs35757003	0,041** (A)	-
c.1515C>T	p.Y505Y	8	-	-	Karageorgos <i>et al.</i> (2007b)

\*Frecuencia del alelo minoritario en población CEU de residentes en Utah con ancestros procedentes del norte y el oeste de Europa ([www.hapmap.org](http://www.hapmap.org)). \*\*Frecuencia del alelo minoritario en población AGI ASP (caucasoide y afroamericana; es la única que se ha descrito hasta ahora).

### 3. Polimorfismos

Se han identificado un total de 11 polimorfismos en las regiones exónicas codificantes del gen *ARSB* (Tabla 4-5), así como unos 938 cambios intrónicos presentes en las bases de datos de SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*). Las únicas sustituciones no sinónimas son los cambios p.V358M, p.V376M y p.S284N. La sustitución p.V358M se considera un alelo frecuente en población caucasoide (38% en 220 alelos; Jin *et al.*, 1991). Se considera un cambio de aminoácido no patogénico, pese a que en los estudios de expresión heteróloga dicho cambio da lugar a una reducción de la actividad *ARSB* de más del 50% comparado con la proteína p.358V (Tabla 4-6, *página siguiente*), por lo que más bien sería un alelo modificador de la actividad y no un

polimorfismo neutro. La sustitución p.V376M, en cambio, da lugar a una actividad prácticamente idéntica a la del alelo p.376V (Karageorgos *et al.*, 2004 y 2007a).

Conviene destacar que el cambio p.S384N fue descrito por Voskoboeva y colaboradores en 2000 como mutación patogénica. El cambio se encontró en homocigosis en varios pacientes con avance rápido de la enfermedad y se asoció al fenotipo severo. En otros casos descritos, dicho cambio se ha encontrado asociado a otros dos cambios patogénicos y se ha considerado como una tercera mutación (Voskoboeva *et al.*, 2000; Karageorgos *et al.*, 2007b), pese a la ausencia de datos sobre su actividad. Sin embargo, p.S384N se encuentra en las bases de datos de SNPs con una frecuencia para el alelo minoritario del

6,7% en población CEU (europea). No se ha descrito ningún caso en población sana en la que esta sustitución se encuentre en homocigosis, aunque puede achacarse al pequeño tamaño muestral estudiado y a la baja frecuencia teórica esperada para dicho genotipo.

#### 4. Caracterización de alelos mutados

En la Tabla 4-6 se detallan todas las mutaciones presentes en el gen *ARSB* que han sido expresadas en sistemas heterólogos y el porcentaje de la actividad que presentaba la *ARSB* mutante con respecto a la proteína salvaje. Los sistemas de expresión heteróloga que han utilizado los autores han sido células renales de ratón LTK<sup>-</sup> y células de ovario de hámster chino, CHO-K1, que han sido transfectadas con vectores de expresión que contienen el cDNA de los alelos en estudio.

Al igual que ocurre en otras MPS, en la mayoría de casos se constata que las mutaciones expresadas producen una reducción en la actividad de la proteína mutada, llegando a un valor inferior al 20% de la actividad *ARSB* salvaje, y en la gran mayoría de casos, la actividad puede considerarse prácticamente nula. Curiosamente, la mutación p.X534Q produce un alargamiento de la proteína en 50 aminoácidos y presenta una actividad muy superior a la de la proteína salvaje de 533 aminoácidos.

Las mutaciones que se han encontrado están distribuidas a lo largo de las tres subunidades del polipéptido maduro; se han identificado mutaciones en residuos del lugar activo, en residuos adyacentes al lugar activo, en residuos expuestos a la superficie y en residuos escondidos dentro del núcleo proteico, así como en residuos implicados en puentes disulfuro.

**Tabla 4-6. Expresión de alelos mutados presentes en el gen *ARSB* de pacientes de MPS VI**

Mutación	% actividad respecto <i>ARSB</i> WT	Referencia
p.L72R	ND	Karageorgos <i>et al.</i> (2007a)
p.T92M	0,025%	Litjens <i>et al.</i> (1996)
p.R95Q	0,017%	Litjens <i>et al.</i> (1996)
p.R102H	12,12%	Karageorgos <i>et al.</i> (2007a)
p.G137V	4,19%	Wicker <i>et al.</i> (1991)
p.G144R	3,8%	Isbrandt <i>et al.</i> (1994)
p.L170R	0,6%	Dou <i>et al.</i> , (2006)
p.C192R	8,3%	Isbrandt <i>et al.</i> (1994)
p.R197X	ND	Dou <i>et al.</i> , (2006)
p.Y210C	2,19%	Litjens <i>et al.</i> (1996)
	1,7 %	Bradford <i>et al.</i> (2002)
p.W312C	1,22%	Karageorgos <i>et al.</i> (2004)
p.P313A	ND	Brooks <i>et al.</i> (2005)
p.R315Q	ND	Karageorgos <i>et al.</i> (2007a)
p.L321P	2,8%	Isbrandt <i>et al.</i> (1994)
p.W353R	ND	Karageorgos <i>et al.</i> (2007a)
p.V358M	42,2%	Karageorgos <i>et al.</i> (2004)
	42,42%	Karageorgos <i>et al.</i> (2007a)
p.V376M	94,2%,	Karageorgos <i>et al.</i> (2004)
	103,36%	Karageorgos <i>et al.</i> (2004)
	103,03%	Karageorgos <i>et al.</i> (2007a)
p.H393P	0,001%	Litjens <i>et al.</i> (1996)
p.H430R	24,24%	Karageorgos <i>et al.</i> (2007a)
p.P481L	17%	Brooks <i>et al.</i> (2005)
p.L498P	0%	Litjens <i>et al.</i> (1996)
p.C521Y	14,55%	Isbrandt <i>et al.</i> (1994)
p.W353R	ND	Karageorgos <i>et al.</i> (2007a)
p.X534Q	861,8%	Arlt <i>et al.</i> (1994)
c.1577delC	0%	Isbrandt <i>et al.</i> (1994)
p.Y86del	0%	Karageorgos <i>et al.</i> (2004)

ND: no detectable

Los estudios funcionales realizados sobre la proteína *ARSB* mutada sugieren que la deficiencia se debe más a una reducción de la cantidad de proteína procesada madura (ya sea a causa de una degradación incrementada en el RE, al tráfico incorrecto o a una estabilidad reducida en el lisosoma), que a la reducción de la capacidad catalítica específica de la enzima. Es el caso de las mutaciones p.G137V (Wicker *et al.*, 1991), p.X534Q (Arlt *et al.*, 1994) y p.Y210C (Bradford *et al.*, 2002), asociadas a fenotipos leves o moderados de MPS VI, y de las mutaciones p.C91T y p.C91S (Bradford *et al.*, 1999), que no se han encontrado en humanos ni en modelos animales pero que afectan a un residuo clave del sitio activo de la *ARSB* (*ver*

página 40). En dichos casos, los niveles de síntesis de la proteína precursora y glicosilación eran equivalentes a los de la ARSB salvaje, pero su maduración anómala indicaba que la proteína mutada no llegaba al sistema de endosomas y lisosomas. La retención y degradación proteolítica de la ARSB en el RE o antes de alcanzar la red *trans*-Golgi, asociada a problemas de ensamblaje o estabilidad de la proteína, podría explicar los bajos niveles de ARSB observados en células de pacientes de MPS VI.

## 5. Relación genotipo-fenotipo

Las correspondencias que se han encontrado entre los diversos estudios de expresión en sistemas heterólogos y el fenotipo clínico son imperfectas. Las mutaciones sin sentido y de cambio de pauta de lectura en homocigosis provocan la forma severa de Maroteaux-Lamy, pero las mutaciones de cambio de sentido pueden provocar la forma severa, intermedia o leve de la enfermedad.

Igual que para otras MPS, la correlación genotipo/fenotipo para las mutaciones de cambio de sentido no es lo suficiente fiable para la prognosis y el consejo genético. Existe un rango considerable de función proteica y un número significativo de alelos que no se correlacionan perfectamente con el fenotipo clínico, debido posiblemente a los efectos del fondo genético y/o a las influencias ambientales. Para este tipo de enfermedades mendelianas «simples», los fenotipos son rasgos complejos.

No obstante, para algunas mutaciones concretas sí se ha propuesto una correlación entre el genotipo y el fenotipo (o más bien la excreción de GAG en orina; Karageorgos *et al.*, 2007b), lo cual puede ser usado para predecir el avance clínico.

Así, las mutaciones p.D54N, p.L72R, p.G144R, p.I223V, p.R315Q y p.S384N se relacionan con una temprana edad de inicio, rápido avance de la enfermedad y fenotipo clínico severo (Karageorgos *et al.*, 2007b). Las mutaciones p.R152W, p.H430R y p.R434I se asocian a un avance lento de la enfermedad y a una presentación clínica atenuada. En cambio, las mutaciones p.D83Y, p.Y120C o p.C405Y se relacionan con niveles de excreción de GAG inferiores a 100 µg/mg de creatinina y se asocian a una edad de inicio de los síntomas muy tardío y un avance lento de la enfermedad.

## 6. Modelos animales

El primer modelo animal de MPS VI que se describió fue un caso natural presente en una familia de gatos siameses, en 1976. La colonia de gatos con MPS VI se estableció en 1984 en la Universidad de Pensilvania. Posteriormente se han descrito más casos de esta enfermedad en otras razas felinas, incluyendo gatos domésticos. La caracterización de la enfermedad en felinos no arrojó demasiados datos nuevos porque ya existía información sustancial de la MPS VI en humanos. Se han identificado dos mutaciones en la ARSB felina, la p.D520N y la p.L476P, tanto en homocigosis como en heterocigosis compuesta, y asociadas a todo el rango de severidad de fenotipos. Ambas mutaciones han sido expresadas en células CHO-K1 (Yogalingam *et al.*, 1998). La mutación p.D520N se asoció a niveles incrementados de actividad ARSB con respecto a la proteína control, pero la enzima se degradaba rápidamente. En cambio la mutación p.L476M no presentaba actividad ARSB y se asoció a fenotipos severos (Yogalingam *et al.*, 1997). El modelo de gato es un modelo animal excelente, pues la progresión de la enfermedad es similar a la de la forma severa de la MPS VI humana, y se ha

podido utilizar para desarrollar y evaluar diferentes estrategias terapéuticas, incluyendo el trasplante de médula ósea y la terapia de sustitución enzimática (Jezyk *et al.*, 1977). La similitud de nucleótidos a nivel de mRNA y de aminoácidos de la ARSB felina con la secuencia humana es del 89 y 91%, respectivamente.

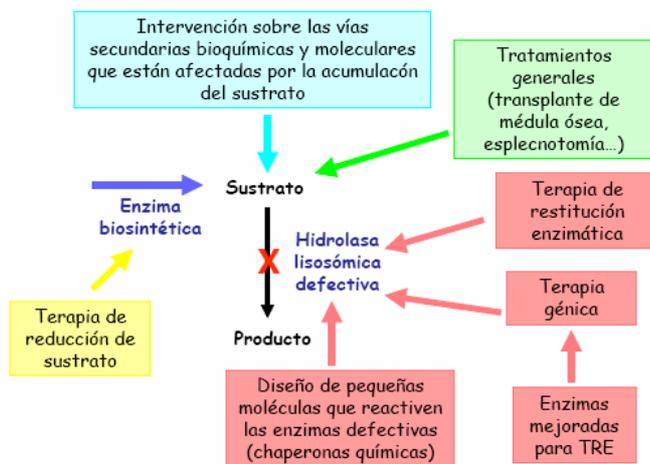
El mutante también natural en rata *Ishibashi hairless* se detectó en 1988 en Japón debido a su dismorfismo facial y esquelético (Yoshida *et al.*, 1993). Los rasgos de la enfermedad son idénticos entre rata y humanos, excepto en la hepatoesplenomegalia (Yoshida *et al.*, 1993). La ARSB de rata tiene una similitud de nucleótidos codificantes y de aminoácidos aproximada del 81 y 80% con la secuencia humana, respectivamente (Kunieda *et al.*, 1995). El gen *ARSB* de rata se encuentra en el cromosoma 2, en una región homóloga a la región 5q humana.

Mediante disrupción dirigida del gen *ARSB* se creó un modelo de ratón (Evers *et al.*, 1996). El cDNA de ratón tiene un 80% de similitud de secuencia con el cDNA humano y las proteínas respectivas tienen una identidad del 78%.

Las similitudes entre las manifestaciones somáticas de los modelos animales y los pacientes humanos son remarcables. Recientemente se ha encontrado un modelo felino de la MPS VI que exhibe un acúmulo lisosómico anormal en algunas neuronas y glía del córtex cerebral, que no se corrigieron mediante trasplante de médula ósea (Walkley *et al.*, 2005). Dada la gran similitud patológica y bioquímica entre la MPS VI felina y la humana, es concebible que sí que pueda haber implicaciones neuronales en humanos y que los casos de retraso mental que se han descrito en algunos pacientes humanos (Taylor *et al.*, 1978; Paterson *et al.*, 1982; Vestermarck *et al.*, 1987) sí sean atribuibles a la MPS.

## V. TERAPIA

Tal como se esquematiza en la Figura 5-1, existen múltiples aproximaciones para el tratamiento de las enfermedades de acumulación lisosómica, según sean los frentes sobre los cuales se quiera incidir. A continuación se detallan los tratamientos que están disponibles o en vías de desarrollo para la MPS VI.



**Figura 5-1.** Terapias para las enfermedades de acumulación lisosómica. Los tratamientos posibles pueden dividirse en aquellos que modifican la enzima defectiva (rojo), los que reducen los niveles de biosíntesis del sustrato que se acumula (amarillo), los tratamientos generales que se ocupan de los síntomas (verde) y las nuevas terapias potenciales que se basan en la intervención de las vías celulares secundarias que se ven afectadas por la enfermedad (azul; *adaptado de Futerman et al., 2004*).

### 1. Terapia de soporte

El apoyo al enfermo a nivel sintomático es la principal forma de terapia en la actualidad, junto con la incipiente administración exógena de la enzima. Los principales tratamientos consisten en mantener una dieta especial en casos de diarreas frecuentes o dificultad para tragar, ejercicios musculares de fisioterapia para compensar la rigidez de las articula-

ciones, administración de medicamentos antiinflamatorios para las articulaciones, traqueotomía o uso de otros mecanismos en caso de apnea severa del sueño, tratamiento con antibióticos para las infecciones respiratorias y del oído, esplenotomía y tratamiento quirúrgico de las hernias y las complicaciones cardíacas, esqueléticas y oftalmológicas (incluyendo el trasplante de córnea).

El trasplante de médula ósea es otra alternativa para el tratamiento de la MPS VI. Los pacientes que han sido sometidos al trasplante manifiestan una disminución de los rasgos faciales característicos, así como una prevención o mejoría estable de los trastornos cardiorrespiratorios, la postura y la movilidad, pero los cambios esqueléticos, como la estenosis espinal, persisten o progresan. De todos modos, el trasplante de médula ósea parece que prolonga la supervivencia y mejora la calidad de vida de los pacientes de MPS VI, pero requiere una cuidadosa selección de los pacientes (Herskhovitz *et al.*, 1999). La cirugía en pacientes de MPS VI puede ser complicada debido a las patologías cardiorrespiratorias y las dificultades en el seguimiento de los problemas espinales (Mut *et al.*, 2005). El porcentaje de mortalidad de esta cirugía no es despreciable dado que los pacientes han de someterse a esta operación a edad muy temprana.

### 2. Terapia génica

A pesar de las decepciones tras los primeros ensayos clínicos de terapia génica para otras enfermedades genéticas, persiste el interés en el desarrollo de esta forma de terapia para las enfermedades de acumulación lisosómica, si bien la MPS VI no es la que ha concentrado más esfuerzos (Cheng y Smith, 2003).

Las mayores dificultades de la terapia génica en células somáticas estriban en conseguir los niveles adecuados de producto génico en los tipos celulares específicos en los que se necesita, mantener la expresión *in vivo* durante largo tiempo, y regular los niveles de expresión genica. Al ser una enfermedad sin implicación del SNC, la MPS VI es buena candidata para este tipo de terapia.

Aunque los primeros esfuerzos de la terapia génica para este tipo de enfermedades se han focalizado principalmente en el uso del hígado como almacén para la producción de enzimas lisosómicas, hay que considerar al músculo esquelético y el pulmón como portales alternativos que evitarían algunos de los problemas asociados a la administración parenteral de vectores virales.

En el caso de la MPS VI se han probado como vectores los retrovirus en modelos de ratón, rata y gato.

En estudios de corrección de fibroblastos mediante transducción con retrovirus que contienen la secuencia completa del cDNA de la ARSB humana, sólo se consiguió corrección metabólica en células de rata y de gato, no en fibroblastos humanos, demostrando que había una especificidad según la especie, al menos *in vitro*, o que podía estar teniendo lugar una reducción inducida de la actividad de otras sulfatasas como consecuencia de la saturación en algún proceso específico de las sulfatasas durante la maduración (Anson *et al.*, 1992; Fillat *et al.*, 1996).

La transducción de mioblastos de felinos enfermos de MPS VI con dichas construcciones de retrovirus, condujeron a un incremento de la actividad ARSB en mioblastos y miofibras y a una corrección del acúmulo de GAG. Además, la ARSB felina recombinante era secretada por las miofibras transducidas y endocitada por

las otras miofibras, conduciendo a la corrección del fenotipo (Yogalingam *et al.*, 1997). Este experimento permitía suponer que la terapia de restitución enzimática mediada por músculo podía ser un método viable para conseguir niveles circulantes de ARSB recombinante.

Asimismo, se han realizado experimentos de rescate fenotípico mediante inyecciones subretinales o intravitreales con liberación de ARSB mediada por adenovirus en el epitelio de pigmento retiniano en ratones (Li *et al.*, 1995) y gatos con MPS VI (Ho *et al.*, 2002). El epitelio retinal pigmentado es la única parte de la retina que se encuentra afectada por el acúmulo de GAG, y se mostró en ambos casos una aparente corrección de las células de dicho epitelio.

La implantación en tejidos de la cápsula renal de gato de fibroblastos corregidos *in vitro* se demostró infructuosa, seguramente debido a la rápida senescencia de los fibroblastos implantados (Yogalingam *et al.*, 1998 y 1999).

A pesar de que la terapia de restitución enzimática ya es una realidad en el caso de la MPS VI y del éxito conseguido con algunos síntomas, las manifestaciones que afectan a las articulaciones son difíciles de tratar. Se ha propuesto que el uso de vectores virales pueda reducir *in vivo* la patología en los tejidos de las articulaciones (Byers, 2006).

Los niveles de expresión endógena de *SUMF1* (un gen que codifica una enzima imprescindible en el procesamiento de las sulfatasas para que sean activas; *ver Figura 3-1, página 36*) puede convertirse en un factor limitante para la terapia génica en ciertas células y tejidos. Dado que muchas de las aproximaciones para la terapia génica de las enfermedades de acumulación lisosómica pretenden la generación de órganos «fabricantes» de la proteína defectiva, que producirían el mayor nivel posible de enzima circulante,

se ha propuesto que la coadministración de *SUMF1* junto con el de la sulfatasa deficiente mediante vectores virales (adenovirus y lentivirus) podría potenciar *in vitro* e *in vivo* la capacidad catalítica de la sulfatasa implicada en 5 modelos de enfermedades de acumulación lisosómica, incluida la MPS VI (Fraldi *et al.*, 2007). De este modo, la coadministración del cDNA del gen *SUMF1* potenciaría la eficacia de la terapia génica aplicada a muchas sulfatasas humanas.

### 3. Terapia de restitución enzimática

La estrategia de terapia mediante restitución enzimática (TRE) fue sugerida por vez primera para las enfermedades lisosómicas por De Duve en 1964, pero no se hizo realidad hasta principios de los 90. Hoy sólo está disponible para las enfermedades de Gaucher, Fabry, Pompe, MPS I, MPS II y MPS VI, y próximamente lo estará para las enfermedades de Niemann-Pick B, leucodistrofia metacromática y  $\alpha$ -manosidosis.

La cantidad de enzima requerida para corregir los defectos metabólicos en células deficientes para dicha enzima varía para cada enfermedad, pero se calcula que puede ser sólo del 1-10% de los niveles normales, basándose en los niveles de enzima observados en individuos con un fenotipo más leve y edad de aparición de la enfermedad más tardía (Cheng y Smith, 2003; Desnick, 2004). Bastaría que pequeños niveles de enzima exógena llegasen al lisosoma para poder metabolizar el sustrato acumulado. Se ha sugerido que en el caso de la MPS VI, un nivel del 5% de la capacidad catalítica sería suficiente para evitar la aparición de la mayoría de los síntomas clínicos, a raíz de los casos de enfermos de MPS VI con baja concentración y actividad de ARSB sin apenas síntomas clínicos (Brooks *et al.*, 2005).

La MPS VI parece una buena candidata para la TRE dado que, a diferencia de otras MPS, la afectación del SNC es mínima y no hace falta superar el obstáculo de la barrera hematoencefálica. Anson y colaboradores (1992) obtuvieron grandes cantidades de la forma precursora de la enzima (que es la que más se endocita) expresando ARSB en células de mamífero y mostrando que la enzima recombinante es similar a la ARSB endógena en términos de captación, maduración, vida media y actividad catalítica específica tanto *in vivo* como *in vitro*. La endocitosis de la enzima recombinante conduciría a su incorporación dentro de los lisosomas funcionales y a la limpieza de los GAG acumulados intracelularmente.

En el caso de la MPS VI, el sistema de expresión recombinante que se utiliza son las células de ovario de hámster chino (CHO-K1). Los sistemas procariotas ya establecidos no sirven para la expresión de enzimas lisosómicas dado que no se producirían las modificaciones post-transcripcionales necesarias para la estabilidad y actividad enzimática (como la *N*-glicosilación, por ejemplo; *ver página 26*). La cantidad de enzima producida es endocitada eficientemente por las células mediante el receptor de manosa-6-fosfato (RM6P), que es la señal intracelular de direccionalización de las enzimas lisosómicas solubles (*ver página 30*). En los primeros ensayos de TRE en animales se vio que la distribución de la enzima administrada era muy desigual, debido a la diferente abundancia del RM6P en los diferentes tejidos y su exposición a la circulación. Además puede haber otros receptores específicos de carbohidratos presentes en diferentes cantidades en diversos tipos celulares que pueden ser útiles para la direccionalización de la enzima (Fuller *et al.*, 1998). La distribución del RM6P *in vivo* hacía prever que algunas células y tejidos no serían fácilmente corregidos si la terapia iba dirigida hacia el uso de este receptor.

En animales, la TRE mediante administración intravenosa de ARSB recombinante se mostró efectiva en gatos, en los cuales se consiguió reducir la patología en la mayoría de tejidos excepto en cartílago y condrocitos (Crawley *et al.*, 1997 y 1998; Byers *et al.*, 2000). *In vitro*, la penetración de la ARSB dentro del cartílago articular (un tejido avascular y con poca difusión de ciertas proteínas dentro de la matriz extracelular que lo rodea) es baja. Por lo tanto, para optimizar este tipo de terapia hace falta incrementar la cantidad de enzima que llega al cartílago y otros tejidos que presentan baja captación. El éxito de la terapia también depende de la dosis, ruta de administración y edad de inicio de la terapia.

La compañía farmacéutica que produce la ARSB humana recombinante y que ha patrocinado los ensayos clínicos en humanos es *BioMarin Pharmaceutical Inc.* La enzima se comercializa con el nombre de Naglazyme™ (galsulfasa). Naglazyme es el primer y único tratamiento de restitución enzimática indicado para el tratamiento de la MPS VI, por lo que las agencias regulatorias de Estados Unidos y la Unión Europea le han concedido la categoría de fármaco huérfano.

Los estudios preclínicos en gatos demostraron su efectividad y permitieron establecer la dosis que se aplicaría en humanos (Byers *et al.*, 2000, Auclair *et al.*, 2003). La dosis recomendada de galsulfasa es de 1 mg/kg de peso corporal administrada una vez por semana por infusión intravenosa.

Se han realizado tres ensayos clínicos con Naglazyme, que se centraron en monitorizar manifestaciones sistémicas de la MPS VI tales como la resistencia y la movilidad de las articulaciones, el dolor y rigidez articular, la obstrucción de las vías respiratorias altas, la destreza manual y la agudeza visual.

En los estudios de Fase I/II la mejoría fue más evidente en los pacientes con la variante clínica severa. En este estudio no se mostraron mejorías de la función pulmonar (Harmatz *et al.*, 2002). En la Fase II (Harmatz *et al.*, 2005b), después de 24 y 48 semanas de tratamiento, cada paciente experimentó notables mejoras en las pruebas motoras, aunque menor mejoría en el rango de movimiento de los hombros. De media, la excreción de GAG en orina disminuyó un 76%, indicando que la respuesta bioquímica era satisfactoria y la TRE era bien tolerada. En el estudio de Fase III (Harmatz *et al.*, 2006), después de 24 semanas de terapia, los pacientes tratados con Naglazyme experimentaron una mejora significativa en la distancia que eran capaces de recorrer en 12 minutos y el número de escalones que podían subir en tres minutos, así como una reducción de la concentración de GAG en orina. En una extensión posterior de ese mismo ensayo, que duraría 24 semanas más, se siguieron advirtiendo mejoras. Los pacientes tratados con Naglazyme incrementaron su altura y mejoraron su función pulmonar, y los que manifestaban una aparición puberal tardía mejoraron en su progresión. No se consiguió mejora de la agudeza visual, pero tampoco se esperaba que la enzima pudiera atravesar la barrera retinal o alcanzar la córnea avascular.

Los efectos secundarios más comunes observados en los ensayos clínicos en pacientes tratados con Naglazyme fueron: dolor de cabeza, fiebre, artralgia, náuseas, infecciones respiratorias, dolor abdominal, diarrea, dolor de oídos y otitis. Las reacciones graves incluyeron edema angioneurótico, hipotensión, disnea, broncoespasmo, dolor respiratorio, apnea y urticaria. Los síntomas más comunes de las inyecciones fueron fiebre, escalofríos, presión sanguínea elevada, dolor retrosternal y abdominal y malestar general. Ningún paciente abandonó el tratamiento por los efectos secundarios y

todos los pacientes que completaron el estudio de doble ciego del ensayo continúan recibiendo inyecciones de Naglazyme semanalmente.

Igual que para otras enfermedades lisosómicas, es de vital importancia, especialmente en las formas severas, iniciar el tratamiento tan pronto como sea posible, antes de que aparezcan las manifestaciones clínicas irreversibles de la enfermedad. Es clave tratar a los pacientes jóvenes menores de 5 años que sufran la forma severa de la enfermedad, aunque dichos pacientes no hayan sido incluidos en los estudios de Fase III.

#### 4. Otras perspectivas terapéuticas

Están bajo estudio otra serie de estrategias para las enfermedades de acumulación lisosómica, y ya se han puesto en práctica algunas de ellas. A pesar de los resultados positivos para la TRE en el caso de la MPS VI, la efectividad en la corrección de todos los síntomas clínicos aún es susceptible de mejora y no es descartable que algunas de estas estrategias alternativas demuestren su utilidad como terapias alternativas o complementarias para los pacientes de MPS VI y puedan ser llevadas a la práctica clínica.

##### Terapia de reducción de sustrato

La terapia de reducción de sustrato se basa en la hipótesis de que el fenotipo de la enfermedad depende de la razón entre la actividad enzimática residual y el flujo del sustrato por el lisosoma. Si se reduce la cantidad de sustrato que entra en el lisosoma, mediante la inhibición de su biosíntesis, la actividad enzimática residual será capaz de evitar una acumulación patológica. Normalmente se usa un compuesto que compite con el

sustrato natural por la enzima que cataliza la macromolécula en cuestión.

Este tipo de terapia está en fase de ensayos clínicos avanzados para algunas enfermedades relacionadas con el acúmulo de glicoesfingolípidos, como la enfermedad de Gaucher, Tay-Sachs y Niemann-Pick de tipo C (Sawkar *et al.*, 2006), mediante la inhibición de la glucosiltransferasa. De momento no se están llevando a cabo experimentos paralelos para inhibir la síntesis de GAG. Sin embargo, en el proceso de síntesis de los GAG, los monómeros son carbohidratos o derivados implicados en otras vías metabólicas. El bloqueo de una de las enzimas participantes en la síntesis de los GAG podría interferir en muchas otras vías metabólicas y producir graves efectos secundarios.

Recientemente, Piotrowska y colaboradores (2006) han propuesto una terapia de reducción de la síntesis de los GAG para las MPS neurodegenerativas mediante la administración de isoflavonas (genisteína, concretamente) que modulen la expresión génica del receptor EGF u otras proteínas implicadas en la síntesis de los GAG.

##### Chaperonas químicas

La llamada terapia de potenciación enzimática es una nueva estrategia terapéutica para aumentar la función residual de las proteínas mutantes. Emplea pequeñas moléculas como chaperonas farmacológicas que rescatan las enzimas mutantes mal plegadas o inestables, que presentan función residual.

Se ha estimado que un 30% de las proteínas normales no alcanza su estado funcional y son degradadas en cuestión de minutos por la maquinaria de control de calidad del RE (*ver página 29*). Las

proteínas que presentan un plegamiento anómalo (como resultado de mutaciones, por ejemplo) son reconocidas específicamente y quedan retenidas en el RE, donde se asocian a chaperonas moleculares que intentan restaurar la conformación nativa, y si fallan en conseguir un estado funcional, son degradadas rápidamente por estos sistemas de control de calidad.

Las chaperonas químicas pueden ser inespecíficas (como el glicerol, el dimetilsulfóxido o DMSO, el *N*-óxido de trimetilamina o el agua deuterada), que requieren altas concentraciones *in vivo* y son potencialmente tóxicas, o, por el contrario, ser capaces de unirse selectivamente a la proteína de interés a concentraciones más bajas (nM a  $\mu$ M), como los derivados de los iminoazúcares *N*-butil y *N*-nonildeoxinojirimicina (NB y NN-DNJ; Kerem *et al.*, 2005; Sawkar *et al.*, 2006).

Se han identificado chaperonas farmacológicas para las enzimas mutantes que causan las enfermedades de Gaucher, Tay-Sachs, Sandhoff y la gangliosidosis GM1 (Sawkar *et al.*, 2006; Desnick, 2006). Son agentes terapéuticos atractivos ya que se pueden administrar oralmente y pueden atravesar todas las barreras de la sangre. Ofrecen también la posibilidad de tratar trastornos neurodegenerativos debido a que atraviesan la barrera hematoencefálica. Incluso las mutaciones de cambio de sentido que presenten una pequeña actividad enzimática residual (incluso menos del 1%) son excelentes candidatas para la terapia de potenciación enzimática.

### **Supresión de codones de terminación mediante antibióticos aminoglicósidos**

Otro mecanismo de terapia en el cual se han estado invirtiendo muchos esfuerzos en la última década en el terreno de las enfermedades genéticas,

incluyendo algunas enfermedades de acumulación lisosómica, es la supresión de codones de terminación (*stop codon read-through*) mediante antibióticos aminoglicósidos.

Este tipo de terapia sólo sería aplicable en los pacientes genotipados que presenten en homocigosis o heterocigosis compuesta una o dos mutaciones de terminación prematura, que en función de la enfermedad y la población representan entre el 5 y el 70% del total de pacientes (Kellermayer *et al.*, 2006).

De forma natural, cuando un lugar aminoacil (A) de un ribosoma llega a un codón de terminación real durante el proceso de la traducción proteica, pueden ocurrir tanto la terminación como la supresión de la terminación. La terminación conduce al nacimiento de un polipéptido completo, mientras que con la supresión se introduce un aminoácido erróneo y la síntesis proteica prosigue hasta el siguiente codón de terminación, pudiéndose obtener entonces una proteína no funcional.

La jerarquía de eficiencia de terminación relativa descrita para los tres codones de terminación en mamíferos es de UAA>UAG>UGA (Howard *et al.*, 2000; Manuvakhova *et al.*, 2000). Cuanto menos eficiente es la terminación, más potencial hay para que pueda producirse supresión de la terminación.

La frecuencia relativa de la terminación respecto a la supresión de terminación está determinada por parámetros como el contexto del codón, la actividad de los factores de terminación y la abundancia natural de tRNA supresores. En especial, el contexto del codón de terminación es crítico, sobretudo el nucleótido inmediatamente a 3' del codón de terminación, definido como +4 (Kopelovitz *et al.*, 1992; McCaughan *et al.*, 1995; Manuvakhova *et al.*, 2000).

La supresión de codones de terminación se produce en las células de forma natural con baja eficiencia. Ocurre con una frecuencia de  $10^{-4}$  en células de mamífero intactas (Manuvakhova *et al.*, 2000) o del 0,3% en levaduras (Namy *et al.*, 2001), aunque esta eficiencia global puede estar influenciada por las variables anteriormente descritas, y puede usarse como herramienta terapéutica si se potencia adecuadamente mediante el uso de antibióticos aminoglicósidos.

Los aminoglicósidos (como la gentamicina, neomicina, amikacina, G418, kanomicina, tobramicina, paromomicina, y otros) constituyen una familia de antibióticos bien caracterizada con una estructura química particular, que incluye un anillo 2-deoxistreptamina capaz de unirse a una secuencia de 7 nucleótidos en la estructura de los RNA ribosómicos procariotas, bloqueando la síntesis proteica. En eucariotas esta secuencia difiere en una base con respecto a procariotas y la interacción con el antibiótico es menos eficiente. Los aminoglicósidos estabilizan la interacción mRNA-tRNA, lo cual interfiere con los pasos de corrección de pruebas que aseguran la fidelidad traduccional (Yoshizawa *et al.*, 1998). Tanto en eucariotas como en procariotas, a altas concentraciones inhiben la síntesis proteica, y a baja concentración inducen a una lectura equivocada de los codones de terminación de traducción.

Los antibióticos más utilizados en los ensayos de supresión de terminación tanto *in vivo* como *in vitro* son la G418 (el más efectivo *in vitro*, pero que no se puede utilizar a nivel clínico), y la gentamicina, que es un aminoglicósido de uso corriente en las infecciones respiratorias dado que es segura por inhalación. En los ensayos de supresión de codones de terminación se emplean en concentraciones subtóxicas aunque 10-15 veces superiores a las que se usan como antibióticos procariotas.

Los estudios preclínicos con gentamicina han proporcionado la prueba de que la supresión de terminación prematura se puede utilizar como estrategia terapéutica para las enfermedades genéticas, principalmente la fibrosis quística (Howard *et al.*, 1996; Bedwell *et al.*, 1997) y la distrofia muscular de Duchenne (DMD, Barton-Davis *et al.*, 1999; Kimura *et al.*, 2005).

Para la fibrosis quística se han ampliado con éxito los ensayos clínicos, y los pacientes han mostrado evidencia de mejora bioquímica e histológica después de la inducción de supresión de terminación por la droga administrada nasalmente (Clancy *et al.*, 2001; Wilschanski *et al.*, 2000 y 2003). Se ha calculado que una actividad celular CFTR de entre el 10-35% sería suficiente para prevenir significativamente la morbilidad pulmonar (Kerem *et al.*, 2005). En el caso de la DMD, los ensayos clínicos realizados hasta ahora no obtienen una mejora significativa de los síntomas, o bien los niveles de supresión de terminación conseguidos son demasiado bajos, aunque hay que tener en cuenta que los pacientes incluidos en estos ensayos no fueron escogidos bajo el criterio de su posible respuesta a la supresión en función del contexto de sus mutaciones de terminación (Bidou *et al.*, 2004).

También se han realizado estudios con resultados positivos en pacientes de diabetes insípida nefrogénica ligada al X (Schulz *et al.*, 2002; Sangkuhl *et al.*, 2004), ataxia-telangiectasia (Lai *et al.*, 2004), síndrome de Smith-Lemli-Opitz (Correa-Cerro *et al.*, 2005), pénfigo crónico benigno familiar o enfermedad Hailey-Hailey (Kellermayer *et al.*, 2006), fibrilación atrial humana (Olson *et al.*, 2006) y en pacientes con mutaciones en el gen del factor de coagulación VII (Pinotti *et al.*, 2006).

En el terreno de las enfermedades de acumulación lisosómica, se han realizado estudios de supresión de terminación mediante aminoglicósidos en fibroblastos de individuos con lipofuscinosis ceroide neuronal infantil tardía (Sleat *et al.*, 2001), síndrome de Hurler o MPS I (Keeling *et al.*, 2001 y 2002; Hein *et al.*, 2004) y cistinosis (Helip-Wooley *et al.*, 2002).

En todos estos casos se pudo constatar un incremento de entre el 1 y el 25% (normalmente cercano al 5%) en la cantidad de transcrito de tamaño normal de forma dependiente a la dosis de antibiótico suministrado, siendo muy variable en función de la línea celular utilizada y del contexto de las mutaciones de terminación. Sin embargo, incluso un pequeño incremento puede ser significativo en los trastornos recesivos resultantes de mutaciones sin sentido, en los que la expresión de proteína se aproxima a cero. Además, se demostró que la proteína producida es funcional y tiene una localización subcelular correcta. En ninguno de los casos se apreció daño celular ni efectos secundarios al tratamiento.

No obstante, también se han realizado estudios en otras enfermedades con resultados negativos o poco significativos, como en los casos de la distrofia muscular de Duchenne y de Becker (Wagner *et al.*, 2001), la retinitis pigmentosa ligada a X (Grayson *et al.*, 2002) y la hemofilia severa (James *et al.*, 2005).

La puesta a punto de este enfoque terapéutico plantea distintos problemas:

Por un lado, la acción de los antibióticos no es específica de ciertos genes y por lo tanto la supresión de los codones de terminación afecta a codones de terminación bien posicionados de genes no implicados en la enfermedad que se pretende corregir.

Por otro lado, a menudo el aminoácido que se inserta no es el original, sino otro cualquiera. En algunos estudios se ha sugerido que la glutamina y el triptófano son los dos aminoácidos que se insertan en sustitución de los codones de terminación UAG y UGA, respectivamente (Nilsson *et al.*, 2003). También podrían insertarse otros aminoácidos generando una gama de polipéptidos con mutaciones de cambio de sentido. En algunos casos, estas proteínas mutantes tendrán actividad enzimática residual, que puede ayudar a alterar el curso de la enfermedad, dado que incluso una mínima actividad puede influenciar enormemente en el fenotipo clínico de los pacientes con una enfermedad de acumulación lisosómica, particularmente si se produce un poco de enzima normal gracias a la terapia de supresión de terminación prematura.

Finalmente, el uso a largo plazo de antibióticos aminoglicósidos también está asociado a toxicidad en el oído y el riñón, que pueden ser debidas a la aparición de agregados tóxicos o productos dominantes negativos originados debido a los cambios en la traducción. Existen alternativas a valorar como usar sólo la isoforma C1 de la gentamicina, que es la responsable de la supresión pero tiene menos efectos secundarios, la amikacina (Du *et al.*, 2006) o la negamicina, un antibiótico dipéptido que altera la precisión traduccional de manera similar a la de los aminoglicósidos pero que es mucho menos tóxica que la gentamicina y que se ha probado con éxito en el modelo de ratón *mdx* para la DMD (Arakawa *et al.*, 2003).

Dicha terapia sería una estrategia apropiada para los pacientes con síntomas severos, porque los codones de terminación prematura contribuyen a la presentación clínica severa. Por otra parte, dado que las drogas que se utilizan para inducir la supresión de terminación suelen ser de menor peso molecular y

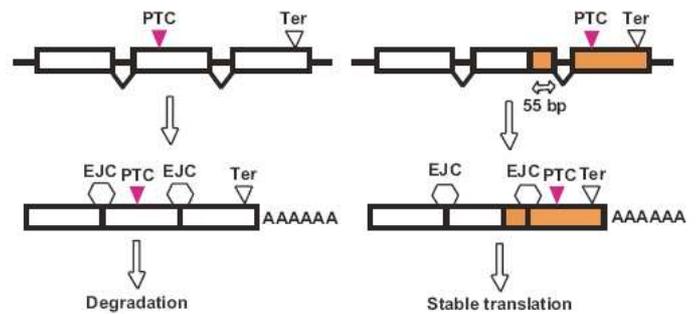
más permeables que las proteínas que se utilizan para la terapia de sustitución, podrían atravesar la barrera hematoencefálica y tratar la patología neurológica.

La compañía *PTC Therapeutics Inc.* ha producido el fármaco PTC124, un agente no antibiótico inductor de la supresión de terminación y administrable por vía oral, que ha sido designado como fármaco huérfano para el tratamiento de la DMD en 2005, y con el que se ha iniciado un ensayo clínico de Fase II en pacientes israelíes con fibrosis quística. El PTC124 tiene alta permeabilidad sin efectos secundarios tóxicos, parece tener más eficiencia de supresión de terminación que la gentamicina y existen evidencias de que puede actuar preferencialmente en los codones de terminación prematuros pero no en los de terminación natural (Hirawat *et al.*, 2007; Welch *et al.*, 2007).

### Dianas terapéuticas contra la degradación del RNA

Las mutaciones de terminación prematura en homocigosis o heterocigosis compuesta (para diferentes mutaciones de terminación prematura) suelen estar asociadas al fenotipo clínico severo en las enfermedades de acumulación lisosómica. Las consecuencias moleculares de un codón de terminación prematuro pueden depender en parte de la secuencia del entorno del codón de terminación que se introduce, pero sobre todo de la tasa de degradación del transcrito de mRNA. Los transcritos de mRNA que contienen un codón de terminación prematura son degradados por un sistema de control de calidad celular, conocido como degradación de RNA mediada por mutaciones sin sentido

(*nonsense-mediated RNA decay*, o NMD). Este proceso puede limitar la síntesis de los fragmentos potencialmente tóxicos o indeseados de la proteína que pudieran interferir con la función celular normal, y es dependiente de la traducción (Figura 5-2).



**Figura 5-2. Modelo simplificado del**

NMD. Durante el ensamblaje en el núcleo de un mRNA naciente, un complejo proteico (*Exon Junction Complex*, EJC) se une a los nucleótidos 20-24 a contracorriente de las uniones exón-exón en el RNA maduro. Durante la traducción de un mRNA que no contiene ningún codón de terminación prematura (PTC), todos los EJC son eliminados del mRNA por el ribosoma traductor. Esto valida al mRNA como libre de errores y permanece estable. Aunque los PTC son a menudo patológicos, también hay mRNA normales que contienen PTC a consecuencia de reordenamientos en el DNA, el uso de pautas de lectura alternativas o el uso de codones UGA que codifican selenocisteína. En cambio, si el ribosoma traductor encuentra un codón de terminación prematura a 5' de al menos un EJC (izquierda), se considera que el transcrito presenta errores y tiene lugar NMD. Un codón de terminación prematura que esté a contracorriente de este complejo unido al ensamblaje del exón-exón puede eludir el NMD. La comunicación entre el EJC y el ribosoma parece depender de factores proteicos. El EJC recluta factores responsables de NMD hacia al transcrito. La degradación es posible desde los extremos 3' o 5', dependiendo del tipo de transcrito, y en algunos casos parece iniciarse incluso antes de completar la exportación nuclear del mRNA. (Adaptado de Holbrook *et al.*, 2004 y Khajavi *et al.*, 2006).

El mRNA que contenga una mutación que genere un codón de terminación prematura y que escape a este proceso de degradación puede dar lugar a la síntesis de un polipéptido truncado. Normalmente una proteína de esas características es detectada por los mecanismos de control de calidad del RE (*ver página 29*). Las proteínas truncadas que sean estables pueden escapar a esta degradación. Los niveles de supresión de terminación natural o inducida dependen, por tanto, de la cantidad de mRNA disponible y, se relacionará directamente con la eficacia del NMD. También son dianas terapéuticas para la inducción de la supresión de terminación los factores involucrados en el NMD, cuya supresión puede estabilizar las moléculas de RNA que contengan mutaciones sin sentido, con lo cual se requerirían menores niveles de supresión para restaurar un nivel proteico fisiológicamente significativo.

### Otros tipos de terapia

Otra aproximación terapéutica prometedora es modular el NMD en sí mismo más que modular el reconocimiento de los codones de terminación prematura, mediante RNA de interferencia (*siRNAs*) contra los factores proteicos que median en el NMD. El mecanismo de funcionamiento general de los *siRNAs* consistiría en introducir en las células secuencias de RNA de doble cadena de entre 19-21 nucleótidos y que sean complementarias a las moléculas de RNA diana que se deseen bloquear.

Otra manera de suprimir mutaciones sin sentido es la expresión de tRNA supresores, por la cual se introduce en las células DNA que codifica para un tRNA con un anticodón complementario al codón de terminación y que se ha mostrado útil en la  $\beta$ -talasemia y la DMD (Chang *et al.*, 1979; Li *et al.*, 2000).

# *Objetivos*



## OBJETIVOS

El presente trabajo tiene como objetivo principal la caracterización genética y molecular del síndrome de Maroteaux-Lamy en pacientes españoles y argentinos.

Los objetivos concretos han sido:

- Identificar las mutaciones causantes del síndrome de Maroteaux-Lamy (MPS VI) en un grupo de 12 pacientes españoles y 4 pacientes argentinos. Posteriormente se añadieron un paciente belga y dos estadounidenses de origen dominicano.
- Realizar el análisis haplotípico de los polimorfismos que flanquean las mutaciones más prevalentes en la población española y argentina a fin de establecer su posible origen común.
- Confirmar la posible relación causal entre las mutaciones identificadas y la enfermedad, mediante estudios funcionales a nivel de proteína.
- Analizar el efecto de algunas mutaciones sobre la distribución intracelular de las proteínas mutadas.
- Analizar el efecto de algunas mutaciones a nivel de RNA: *splicing* y *nonsense-mediated RNA decay* (NMD).
- Establecer correlaciones entre el genotipo de los pacientes y sus características fenotípicas.
- Valorar el uso de la terapia de supresión de codones de terminación prematura mediante antibióticos aminoglicósidos como forma de terapia complementaria a desarrollar para los pacientes de MPS VI portadores de mutaciones sin sentido.



# *Resultados*



## CAPÍTULO I

### 1. Primer artículo

**«Identificación de los defectos moleculares en pacientes españoles y argentinos con mucopolisacaridosis VI (síndrome de Maroteaux-Lamy), incluyendo 9 mutaciones nuevas»**

(Artículo original publicado en *Molecular Genetics and Metabolism*, 2007)

#### Resumen

Esta publicación engloba los resultados del análisis de las mutaciones encontradas en el gen *ARSB* de pacientes españoles y argentinos con MPS VI. Se han identificado todos los alelos responsables de la enfermedad, de los cuales 9 no habían sido publicados anteriormente. De ellos, 6 son mutaciones de cambio de sentido (p.L82R, p.Y138C, p.S240F, p.G308R, p.C447F y p.L472P), uno es una mutación sin sentido (p.W322X) y dos son cambios periexónicos con implicaciones en el mecanismo de corte y empalme de exones (c.1142+2T>A y c.1143-1G>C), según se ha demostrado mediante estudios de mRNA.

Durante el proceso de publicación del artículo, Karageorgos y colaboradores (2007b) publicaron un análisis mutacional de 105 pacientes de MPS VI, que incluía

las mutaciones p. L472P, p.C447F y c.1143-1G>C, razón por la cual estas mutaciones se incluyen en la introducción de esta tesis pero se presentan como nuevas en este artículo.

Mediante estudios de RT-PCR se han obtenido evidencias de que algunas mutaciones presentes en varios pacientes estudiados podían provocar la destrucción del correspondiente transcrito mutado mediante el mecanismo de degradación del RNA mediada por codones sin sentido (*nonsense-mediated RNA decay* o NMD, ver página 59 de la introducción).

El estudio también ofrece datos relativos a la clínica de los pacientes analizados, incluyendo la edad de diagnóstico, los principales síntomas fenotípicos y la concentración de GAG totales excretados en orina, que constituyen datos importantes a la hora de intentar establecer relaciones genotipo-fenotipo.

Cumpliendo con otro de los objetivos de la tesis, se realizó el análisis haplotípico de cuatro mutaciones comunes identificadas en pacientes españoles y argentinos con MPS VI y se apuntó a un posible origen único para dichos cambios.

Como material complementario, se añaden algunas matizaciones sobre los materiales y métodos empleados en el estudio, así como las tablas de cebadores que no pudieron detallarse en el artículo.

*Referencia del artículo publicado:*

Garrido E, Chabas A, Coll MJ, Blanco M, Dominguez C, Grinberg D, Vilageliu L, Cormand B. *Identification of the molecular defects in Spanish and Argentinian mucopolysaccharidosis VI (Maroteaux-Lamy syndrome) patients, including 9 novel mutations.* Mol Genet Metab. 2007 September - October;92(1-2):122-130.

*Referencia del artículo publicado:*

Garrido E, Chabas A, Coll MJ, Blanco M, Dominguez C, Grinberg D, Vilageliu L, Cormand B. *Identification of the molecular defects in Spanish and Argentinian mucopolysaccharidosis VI (Maroteaux-Lamy syndrome) patients, including 9 novel mutations.* Mol Genet Metab. 2007 September - October;92(1-2):122-130.

*Referencia del artículo publicado:*

Garrido E, Chabas A, Coll MJ, Blanco M, Dominguez C, Grinberg D, Vilageliu L, Cormand B. *Identification of the molecular defects in Spanish and Argentinian mucopolysaccharidosis VI (Maroteaux-Lamy syndrome) patients, including 9 novel mutations.* Mol Genet Metab. 2007 September - October;92(1-2):122-130.

*Referencia del artículo publicado:*

Garrido E, Chabas A, Coll MJ, Blanco M, Dominguez C, Grinberg D, Vilageliu L, Cormand B. *Identification of the molecular defects in Spanish and Argentinian mucopolysaccharidosis VI (Maroteaux-Lamy syndrome) patients, including 9 novel mutations.* Mol Genet Metab. 2007 September - October;92(1-2):122-130.

*Referencia del artículo publicado:*

Garrido E, Chabas A, Coll MJ, Blanco M, Dominguez C, Grinberg D, Vilageliu L, Cormand B. *Identification of the molecular defects in Spanish and Argentinian mucopolysaccharidosis VI (Maroteaux-Lamy syndrome) patients, including 9 novel mutations.* Mol Genet Metab. 2007 September - October;92(1-2):122-130.

*Referencia del artículo publicado:*

Garrido E, Chabas A, Coll MJ, Blanco M, Dominguez C, Grinberg D, Vilageliu L, Cormand B. *Identification of the molecular defects in Spanish and Argentinian mucopolysaccharidosis VI (Maroteaux-Lamy syndrome) patients, including 9 novel mutations.* Mol Genet Metab. 2007 September - October;92(1-2):122-130.

*Referencia del artículo publicado:*

Garrido E, Chabas A, Coll MJ, Blanco M, Dominguez C, Grinberg D, Vilageliu L, Cormand B. *Identification of the molecular defects in Spanish and Argentinian mucopolysaccharidosis VI (Maroteaux-Lamy syndrome) patients, including 9 novel mutations.* Mol Genet Metab. 2007 September - October;92(1-2):122-130.

*Referencia del artículo publicado:*

Garrido E, Chabas A, Coll MJ, Blanco M, Dominguez C, Grinberg D, Vilageliu L, Cormand B. *Identification of the molecular defects in Spanish and Argentinian mucopolysaccharidosis VI (Maroteaux-Lamy syndrome) patients, including 9 novel mutations.* Mol Genet Metab. 2007 September - October;92(1-2):122-130.

*Referencia del artículo publicado:*

Garrido E, Chabas A, Coll MJ, Blanco M, Dominguez C, Grinberg D, Vilageliu L, Cormand B. *Identification of the molecular defects in Spanish and Argentinian mucopolysaccharidosis VI (Maroteaux-Lamy syndrome) patients, including 9 novel mutations.* Mol Genet Metab. 2007 September - October;92(1-2):122-130.

## 2. Material complementario al primer artículo

### Pacientes y muestras

En este estudio se analizó el gen *ARSB* a partir de DNA genómico de 12 pacientes españoles y 4 pacientes argentinos no emparentados y afectados de MPS VI. Posteriormente se dispuso de DNA de un paciente belga (ML17, remitido por el *Laboratoire des Maladies métaboliques et Centre de dépistage néonatal* de la *Université Catholique de Louvain*) y dos estadounidenses de origen dominicano (ML18 y ML19, enviados por el *Department of Neurology and Pediatrics* de la *New York University School of Medicine*), que no se incluyeron en el artículo porque fueron analizados posteriormente.

Al menos en el caso de los pacientes españoles, diagnosticados en el Institut de Bioquímica Clínica, en Barcelona, se descartó que fueran enfermos de MPS VII y MPS I mediante el estudio complementario de la actividad  $\beta$ -glucuronidasa y  $\alpha$ -iduronidasa, pues la clínica de dichas enfermedades es similar a la de la MPS VI.

El DNA genómico se obtuvo a partir de muestras de fibroblastos (en el caso de los pacientes ML1, ML2, ML3, ML4, ML5 y ML16), sangre total congelada (pacientes ML6, ML7, ML8, ML9 y ML10) o purificaciones de DNA enviadas por los médicos (pacientes ML11 al ML19 excepto ML16). Se disponía de sangre de uno o dos progenitores para la mayoría de pacientes. En el caso del paciente ML7, el genotipo se dedujo a partir del genotipo de los padres. Los pacientes ML9a y ML9b son gemelos y se realizó el análisis mutacional en ambos pacientes, así como en sus padres.

### Amplificación y secuenciación del gen *ARSB*

El gen *ARSB* se amplificó en 8 fragmentos correspondientes a cada uno de los 8 exones por separado incluyendo las regiones periexónicas (unos 30 pb a 5' y 3' de cada exón, aproximadamente). Los cebadores fueron diseñados usando el programa Primer3, pues los cebadores descritos en la bibliografía (Isbrandt *et al.*, 1994 y 1996) no estaban situados en las regiones más adecuadas y dieron problemas de amplificación. Todos los cebadores son, por tanto, intrónicos o quedan fuera de la secuencia codificante, y se detallan en la Tabla 1-1 (*página siguiente*) junto con el tamaño del amplicón resultante.

La reacción de amplificación de los ocho fragmentos funcionó bien a una temperatura de anillamiento de 53°C, con independencia de la temperatura de disociación de los cebadores. El fragmento que incluía el exón 1 fue muy costoso de amplificar, pese a la utilización de diferentes parejas de cebadores, polimerasas y protocolos de PCR, probablemente debido al porcentaje elevado de GC de la región (75,3% en el fragmento amplificado; 63,8% en todo el exón 1 incluyendo la región promotora). Los mejores niveles de amplificación se consiguieron usando los cebadores descritos en la Tabla 1-1 (*página siguiente*) y el coadyuvante DMSO a una concentración final del 10%, con los mismos reactivos descritos anteriormente y sometiendo la reacción a 98°C durante 10 segundos antes de continuar con los ciclos de amplificación. Este paso de PCR se mantuvo para la amplificación del resto de fragmentos.

**Tabla 1-1. Cebadores utilizados para la amplificación del gen ARSB**

Fragmento	Secuencia (5'-3')	Amplicón (pb)	%GC	Tm (C°)
Exón 1	F: TTCCTCATTCTATCAGCGGTACAAG	522	44	61,3
	R: GAGAAGCCGCCGGGACCCATAACT		62,5	75,7
Exón 2	F: GAAGGCCATTTTATCTGCTTGT	337	40,9	56,5
	R: TGATTGCACTGGGTGTGTT		45	55,3
Exón 3	F: TAGCCTCGTCACGGGTAATC	382	55	59,4
	R: CAACAATGGCCTTTTCCTACA		42,9	55,9
Exón 4	F:GCATAAATCTGAACTGTCTTATCCT	379	50	58,5
	R: GCTAACCGCTCCAATTTGTC		50	57,3
Exón 5	F: GGGAATTTAGGGTGGGAAAA	444	45	55,3
	R: TCAGGCTGCTCTTGGAGTTT		50	57,3
Exón 6	F: CTGGCAGGTTTGTATTTC	236	45	55,3
	R: AATCAAACCATCTTGGTGGG		45	55,3
Exón 7	F: CACATTTGCACTCCAGTGTG	333	47,6	57,9
	R:CAGGAGGGCAGATAGACTGG		60	61,4
Exón 8	F: ATGTTTCCACACCCACAACC	430	50	57,3
	R: AAAAGGCCTGAGGTCCAAC		50	57,3

F: forward; R: reverse. Tm: temperatura de disociación del cebador según el fabricante.

Para la secuenciación de los fragmentos amplificados purificados se utilizó aproximadamente 10 ng del producto de PCR purificado, 3,2 pmoles del cebador y 2 µl de la mix de reacción ABI Prism™ BIGDYE® Terminator V.3.1.

Paralelamente al estudio de las mutaciones patogénicas en este grupo de pacientes, se realizó el análisis mutacional y de polimorfismos de hermanos y otros familiares de algunos de los pacientes españoles, a fin de comprobar un posible estatus de portador y determinar la fase de los distintos cambios. La Tabla 1-2 (página siguiente) detalla los genotipos para las mutaciones y polimorfismos exónicos y periexónicos más importantes de todos los pacientes analizados en este estudio: algunas fases han podido ser deducidas a partir de la genotipación de sus progenitores y familiares (Tabla 1-3, ver página 80).

### Genotipación de polimorfismos

El análisis de los polimorfismos del gen ARSB para los estudios de haplotipos se realizó mediante amplificación por PCR y digestión con enzimas de restricción siguiendo el mismo protocolo

que para la confirmación de mutaciones, según se explica en el apartado de material y métodos del artículo. En la Tabla 1-4 (ver página 80) figuran las frecuencias alélicas encontradas en población control española para algunos de dichos SNPs, así como sus frecuencias en población europea (HapMap-CEU), según constan en las bases de datos actualizadas. Los cebadores y enzimas utilizados se detallan en la Tabla 1-5 (ver página 81). También se incluyen los cebadores y enzimas utilizados para la comprobación mediante análisis de restricción de las mutaciones que fueron encontradas en los pacientes de origen dominicano enviados desde Nueva York con posterioridad a la publicación del primer artículo (p.G324V y p.P244T).

La llegada del paciente ML17 (belga), homocigoto para la mutación p.P313A, permitió comparar su haplotipo con el del paciente ML1 (español, heterocigoto para la mutación), de forma similar al análisis haplotípico publicado en el artículo para otras mutaciones comunes en nuestra serie de pacientes. En la Tabla 1-1 (página siguiente) se puede comprobar que su haplotipo es idéntico para todos los polimorfismos analizados excepto para el p.G324G.

Tabla 1-2. Tabla completa de mutaciones patogénicas y polimorfismos de pacientes de MPS VI

Paciente	Genotipo	c.313-26 T>C (I2)	c.691-22 T>C (I3)	p.G324G (E5)	p.V358M (E5)	p.V376M (E5)	c.1143-27 A>C (I5)	p.S384N (E6)	p.P397P (E6)	c.1337-32 C>G (I7)	p.P454P (E8)
ML1 <sup>e</sup>	p.P313A	T	T	A	G	G	A	G	G	C	G
	c.899_1142del	T	T	A	G	G	A	G	G	C	G
ML2 <sup>e</sup>	c.1143-8T>G	T	C	A	G	G	A	G	A	C	G
	c.1143-8T>G	T	C	A	G	G	A	G	A	C	G
ML3 <sup>e</sup>	p.R160Q	T	T/C	A	G/A	G	C	G	G	C	G
	c.1143-1G>C	T	T/C	A	G/A	G	C	G	G	C	G
ML4 <sup>e</sup>	p.W322X	C	T	A	G	A	A/C	G	G	C	G
	c.427delG	C	T	A	G	A	A/C	G	G	C	G
ML5 <sup>e</sup>	p.L82R	T	T	A	G	G	A	G	G	C	G
	p.L82R	T	T	A	G	G	A	G	G	C	G
ML6 <sup>e*</sup>	p.L472P	T	T	A	A	G	C	G	G	C	G
	c.1143-1G>C	T	T	A	A	G	C	G	G	C	G
ML7 <sup>e*</sup>	c.237_243delGGTGCTC	T/C	T/C	A	G/A	G	A/C	G	G/G	C	G
	c.1143-8T>G	T/C	T/C	A	G/A	G	A/C	G	G/A	C	G
ML8 <sup>e</sup>	p.R160X	C	T	G	A	G	A	G	G	C	G
	p.R160X	C	T	G	A	G	A	G	G	C	G
ML9a/b <sup>e*</sup>	c.1142+2T>A	T	T	A	G	G	A	A	G	C	G
	c.238delG	T	T	A	G	G	A	G	G	C	G
ML10 <sup>e*</sup>	c.427delG	T/C	T	A	G	A	A/C	G	G	C	G
	p.C447F	T/C	T	A	A	G	A/C	G	G	C	G
ML11 <sup>a*</sup>	p.Y138C	C	T	A	G	G	A/C	G	G	C	G
	c.1143-8T>G	T	C	A	G	G	A/C	G	A	C	G
ML12 <sup>a*</sup>	c.1143-1G>C	T	T	A	A	G	C	G	G	C	G
	p.R95Q	T	T	A	A	G	C	G	G	C	G
ML13a/b <sup>a</sup>	c.1143-1G>C	T	T	A	A	G	C	G	G	C	G
	c.1143-1G>C	T	T	A	A	G	C	G	G	C	G
ML14 <sup>a*</sup>	p.G308R	T/C	T	A	G	G	A/C	G/A	G	C	G
	p.R315Q	T/C	T	A	G	G	A/C	G/A	G	C	G
ML15 <sup>e</sup>	p.C447F	T	T	A	A	G	C	G	G	C	G
	c.1143-1G>C	T	T	A	A	G	C	G	G	C	G
ML16 <sup>e*</sup>	p.S240F	T	T	A	A	G	C	G	G	C	G
	c.1143-1G>C	T	T	A	A	G	C	G	G	C	G
ML17 <sup>b</sup>	p.P313A	T	T	G	G	G	A	G	G	C	G
	p.P313A	T	T	G	G	G	A	G	G	C	G
ML18 <sup>d</sup>	p.G324V	T	T	A	G	G	A	G	A	C	A
	p.G324V	T	T	A	G	G	A	G	A	C	A
ML19 <sup>d*</sup>	p.P244T	T/C	T	A	A/G	G	A	G	G/A	C	G
	p.G324V	T/C	T	A	A/G	G	C	G	G/A	C	G

\* Pacientes cuyas fases han podido ser establecidas a partir de uno o los dos progenitores (el cromosoma materno se representa arriba). <sup>e</sup> español, <sup>a</sup> argentino, <sup>b</sup> belga, <sup>d</sup> estadounidense de origen dominicano.

**Tabla 1-3. Tabla completa de mutaciones patogénicas y polimorfismos de familiares de pacientes MPS VI**

Individuo	Genotipo	c.313-26	c.691-22	p.G324G	p.V358M	p.V376M	c.1143-27	p.S384N	p.P397P	c.1337-32	p.P454P
		T>C (I2)	T>C (I3)	(E5)	(E5)	(E5)	A>C (I5)	(E6)	(E6)	C>G (I7)	(E8)
ML6m <sup>e</sup>	p.L472P	T	T	A	A	G	C	G	G	C	G
	+	T	C	A	G	G	A	G	A	C	G
ML7m <sup>e</sup>	c.237_243delGGTGCTC	T/C	T/C	A	G/A	G	A/C	G	G/A	C	G
	+	T/C	T/C	A	G/A	G	A/C	G	G/A	C	G
ML7p <sup>e</sup>	c.1143-8T>G	T/C	T/C	A	G/A	G	A/C	G	G/A	C	G
	+	T/C	T/C	A	G/A	G	A/C	G	G/A	C	G
ML8m <sup>e</sup>	p.R160X	C	T	G	A	G	A	G	G	C	G
	+	T	T	G	G	A	C	G	G	C	G
ML8p <sup>e</sup>	p.R160X	C	T	G	A	G	A	G	G	C	G
	+	C	T	A	G	A	C	G	G	C	G
ML9m <sup>e*</sup>	c.238delG	T	T	A	G	G	A	G	G	C	G
	+	T	T	A	A	G	C	G	G	C	G
ML9p <sup>e*</sup>	c.1142+2T>A	T	T	A	G	G	A	A	G	C	G
	+	T	T	A	G	G	A	G	G	C	G
ML10m <sup>e</sup>	p.C447F	T/C	T	A	A	G	A/C	G	G	C	G
	+	T/C	T	A	A	G	A/C	G	G	C	G
ML10p <sup>e</sup>	c.427delG	T/C	T	A	G	A	A/C	G	G	C	G
	+	T/C	T	A	A	A	A/C	G	G	C	G
ML11m <sup>a</sup>	p.Y138C	C	T	A	G	G	A/C	G	G	C	G
	+	C	T	A	A	G	A/C	G	G	C	G
ML12p <sup>a</sup>	c.1143-1G>C	T	T	A	A	G	C	G	G	C	G
	+	T	C	A	G	G	A	G	A	C	G
ML14m <sup>a</sup>	p.R315Q	T/C	T	A	G	G	A/C	G/A	G	C	G
	+	T/C	T	A	G	A	A/C	G/A	G	C	G
ML16m <sup>e</sup>	c.1143-1G>C	T	T	A	A	G	C	G	G	C	G
	+	T	C	A	A	G	C	G	C	C	G

m: madre, p: padre. \* Individuos cuyas fases para los polimorfismos de los exones o intrones 5 y 6 fueron a su vez establecidas a partir de los dos progenitores (el cromosoma materno se representa arriba). <sup>e</sup> español, <sup>a</sup> argentino.

**Tabla 1-4. Frecuencias alélicas de polimorfismos del gen ARSB en población control española**

SNP	Código	Exón/intrón	FAM española	FAM CEU
c.313-26T>C	rs3733895	I1	T: 0,35 (n=26)	C: 0,392 (n=120)
p.V358M	rs1065757	E5	A: 0,34 (n=100)	A: 0,44 (n=116)
p.S384N	rs25414	E6	A: 0,067 (n=104)	A: 0,067 (n=120)
p.P397P	rs25413	E6	A: 0,291 (n=134)	A: 0,158 (n=120)
c.1143-27A>C	rs25415	I5	A: 0,263 (n=48)	C: 0,431 (n=116)

FAM: frecuencia del alelo minoritario. n: número de cromosomas. Se ofrecen como referencia las frecuencias de la población CEU (población centroeuropea de la base de datos Hapmap, [www.hapmap.org](http://www.hapmap.org)).

**Tabla 1-5. Enzimas y cebadores utilizados para el análisis de restricción de polimorfismos y mutaciones en el gen ARSB**

Mutación/ SNP	Enzima (alelo digerido)	Cebadores (posición)	Amplificación (banda digerida /no digerida en pb)
c.313-26T>C	<i>XbaI</i> (T)	F: 5'-CTGTTTCGTTGGAATGGTTTT-3' (I1) R: 5'-GGATCTTACAGAGATATAAACATAAAAATTCT-3' (E2/I2)	119 + 19/228
c.691-22T>C	<i>Cac81</i> (C)	F: 5'-GCATAAATCTGAACTGTCTTATCCT-3' (I3) R: 5'-GCTAACCGCTCCAATTTGTC-3' (I4)	317 + 62/379
p.P244T* (C>A)	<i>ApaI</i> (C)	F: 5'-CTCTCCAGTCTGTGCATGGG-3' (E4) R: 5'-GCTAACCGCTCCAATTTGTC-3' (I4)	256 + 22/278
p.G324G (A/G)	<i>HinfI</i> (G)	F: 5'-GGGAATTTAGGGTGGGAAAA-3' (I4) R: 5'-CCACCCCTCGGACGAC-3' (E5)	219 + 16/235
p.G324V* (G>T)	<i>BseRI</i> (G)	F: 5'-GAAAAATGGAGCCTGTGGGGAG-3' (E5) R: 5'-TCAGGCTGCTCTTGGAGTTT-3' (I5)	224 + 24/248
p.V358M§ (G/A)	<i>BspHI</i> (A)	F: 5'-GGGAATTTAGGGTGGGAAAA-3' (I4) R: 5'-TCAGGCTGCTCTTGGAGTTT-3' (I5)	317 + 127/444
p.V358M <sup>c</sup> (G/A)	<i>BspHI</i> (A)	F: 5'-CAGAGAAGCCTCTGTTTCTC-3' (E3/E4) R: 5'-CTTTGTGACGATGTGAGGA-3' (E8)	421 + 388/809
p.V376M (G/A)	<i>NspI</i> (A)	F: 5'-GGGAATTTAGGGTGGGAAAA-3' (I4) R: 5'-TCAGGCTGCTCTTGGAGTTT-3' (I5)	375 + 69/444
p.S384N§ (G/A)	<i>BstEII</i> (A)	F: 5'-TTGTTTCCAGTGAAGGTA-3' (I5/E6) R: 5'-AATCAAACCATCTTGGTGGG-3' (I6)	126 + 16/142
p.S384N <sup>c</sup> (G/A)	<i>Cac81</i> (G)	F: 5'-GGAAAACCATCAGTGAAGCAA-3' R: 5'-CTTTGTGACGATGTGAGGA-3' (E8)	343 + 20/363
p.P397P (G/A)	<i>MboI</i> (G)	F: 5'-CTGGCAGGTTTGTATTTC-3' (I5) R: 5'-GGTGAAGAGTCCACGAAGAT-3'	154 + 20/174
c.1143-27A>C	<i>ApoI</i> (C)	F: 5'-CTGGCAGGTTTGTATTTC-3' (I5) R: 5'-AATCAAACCATCTTGGTGGG-3' (I6)	162 + 74/236
c.1337-32C>G	<i>BsmAI</i> (C)	F: 5'-GAACCTGCCTCTGTGCGTCT-3' (I7) R: 5'-AAAAGGCCTGAGGTCCAAC-3' (E8)	269 + 82 + 21/372
p.P454P (G/A)	<i>BsmAI</i> (G)	F: 5'-ATGTTTCCACCCACAACC-3' (I7) R: 5'-AAAAGGCCTGAGGTCCAAC-3' (E8)	290 + 140/430

E: exón; I: intrón El nucleótido en negrita de los cebadores indica la posición desapareada requerida para la digestión. \* Mutación. § Amplificación sobre DNA genómico. <sup>c</sup> Amplificación sobre cDNA.

### Clonación de la mutación c.427delG

La identificación de la mutación c.427delG (p.V143SfsX41) fue publicada por Karageorgos y colaboradores (2004) cuando su clonación y secuenciación estaba finalizada en este trabajo.

El fragmento de amplificación que incluye el exón 2 del paciente ML4 se clonó en el plásmido pUC18 para verificar la posición exacta de la delección c.427delG. El producto de PCR purificado correspondiente (10 µl) fue tratado con polinucleótidoquinasa (PNK) y Klenow y se ligó al vector de extremos romos pUC18 *Sma*I/BAP con el SureClone® Ligation Kit (Amersham Pharmacia) según las indicaciones del fabricante. Posteriormente se introdujo por transformación todo el volumen de la ligación en células competentes *E. coli* DH5α mediante choque térmico. Las colonias resultantes fueron seleccionadas por su resistencia a ampicilina y crecidas en medio líquido LB, a partir del cual se obtuvieron minipreparaciones de DNA plasmídico según un protocolo estándar de lisis alcalina y precipitación por etanol. La presencia del inserto fue confirmada por digestión de 3 µl de la minipreparación con las enzimas de restricción *Eco*RI (5 unidades, GibcoBRL) y *Xba*I (5 unidades, GibcoBRL) en 2 µl de buffer 10xREact® 2 de GibcoBRL y un volumen total de 20 µl, a 37°C. El tamaño correcto del inserto liberado se puso de manifiesto en un gel de agarosa al 0,8 %.

A partir de nuevos cultivos líquidos de los clones escogidos se obtuvieron preparaciones de DNA de mayor calidad para secuenciación con el Quiagen Spin Miniprep Kit (Quiagen), según las indicaciones del fabricante. Para secuenciar se utilizaron tanto los cebadores internos del fragmento (Tabla 1-1, *ver página 78*) como los cebadores universales M13F y M13R.

### Verificación de la ausencia de exones a nivel de mRNA (RT-PCR)

Los resultados preliminares de RT-PCR presentados en la Figura 2 del primer artículo (*ver página 72*) parecían indicar que en los pacientes ML1, ML2 y ML3 (de los cuales se pudo disponer de células en cultivo) se producía la eliminación de ciertos exones. Para profundizar en este aspecto se realizó otro experimento de RT-PCR en las condiciones descritas en el artículo pero amplificando el cDNA entre los exones 4 y 8 (F: 5'-CAGGCATCACTATGCAG-GAA-3'; R: 5'-AAAAGGCCTGAGG-TCCAAC-3'), con un tamaño de amplicón resultante de 871 pb, y digiriéndolo mediante enzimas que reconocían dianas únicas internas en el exón 5, *Nci*I (Promega), y el exón 6, *Hph*I (New England Biolabs). Un volumen total de 10 µl (5 µl del cDNA amplificado de estos pacientes o de controles, 1-6 unidades de la enzima correspondiente y 1 µl del tampón adecuado) se digirió 16 h a 37° C; a continuación se comprobó el resultado de la digestión en un gel de poliácridamida al 12 % (Figura 1-1, *página siguiente*).

Las diferencias de intensidad entre las bandas correspondientes a los alelos con mutaciones de cambio de sentido respecto a los alelos de mutaciones que daban lugar a cambios de pauta de lectura, unidas a las evidencias presentadas en la Figura 2 del primer artículo (*ver página 72*), dieron lugar a la sospecha de que podría darse la degradación de los transcritos de mRNA que contenían las mutaciones que daban lugar a codones de parada prematura, mediante el mecanismo de *nonsense-mediated RNA decay*. Posteriormente este aspecto se estudió con más profundidad con la intención de publicarlo en el segundo artículo.



## CAPÍTULO II

### 1. Segundo artículo

#### «Síndrome de Maroteaux-Lamy: caracterización funcional de mutaciones patogénicas y polimorfismos en el gen de la arilsulfatasa B»

(Artículo original enviado a *Molecular Genetics and Metabolism*)

#### Resumen

Como continuación natural de los resultados del primer artículo, se realizaron los estudios de expresión y caracterización bioquímica de las proteínas mutadas encontradas en el grupo de 12 pacientes españoles y 4 argentinos que no habían sido descritas con anterioridad por otros autores: p.L82R, p.Y138C, p.S240F, p.G308R, p.P313A, p.C447F y p.L472P. En principio se seleccionaron las mutaciones nuevas de cambio de sentido, pues a las mutaciones que provocan un cambio de pauta de lectura se les presupone una actividad enzimática nula.

Las mutaciones p.P313A, p.C447F y p.L472P fueron descritas también por Karageorgos *et al.* (2007b) mientras el primer artículo estaba en proceso de publicación y los estudios de expresión ya habían sido finalizados.

Por primera vez en la bibliografía, se explicitó que el cDNA mutado se había expresado en el mismo contexto haplotípico que en el paciente en relación con los dos cambios exónicos presentes en las bases de datos de SNPs, p.V358M y p.S384N. Ambas variantes se expresaron también de forma individual, siendo de especial interés los resultados obtenidos para el cambio p.S384N, que tradicionalmente se ha considerado como mutación patogénica sin que se hayan realizado estudios de expresión.

El análisis bioquímico de la actividad enzimática *in vitro* de las proteínas mutadas se completó mediante análisis de *western blot*.

También por primera vez en el terreno del síndrome de Maroteaux-Lamy se realizaron estudios de inmunofluorescencia indirecta para valorar el grado de localización de la proteína ARSB mutada en los lisosomas y endosomas secundarios en fibroblastos de pacientes.

Finalmente se realizaron estudios a nivel de RNA para las mutaciones que introducen codones de parada prematuros en la secuencia codificante (sin sentido, de *splicing*). Mediante el tratamiento de cultivos de fibroblastos de pacientes con el inhibidor de la síntesis proteica cicloheximida, se puso de manifiesto que el mecanismo de *nonsense-mediated RNA decay* (ver página 59) era responsable de la degradación de los transcritos portadores de las mutaciones c.966G>A (p.W322X), c.427delG, c.1143-1G>C y c.1143-8T>G.

## **Maroteaux-Lamy syndrome: functional characterization of pathogenic mutations and polymorphisms in the arylsulfatase B gene**

Elena Garrido<sup>a</sup>, Bru Cormand<sup>a</sup>, John J. Hopwood<sup>b</sup>, Amparo Chabás<sup>c</sup>, Daniel Grinberg<sup>a</sup> & Lluïsa Vilageliu<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Departament de Genètica, Universitat de Barcelona; CIBERER, IBUB, Barcelona, Spain

<sup>b</sup> Lysosomal Diseases Research Unit, Department of Genetic Medicine, Children, Youth and Women's Health Service, North Adelaide, South Australia, Australia.

<sup>c</sup> Institut de Bioquímica Clínica, Hospital Clínic; CIBERER, Barcelona, Spain

### **\* Corresponding autor**

Lluïsa Vilageliu, PhD

Departament de Genètica, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona

Av. Diagonal 645, edifici annex, 3<sup>a</sup> planta

E-08028 Barcelona, Spain

Tel.: +34 93 4021494

Fax: +34 93 4034420

E-mail: lvilageliu@ub.edu

## ABSTRACT

Mucopolysaccharidosis VI (MPS VI; Maroteaux-Lamy syndrome) is an autosomal recessive lysosomal disorder caused by deficiency of N-acetylgalactosamine-4-sulfatase (ARSB), which is required for the degradation of dermatan sulfate. We recently reported mutational screening of 12 Spanish and 4 Argentinian MPS VI patients. In the present study, seven missense mutations (c.245T>G [p.L82R], c.413A>G [p.Y138C], c.719C>T [p.S240F], c.922G>A [p.G308R], c.937C>G [p.P313A], c.1340G>T [p.C447F] and c.1415T>C [p.L472P]) were transiently expressed in COS-7 cells and 4-sulfatase activity was measured in cell extracts. All mutations resulted in less than 6% of wild-type enzyme activity, in most cases undetectable. Mutations were expressed in their original haplotype context with respect to two non-synonymous polymorphisms present in the ARSB protein, p.V358M and p.S384N. The three less frequent haplotype combinations yielded an ARSB activity of 16%, 57% and 70%, when compared to the most frequent haplotype (p.358V; p.384S). Western blot analyses showed that the expressed mutations significantly reduced the amount of mature protein. Sub-cellular localization studies of mutant ARSB proteins in fibroblasts of MPS VI patients were performed. RNA analysis confirmed that nonsense-mediated RNA decay had taken place for all mutant alleles (c.1143-1G>C, c.1143-8T>G, c.427delG, p.W322X and c.1142+2T>A) which were candidates for causing RNA degradation by this mechanism. In summary, all the ARSB mutations studied had a significant effect on enzyme activity, protein processing and/or mRNA stability.

**KEYWORDS:** *N*-acetylgalactosamine-4-sulfatase; Maroteaux-Lamy Syndrome; transient expression; COS-7 cells; nonsense-mediated RNA decay; indirect immunofluorescence

## INTRODUCTION

Maroteaux-Lamy syndrome or mucopolysaccharidosis (MPS) VI, is caused by impaired activity of the lysosomal enzyme *N*-acetylgalactosamine-4-sulfatase (4-sulfatase, arylsulfatase B or ARSB, EC 3.1.6.1), resulting from mutations in the ARSB gene (MIM # 253200). The enzyme deficiency leads to the accumulation of harmful amounts of undegraded dermatan sulfate within the lysosomes, which causes progressive damage in several tissues. Symptoms include short stature, hepatosplenomegaly, dysostosis multiplex, joint stiffness, corneal clouding, cardiac abnormalities and coarse facies, without intellectual impairment. MPS VI patients can present within a wide continuous clinical spectrum from rapidly to slowly advancing pathology.

ARSB is a 533 amino-acid lysosomal soluble glycoprotein. Translocation through the ER membrane is accompanied by cleavage of the signal peptide and glycosylation of four asparagine residues. During transport from the ER to the Golgi, 4-sulfatase is processed from a polypeptide precursor of 66 kDa to three disulfide-linked polypeptides of 43, 8 and 7 kDa [1].

Like other mucopolysaccharidoses, MPS VI may be caused by many different disease-causing mutations in the ARSB gene that have been identified by mutational screening of patients from North America, South America, Europe, and Australasia [2-23]. Mutations with genotype-phenotype correlations have been clearly identified for some genotypes [20]. The described mutant alleles include deletions, insertions, missense and nonsense mutations, as well as splice site mutations. In a previous paper, we reported mutations in Spanish and Argentinean patients [23] involving 19 different alleles, 9 of which were novel. The most prevalent mutation in this group of patients was the splice site change c.1143-1G>C, accounting for about 22% of the total mutant alleles (7/32). Haplotype analysis pointed to a single origin for this change.

Here we expressed seven missense mutations in MPS VI patients found in Spain and Argentina (c.245T>G [p.L82R], c.413A>G [p.Y138C], c.719C>T [p.S240F], c.922G>A [p.G308R], c.937C>G [p.P313A], c.1340G>T [p.C447F] and c.1415 T>C [p.L472P]) in a heterologous transient expression system. Some splice and frameshift mutations were characterized at the RNA level and possible degradation by the nonsense-mediated RNA decay (NMD) mechanism was assessed. The possible effect of some mutations on protein trafficking in patients' fibroblasts was also studied.

## MATERIALS AND METHODS

### Patients

The mutant alleles and fibroblasts used in this study correspond to the MPS VI patients previously described [23]. Patient numbers refer to those in the same publication.

### Nonsense-mediated RNA decay

Skin fibroblasts from patients or their parents were cultured in 100 mm plates and maintained in DMEM medium supplemented with 10% bovine serum (BS) and 1% penicillin/streptomycin (Gibco, Invitrogen Life Technologies, Heidelberg, Germany) at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. Cells were cultured in the presence or absence of the protein synthesis inhibitor cycloheximide (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) at 0, 500, 1000 or 1500 µg/ml for 8 to 24 hours. Total RNA was isolated from the cultured cells using the *Qiaschredder*<sup>®</sup> Kit and the *RNeasy*<sup>®</sup> Minikit (QIAGEN, Hilden, Germany). RT-PCR reactions were performed from total RNA to amplify an *ARSB* cDNA fragment spanning exons 4 to 8 as described in Garrido et al. [23]. Quantification of the relative intensity of the electrophoretic bands was performed using the Discovery Series Quantity One 1-D Analysis Software (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Amplification of the *GAPDH* or  $\beta$ -actin cDNA, used as a control, was performed using commercially available primers (BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA, USA).

### RT-PCR, subcloning and site-directed mutagenesis

Total RNA was isolated from primary fibroblast cultures of a wild-type individual using the *QIAshredder* and the *RNeasy Minikit* (QIAGEN, Hilden, Germany). A reverse transcription reaction was carried out from total RNA using oligo-d(T) primer and M-MLV Reverse Transcript RNase-H Minus, following the manufacturer's recommendations (Promega, Madison, WI, USA). The *ARSB* cDNA was PCR-amplified in two overlapping fragments using the primers 5'-TTCCTCATTCTATCAGCGGTACAA-3' (forward) and 5'-TTGCAACTTCTTCTTCGCCATCT-3' (reverse) for a 678-bp fragment including the ATG codon and 5'-ACTTTGGATATCTCCTGGGTAGTG-3' (forward) and 5'-AAAAGGCCTGAGGTCCAAC-3' (reverse) for a 1163-bp fragment including the stop codon. The primers were designed using the Primer3 software ([frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)). The PCR reactions were performed using the Long Expand High Fidelity PCR System (Roche, Indianapolis, IN, USA) and consisted of 100 ng of template cDNA, 1 U of Long Expand Polymerase, 2 mM MgCl<sub>2</sub> in the recommended buffer, 100 µM of dNTPs, 10% DMSO and 20 pmol of each primer in a final volume of 50 µl. The reactions were subjected to 1 min at 98°C, and 35 cycles of denaturation at 96°C for 15 s, annealing at 53°C for 30 s and elongation at 68°C for 80 s, with a final extension step at 68°C for 5 min. The amplification reactions were performed in a GeneAmp<sup>®</sup> PCR System 2700

Thermocycler (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The two PCR fragments were purified with the *GFX PCR DNA and Gel Band purification Kit* (Amersham Biosciences, Amersham, UK), dephosphorylated with alkaline phosphatase T4 Poly Kinase (Promega), blunted with DNA *PoII* Klenow (Promega) and cloned separately into *SmaI*-digested pUC18 plasmid.

The two fragments were digested with *EcoRI/DraIII* and *DraIII/XbaI*, respectively, and cloned together into *EcoRI/XbaI*-digested pUC19 using the *DNA Ligation Kit Ver 2.1* (Takara Bio Inc., Otsu, Shiga, Japan). The entire wild-type *ARSB* cDNA (1724 bp) was sequenced using the *BigDye Terminator Cycle Sequencing v3.1 kit* (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) in an ABI PRISM 3700 DNA analyser (PE Applied Biosystems). Sequence chromatograms were analysed with the Seq-Man™ II software (DNASTAR Inc., Madison, WI, USA).

Mutations p.L82R, p.Y138C, p.S240F, p.G308R, p.P313A, p.C447F and p.L472P and the four possible combinations of the two polymorphic variants p.V358M and p.S384N were introduced into the wild-type *ARSB* cDNA by site-directed mutagenesis using the *QuickChange XL Site-Directed Mutagenesis Kit* (Stratagene Life Technologies Co., La Jolla, CA, USA). The sequences of the mutagenic primers are available upon request. All products were sequenced in full to verify the presence of the introduced change and the absence of undesired alterations. Mutant, wild-type and antisense cDNAs were transferred to the pcDNA3 expression vector (Invitrogen, Heidelberg, Germany).

### **Cell culture and transfection**

COS-7 cells were maintained in DMEM supplemented with 10% BS and 1% penicillin/streptomycin (Gibco) at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. For transfection, 2x10<sup>6</sup> cells were grown to 95% confluence on 100 mm plates. Cells were transfected with 2 µg of plasmid DNA and 15 µl of Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen, Heidelberg, Germany) following the manufacturer's instructions. Cells were harvested 48 hours after transfection and centrifuged, and pellets were washed once in PBSx1 and stored at -80°C until 4-sulfatase activity measurements or Western blot analyses were performed. Identical activity results were obtained when harvesting cells after 24 and 72 hours post-transfection. Transfection efficiency was assessed by GFP transfection under the same conditions on separate plates.

### **Enzyme analysis**

In vitro 4-sulfatase activity of cell extracts was determined by spectrophotometric quantification of *p*-nitrocathecol produced by hydrolysis of the substrate *p*-nitrocathecol sulfate [24]. The activity of another lysosomal enzyme ( $\beta$ -hexosaminidase) was measured as a control (data not shown).

The average endogenous 4-sulfatase activity of untransfected COS-7 cells, cells transfected with an empty pcDNA3 plasmid and cells transfected with p.358V;p.384S cDNA in antisense orientation, produced insignificant levels of activity, as expected. The average activity of cells

transfected with an empty pcDNA3 plasmid was used to correct the results of cells expressing mutated *ARSB* cDNA.

#### **SDS-PAGE and Western blot analysis**

Proteins were subjected to SDS-PAGE (12.5% polyacrylamide) and electrophoretically transferred onto an Immobilon-P Transfer Membrane (Millipore, Billerica, Massachusetts, USA). About 30 µg of protein extract were loaded per lane. Western blots were performed as described elsewhere [25]. The primary antibody was a polyclonal sheep anti-human recombinant 4-sulfatase IgG. The secondary antibody was a polyclonal rabbit anti-sheep peroxidase-conjugated IgG (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany). The detection reaction was performed by incubating the membrane in a luminol solution (100mM Tris-HCl pH 9, coumaric acid 0.2 mM, luminol 1.25 mM and 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) for 2 min at RT. The membrane was exposed to autoradiography films (Hyperfilm™ ECL High performance chemiluminescence film, Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK). Quantification of the bands was performed with The Discovery Series Quantity One 1-D Analysis Software (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) by measuring the relative intensity of western blot bands and subtracting the intensity of the background.

#### **Subcellular localization of 4-sulfatase in fibroblasts from MPS VI patients**

Fibroblasts were cultured on 13 mm coverslips in 12-well plates at 80-90% confluence. Cells were rinsed with 10% PBS pre-heated at 37°C and fixed for 15 minutes at RT with 3% paraformaldehyde in 0.1 M PB and 60 mM saccharose. After fixation, cells were washed in PBS Gly (1% PBS and 20 mM glycine). Cells were then treated with a permeabilization and blocking solution (0.05% w/v Triton X-100, 1% w/v BSA in PBS Gly) for 10 minutes at 37°C and then washed again. The sheep antibody against 4-sulfatase was used as a primary antibody. The lysosomes were labeled with the mouse anti-human Lamp-2 monoclonal antibody H4B4 (Developmental Studies Hybridoma Bank, University of Iowa, Department of Biological Sciences, Iowa City, IA, [www.uiowa.edu/~dshbwww](http://www.uiowa.edu/~dshbwww)), which is known to recognize the monkey Lamp-2 of COS-7 cells [26]. Primary antibodies were diluted in blocking solution at 1/75 for anti-ARSB and 1/100 for H4B4. For secondary antibodies we used donkey FITC anti-sheep IgG (Jackson Immunoresearch Laboratories, Inc., West Prove, PA, USA) and goat AlexaFluor® 660 anti-mouse IgG from Molecular Probes (Invitrogen). Mounting medium was Mowiol 4-88 (Calbiochem, Merck Biosciences, Darmstadt, Germany). Images were captured with an Olympus Fluoview FV300 confocal microscope and analyzed with the Fluoview FV500 image software. All experiments were repeated at least three times to ensure reproducibility. Autofluorescence and secondary antibody control tests were performed.

### 3D molecule visualization

Mutated amino acids were located on a 3D ARSB protein graphic using the RasMol v2.7.3.1 software ([www.openrasmol.org](http://www.openrasmol.org), Figure 1).

## RESULTS

### Studies of nonsense-mediated RNA decay

In a previous paper we reported several *ARSB* mutations that generated premature termination codons (PTC) [23]. Mutations c.899\_1142del (genomic deletion of exon 5), c.1142+2T>A (exon 5 skipping), c.1143-1G>C (exon 6 skipping), c.1143-8T>G (exon 6 skipping), c.427delG (frameshift in exon 2) and c.966C>A (p.W322X) were candidates for inducing transcript degradation by the nonsense-mediated mRNA decay (NMD) mechanism. For some of these mutations, preliminary results suggesting that NMD had taken place were presented. In the present work we analysed the effect of cycloheximide (CHX), a well-known inhibitor of protein synthesis and therefore, of NMD, on ML2, ML3, ML4, ML9f (father of patient ML9) and ML16 fibroblasts, to confirm the NMD process (Figure 2).

The c.1143-1G>C allele was present in patients ML3 and ML16 together with the missense mutations p.R160Q and p.S240F, respectively. As shown in Figure 2A, the lower band, which corresponds to the skipping of exon 6 due to a splice site mutation, showed a clear increase in intensity upon treatment with 500 µg/ml or 1000 µg/ml CHX, both at 8h and 12 h. For example, for patient ML3, the intensity ratio of the lower band with respect to the higher one changes from 0.07:1 to 0.2:1 after 8h of CHX treatment at 500 µg/ml.

In patients ML2 (homozygous for c.1143-8T>G) and ML4 (c.427delG/p.W322X), both alleles are assumed to be targets of the NMD process. Thus, amplification of the *GAPDH* gene by PCR multiplex was performed for comparison. After CHX treatment (500 µg/ml or 1000 µg/ml, 8h or 12h), there is a clear increase in the ratio *ARSB*:*GAPDH* for both patients in all conditions (Figures 2B and 2C). For example, the *ARSB*:*GAPDH* ratio for patient ML4 (500µg/ml, 8h) rose from 0.02:1 to 0.4:1. Upon specific digestion for c.427delG in patient ML4, the CHX-mediated mRNA increase took place for both alleles (lower panel).

Finally, weak RNA recovery was observed for the sample from the father of patient ML9, ML9f (c.1142+2T>A/+), only after 16 hours of CHX incubation and overloading the gel (Figure 2D).

### Expression of wild-type and mutated 4-sulfatase alleles in COS-7 cells

In order to evaluate the enzyme activity of 4-sulfatase proteins bearing the amino acid changes p.L82R, p.Y138C, p.S240F, p.G308R, p.P313A, p.C447F, p.L472P, p.V358M and p.S384N, COS-7 cells were transfected with the corresponding mutated cDNAs.

The mutations were expressed in their haplotype context, concerning the two polymorphic variants p.V358M (rs1065757, c.1072G>A, exon 5) and p.S384N (rs25414, c.1151G>A, exon 6), as this could be responsible for some degree of variation in enzyme activity. For the sake of clarity, the haplotypes will be described as GG, GA, AG, and AA, referring to the nucleotide present in positions c.1072 and c.1151, respectively. The haplotype context for patients bearing the p.L82R, p.Y138C and p.P313A substitutions was GG, and mutations p.S240F, p.C447F and p.L472P were in an AG chromosome. In the case of mutation p.G308R, since the phase was unknown, it was expressed in the two possible haplotype contexts for this patient: GG or GA. Additionally, for the cases in which the haplotype was different from the most active combination (GG), the mutant alleles were also expressed in this context.

For the wild-type ARSB protein with the GG haplotype, the absolute corrected values of activity ranged between 1368 and 2898 nmol/h-mg of protein. The haplotype combination AG showed 70% ARSB activity compared to that of the GG haplotype. The activity went down to 57% in the GA haplotype and to 16% in the AA combination. In comparison, all the analyzed mutations showed very low or negligible 4-sulfatase activity (Figure 3).

### **Western blot analysis**

The amount of protein and the ratio between precursor and mature forms were analysed for wild type (bearing the four haplotypes) and mutant alleles by western blot. Examples of these results are shown in Figure 4A. In figure 4B, the mean values of the total amount of protein of the different constructs (from 3 experiments) were compared to that of the WT construct bearing the same haplotype, arbitrarily fixed as 100%. The other WT constructs showed a decrease in the protein produced ranging from about 78% (GA) to 55% (AA). All the mutant constructs produced ARSB protein, although differences in the total amount of protein were observed. The ratio between the precursor and mature forms of the enzyme was also analysed for each construct (Figure 4C). While the WT-GG showed 40% of the mature protein, this percentage decreased to about 30% for the WT-GA construct, 23% for the WT-AG, and 10% for the WT-AA. Regarding the mutant constructs, the amount of the mature form was low. Some of them presented a relative quantity of mature protein similar to that of the WT-AA, while for mutations p.L82R (GG), p.G308R (GG and GA), and p.C447F (AG), the amount of mature protein was negligible.

### **Subcellular localization of ARSB in primary fibroblasts**

The subcellular localization of ARSB in human control fibroblasts was compared to that in MPS VI patients' fibroblasts by indirect immunofluorescence (Fig. 5). Only primary cell lines from patients ML2 (c.1143-8T>G; c.1143-8T>G), ML3 (p.R160Q, c.1143-1G>C), ML4 (c.427delG, p.W322X), ML5 (p.L82R; p.L82R) and ML16 (p.S240F, c.1143-1G>C) were available. The two wild-type samples correspond to individuals homozygous for GG and AG haplotypes of the

p.V358M and p.S384N polymorphisms, respectively. Lamp2 was used as an endogenous marker of late endosomes and lysosomes. ARSB co-localized with Lamp2 in wild-type fibroblasts. No differences were observed between GG and AG control fibroblasts. For the mutant fibroblasts, a reduction in the co-localization signal was observed in all cases. However, the results seem to indicate that in all cases at least some of the protein reaches the lysosome.

## DISCUSSION

In a former study [23] we presented the mutational analysis of the *ARSB* gene in 12 Spanish and 4 Argentinean MPS VI patients. In the present study we present the characterization of several of these mutations at different levels.

At the RNA level we analyzed the alleles for which previous data suggested targeting by NMD. This mechanism is known to cause the degradation of mRNA bearing a premature termination codon (PTC) in a position upstream of 50 nt before the last exon-exon junction [27]. However, because there are exceptions to this rule ([28] and reference therein) and exceptions are not usually predictable, it is advisable to confirm that an mRNA is an NMD target [29]. In this study, the CHX treatment showed that all mutations tested (c.899\_1142del, c.1142+2T>A, c.1143-1G>C, c.1143-8T>G, c.427delG and p.W322X) induced the NMD process. In all cases, the levels of PTC-containing mRNA were seriously diminished (to about 5% of the wild-type, when measurable), consistent with the reported range of 5-25 % of the PTC-free mRNA level [29]. Upon treatment with CHX, all mutant RNAs show a clear recovery, as expected for NMD-targeted transcripts.

In order to confirm the pathogenicity of the alleles bearing missense mutations, they were expressed in COS-7 cells and the mutant enzymes were characterized. Also, two polymorphic sites were analysed, independently and together with the mutations.

Several exonic polymorphisms have been described in the *ARSB* gene: p.V358M (rs1065757; [30]), p.V376M (rs17220759; [2]), p.P397P (rs25413; [31]), p.I114I, p.L124L, p.G324G [13], and p.L82L and p.Y505Y, recently reported by Karageorgos et al. [20], as well as the change p.S384N (rs25414; [10]) which was considered to be a pathogenic mutation when first reported. Among the exonic *ARSB* polymorphisms, the two that correspond to missense changes, p.V358M and p.V376M have been expressed in a different expression system, CHO cells [19, 20]. p.V376M showed equivalent enzymatic activity both for the valine and the methionine alleles. Surprisingly, for p.V358M, the methionine-bearing enzyme in this position showed only 42% of *ARSB* activity compared to the valine-bearing enzyme. In the present study, we also found reduced activity for the p.358M allele although to a lesser extent (70%).

On the other hand, p.S384N has been regarded as a disease-causing mutation since it was first reported by Voskoboeva et al. in homozygosity [10], and has been associated with rapid onset and

severe phenotype in MPS VI. No expression data are available. Karageorgos et al. [20] described another homozygous patient and two other patients who were compound heterozygous for this mutation. However, besides these findings where p.S384N was found as the only change, there are several cases in which p.S384N was found in a double mutant allele together with p.R315Q [10], and in the previously described Argentinean patient ML14 [23]. The expression results of the present study showed that the p.384N allele has reduced activity (57%). Moreover, when this change is present together with the p.358M substitution (AA allele), it results in a residual activity of 16%. Also, a clear reduction in the amount of mature protein is observed in Western blots for this allele. Additionally, the p.S384N appears as a polymorphic variant in the Central European [CEU] panel of the HapMap project [32] and was also shown to be polymorphic, with a frequency of 0.07 in the Spanish control population [23]. Taking all these data into account, it is difficult to decide whether the p.S384N variant is a disease-causing mutation or not. It might be a low penetrant allele that causes disease depending on other factors such as the haplotypic context, variants in other genes or environmental factors.

For these reasons, we expressed the mutant alleles in the haplotype context (for p.V358M and p.S384N) found in the patients (when known). In the cases in which phases could not be established, the alleles were expressed in all possible contexts.

Mutations p.L82R, p.Y138C, p.S240F, p.G308R, p.P313A, p.C447F and p.L472P showed a null or very low level of activity independently of the haplotype for the polymorphisms in the cases in which more than one haplotype context was tested. However, slight differences were observed for the amount of protein and, particularly, for the ratio between precursor and mature protein produced by the different constructs. Thus, for example, mutations p.L82R, p.G308R and p.C447F (the latter in the AG context), seem to have a stronger effect on the maturation of the protein.

Mutations p.L82R, p.Y138C, p.S240F, p.G308R, p.C447F and p.L472P did not involve any amino acids defined by the consensus sequences CTPSR (residues 91-95 in ARSB) and GKWHLG (residues 144-149) that are conserved within the human sulfatase family [33]. However, mutation p.S240F is located close to one of the amino acids of the catalytic core, H242, as shown by localization of mutated amino acids in the 3D model of the molecule (Figure 1). A potential impact on the interaction of the mutated enzyme with the substrate can be assumed. p.Y138C is located very near to the second consensus sequence of the sulfatase family, which some authors have extended to residues 137-147 [34], so this amino acid may play a catalytic role. p.G308R is also located close to the catalytic residues Asp300 and Asn301. Mutations p.C447F and p.L472P are located close to the protein surface and their interference with the ARSB function remains unclear, along with the general disturbance in the tertiary structure assumed to be produced by changes in amino acids such as proline or cysteine. A different missense mutation at position p.447 has been found recently [20]. Finally, mutation p.L82R may be in a relevant region since a mutation (p.D83Y) was reported in the neighboring amino acid residue [20].

In summary, we show the effect of all the mutations, either on RNA stability/integrity, on the maturation of the protein or on enzyme activity. The results confirm that all these changes found in the MPS VI patients are, indeed, disease-causing mutations. The controversial p.S384N change has been found in our series of patients always together with a pathogenic change in the same allele. These data, together with the expression results, support the hypothesis that it is a non pathogenic polymorphism. However, this question remains open since other authors have described a few patients bearing alleles with only this change. It might be considered a low penetrant allele, able to cause disease depending on different genetic or environmental factors.

### **ACKNOWLEDGEMENTS**

The authors are grateful to R. Rycroft for revising the English. We would like to thank Josep Jarque for the enzymatic measurements and Mónica Cozar for her technical support with western blotting. We are indebted with Raquel García and Nieves Hernández from the Serveis Científicotècnics UB for their assistance with confocal microscopy. Financial support was provided by CICYT (SAF2003-00386 and SAF2006-12276) and FIS Redes Temáticas, REDEMETH G03/054, PI051343 and PI051182) and AGAUR (2005SGR00848).

## REFERENCES

- [1] Kobayashi T, Honke K, Jin T, Gasa S, Miyazaki T, Makita A. Components and proteolytic processing sites of arylsulfatase B from human placenta. *Biochim Biophys Acta.* 1159 (1992) 243-7.
- [2] Wicker G, Prill V, Brooks D, Gibson G, Hopwood J, von Figura K, Peters C. Mucopolysaccharidosis VI (Maroteaux-Lamy syndrome). An intermediate clinical phenotype caused by substitution of valine for glycine at position 137 of arylsulfatase B. *J Biol Chem.* 266 (1991) 21386-91.
- [3] Jin WD, Jackson CE, Desnick RJ, Schuchman EH. Mucopolysaccharidosis type VI: identification of three mutations in the arylsulfatase B gene of patients with the severe and mild phenotypes provides molecular evidence for genetic heterogeneity. *Am J Hum Genet.* 50 (1992) 795-800.
- [4] Litjens T, Morris CP, Robertson EF, Peters C, von Figura K, Hopwood JJ. An N-acetylgalactosamine-4-sulfatase mutation delta G238 results in a severe Maroteaux-Lamy phenotype. *Hum Mutat.* 1 (1992) 397-402.
- [5] Litjens T, Brooks DA, Peters C, Gibson GJ, Hopwood JJ. Identification, expression, and biochemical characterization of N-acetylgalactosamine-4-sulfatase mutations and relationship with clinical phenotype in MPS-VI patients. *Am J Hum Genet.* 58 (1996) 1127-34.
- [6] Arlt G, Brooks DA, Isbrandt D, Hopwood JJ, Bielicki J, Bradford TM, Bindloss-Petherbridge CA, von Figura K, Peters C. Juvenile form of mucopolysaccharidosis VI Maroteaux-Lamy syndrome. A C-terminal extension causes instability but increases catalytic efficiency of arylsulfatase B. *J Biol Chem.* 269 (1994) 9638-43.
- [7] Isbrandt D, Arlt G, Brooks DA, Hopwood JJ, von Figura K, Peters C. Mucopolysaccharidosis VI Maroteaux-Lamy syndrome: six unique arylsulfatase B gene alleles causing variable disease phenotypes. *Am J Hum Genet.* 54 (1994) 454-63.
- [8] Isbrandt D, Hopwood JJ, von Figura K, Peters C. Two novel frameshift mutations causing premature stop codons in a patient with the severe form of Maroteaux-Lamy syndrome. *Hum Mutat.* 7 (1996) 361-3.
- [9] Voskoboeva E, Isbrandt D, von Figura K, Krasnopol'skaya X, Peters C. Four novel mutant alleles of the arylsulfatase B gene in two patients with intermediate form of mucopolysaccharidosis VI (Maroteaux-Lamy syndrome). *Hum Genet.* 93 (1994) 259-64.
- [10] Voskoboeva E, Krasnopol'skaia KD, Peters K, von Figura K. Identification of mutations in the arylsulfatase B gene in Russian mucopolysaccharidosis type VI patients. *Genetika.* 36 (2000) 837-43.

- [11] Simonaro CM, Schuchman EH. N-acetylgalactosamine-4-sulfatase: identification of four new mutations within the conserved sulfatase region causing mucopolysaccharidosis type VI. *Biochim Biophys Acta.* 1272 (1995) 129-32.
- [12] Villani GR, Balzano N, Di Natale P. Two novel mutations of the arylsulfatase B gene in two Italian patients with severe form of mucopolysaccharidosis. *Mutation in brief* 127. *Hum Mutat.* 11 (1998) 410.
- [13] Villani GR, Balzano N, Vitale D, Saviano M, Pavone V, Di Natale P. Maroteaux-lamy syndrome: five novel mutations and their structural localization. *Biochim Biophys Acta.* 1453 (1999) 185-92.
- [14] Wu JY, Yang CF, Lee CC, Chang JG, Tsai FJ. A novel mutation (Q239R) identified in a Taiwan Chinese patient with type VI mucopolysaccharidosis (Maroteaux-Lamy syndrome). *Hum Mutat.* 15 (2000) 389-90.
- [15] Yang CF, Wu JY, Lin SP, Tsai FJ. Mucopolysaccharidosis type VI: Report of two Taiwanese patients and identification of one novel mutation. *J Formos Med Assoc.* 100 (2001) 820-3.
- [16] Petry MF, Dieter T, Burin M, Giugliani R, Leistner S. Identification of a novel mutation in the ARSB gene that is frequent among Brazilian MPS VI patients. *Genet Test.* 7 (2003) 347-9.
- [17] Petry MF, Nonemacher K, Sebben JC, Schwartz IV, Azevedo AC, Burin MG, De Rezende AR, Kim CA, Giugliani R, Leistner-Segal S. Mucopolysaccharidosis type VI: Identification of novel mutations on the arylsulphatase B gene in South American patients. *J Inherit Metab Dis.* 286 (2005) 1027-34.
- [18] Karageorgos L, Harmatz P, Simon J, Pollard A, Clements PR, Brooks DA, Hopwood JJ. Mutational analysis of mucopolysaccharidosis type VI patients undergoing a trial of enzyme replacement therapy. *Hum Mutat.* 23 (2004) 229-33.
- [19] Karageorgos L, Brooks DA, Harmatz P, Ketteridge D, Pollard A, Melville EL, Parkinson-Lawrence E, Clements PR, Hopwood JJ. Mutational analysis of mucopolysaccharidosis type VI patients undergoing a phase II trial of enzyme replacement therapy. *Mol Genet Metab.* 90 (2007) 164-70.
- [20] Karageorgos L, Brooks DA, Pollard A, Melville EL, Hein LK, Clements PR, Ketteridge D, Swiedler SJ, Beck M, Giugliani R, Harmatz P, Wraith JE, Guffon N, Leao Teles E, Sa Miranda MC, Hopwood JJ. Mutational analysis of 105 mucopolysaccharidosis type VI patients. *Hum Mutat.* 28 (2007) 897-903.
- [21] Brooks DA, Gibson GJ, Karageorgos L, Hein LK, Robertson EF, Hopwood JJ. An index case for the attenuated end of the mucopolysaccharidosis type VI clinical spectrum. *Mol Genet Metab.* 853 (2005) 236-8.
- [22] Dou W, Gu X, Peng C, Zheng J, Chen J, Zhang W, Huang S, Sheng HZ. Two novel mutations of the arylsulfatase B gene in a Chinese MPS VI child undergoing bone marrow transplantation therapy. *Clin Chim Acta.* 374 (2006) 171-2.

- [23] Garrido E, Chabás A, Coll MJ, Blanco M, Domínguez C, Grinberg D, Vilageliu L, Cormand B, Identification of the molecular defects in Spanish and Argentinian mucopolysaccharidosis VI (Maroteaux-Lamy syndrome) patients, including 9 novel mutations. *Mol Genet Metab.* 92 (2007) 122-130.
- [24] Baum H, Dogson KS, Spencer B, The assay of arylsulphatases A and B in human urine. *Clin Chim Acta.* 4 (1959) 453-455.
- [25] Montfort M, Garrido E, Hopwood JJ, Grinberg D, Chabas A, Vilageliu L. Expression and functional characterization of human mutant sulfamidase in insect cells. *Mol Genet Metab.* 83 (2004) 246-51.
- [26] Shen B, Orlow SJ. The ocular albinism type 1 gene product is an N-glycoprotein but glycosylation is not required for its subcellular distribution. *Pigment Cell Res.* 14 (2001) 485-90.
- [27] Nagy E, Maquat LE. A rule for termination-codon position within intron-containing genes: when nonsense affects RNA abundance. *Trends Biochem Sci.* 23 (1998) 198-9.
- [28] Holbrook JA, Neu-Yilik G, Hentze MW, Kulozik AE. Nonsense-mediated decay approaches the clinic. *Nat Genet.* 36 (2004) 801-8.
- [29] Kuzmiak HA, Maquat LE. Applying nonsense-mediated mRNA decay research to the clinic: progress and challenges. *Trends Mol Med.* 12 (2006) 306-16.
- [30] Jin WD, Desnick RJ, Schuchman EH. A common polymorphism in the human arylsulfatase B (ARSB) gene at 5q13-q14. *Nucleic Acids Res.* 19 (1991) 4305.
- [31] Schuchman EH, Jackson CE, Desnick RJ. Human arylsulfatase B: MOPAC cloning, nucleotide sequence of a full-length cDNA, and regions of amino acid identity with arylsulfatases A and C. *Genomics.* 6 (1990) 149-58.
- [32] Thorisson GA, Smith AV, Krishnan L, Stein LD. The International HapMap Project web site. *Genome Res.* 15 (2005) 1592-3.
- [33] Bond CS, Clements PR, Ashby SJ, Collyer CA, Harrop SJ, Hopwood JJ, Guss JM. Structure of a human lysosomal sulfatase. *Structure.* 5 (2007) 277-89.
- [34] Hanson SR, Best MD, Wong CH. Sulfatases: structure, mechanism, biological activity, inhibition, and synthetic utility. *Angew Chem Int Ed Engl.* 43 (2004) 5736-63.

## FIGURE LEGENDS

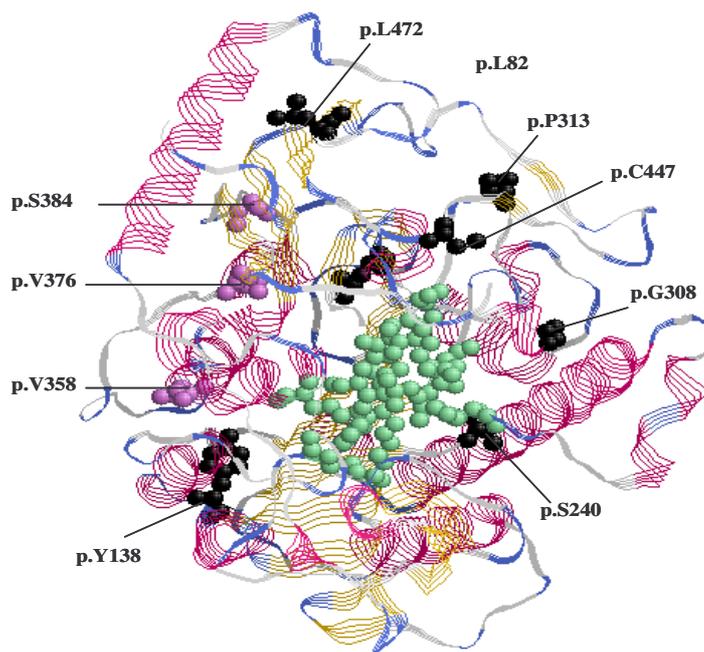
**Figure 1.** 3-D model of the ARSB protein showing the localization of mutated amino acids analyzed in this study (represented as solid spheres; black for pathogenic mutations and violet for non-synonymous polymorphisms). Alpha helices are colored in red, beta sheets in yellow, turns are blue and all the other residues are depicted in white. Green: central motives involving the catalytic core of ARSB: Asp53, Asp54, FGly91, Arg95, Lys145, His147, His242, Asn301, Asp300, Lys318.

**Figure 2.** Effect of cycloheximide (CHX) treatment on skin fibroblasts of patients bearing mutations capable of inducing RNA degradation by the mechanism of nonsense-mediated RNA decay (NMD). These alleles are indicated (\*). Eight-hundred ng of cDNA were used to amplify an ARSB fragment comprising exon 4 to exon 8 (809 bp) and 10 µl of the resulting PCR were run on a 3% agarose gel. a) ML3 and ML16 patients (738 bp for the c.1143-1G>C allele lacking exon 6). b) ML2 patient (738 bp for the c.1143-8T>C allele also lacking exon 6). GAPDH was amplified as a control (420 bp). c) Upper panel: ML4 patient (a fragment of 809 bp was obtained for both alleles). GAPDH was amplified as a control (420 bp). Lower panel: Digestion with BslI allowing the distinction of the two alleles (p.W322X or WT allele, undigested; c.427delG allele, digested). d) PCR fragments obtained after amplification of 1 µg ML9f cDNA (fragment length of 565 bp for cDNA lacking exon 5). Full PCR volume (25 µl) was loaded on a 2% agarose gel. M: molecular weight marker.

**Figure 3.** Activity of wild-type and mutated 4-sulfatase cDNA transiently expressed in COS-7 cells, represented as a percentage of wt (construct bearing the same haplotype). Bars represent the corrected mean (grey) and standard deviation (black) of the different replicates.

**Figure 4.** a) Western blot analysis of ARSB proteins from wild-type cDNA constructs and those bearing missense mutations expressed in COS-7 cells, showing the precursor (66 KDa) and mature form (43 KDa). COS-7 lane corresponds to untransfected cells. b) Total amount of ARSB protein from each construct compared to that of wild-type construct bearing the same haplotypic combination. Bars correspond to the mean of three different experiments. Standard deviations are indicated. c) Relative amount of precursor (grey) and mature form (black) for each construct.

**Figure 5.** Subcellular localization of ARSB by indirect immunofluorescence in two WT individuals (homozygous for two different haplotypic combinations) and five MPS VI-patient fibroblasts. Co-localization of ARSB and Lamp-2 (an endogenous marker of lysosomes and late endosomes) is shown in the overlay. Magnification: 600x



**Figure 1**

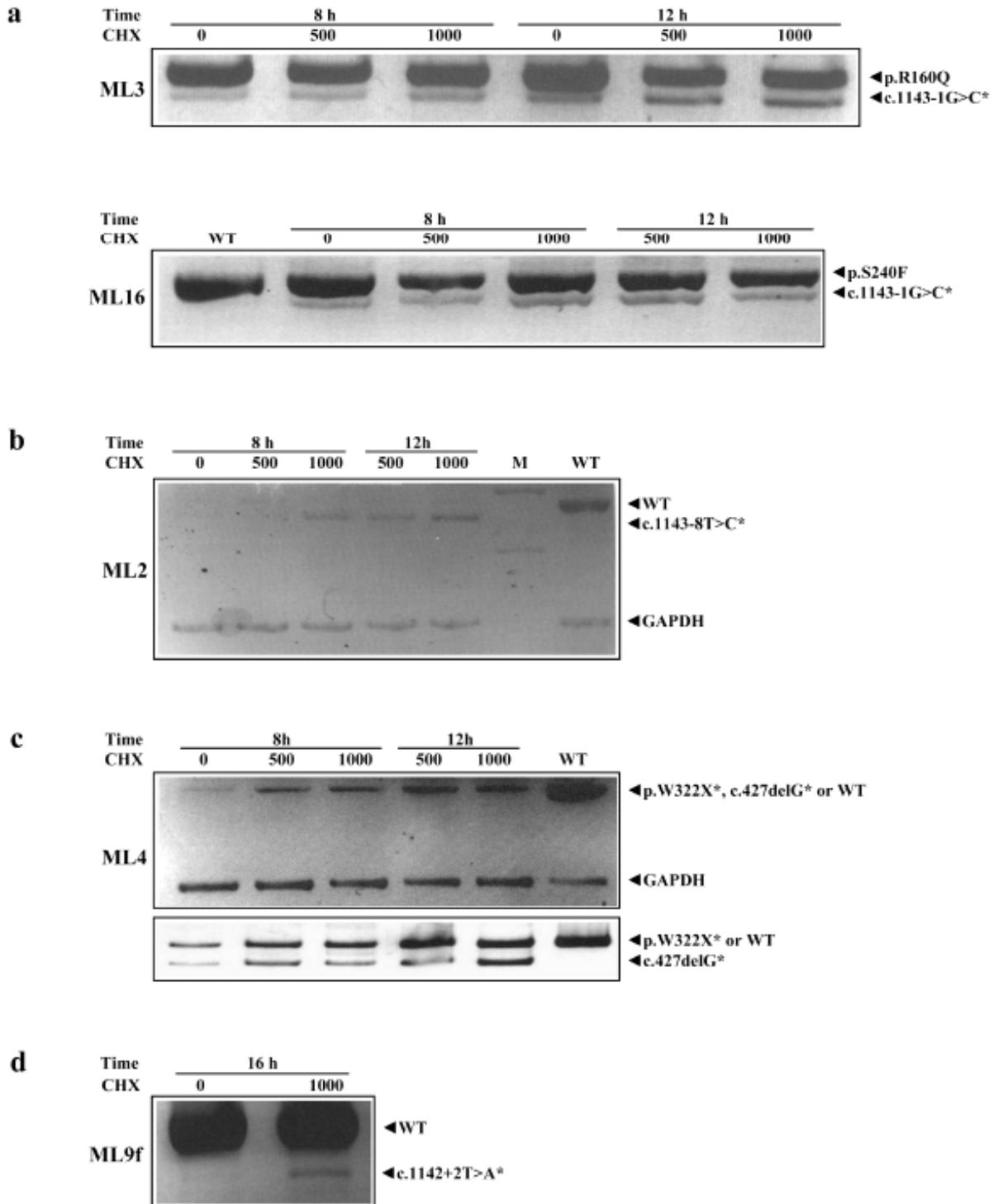


Figure 2

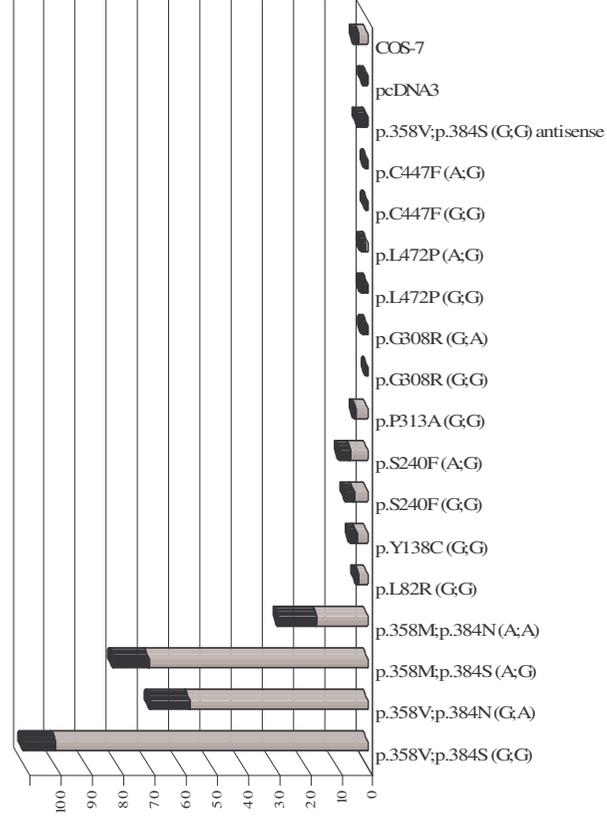


Figure 3



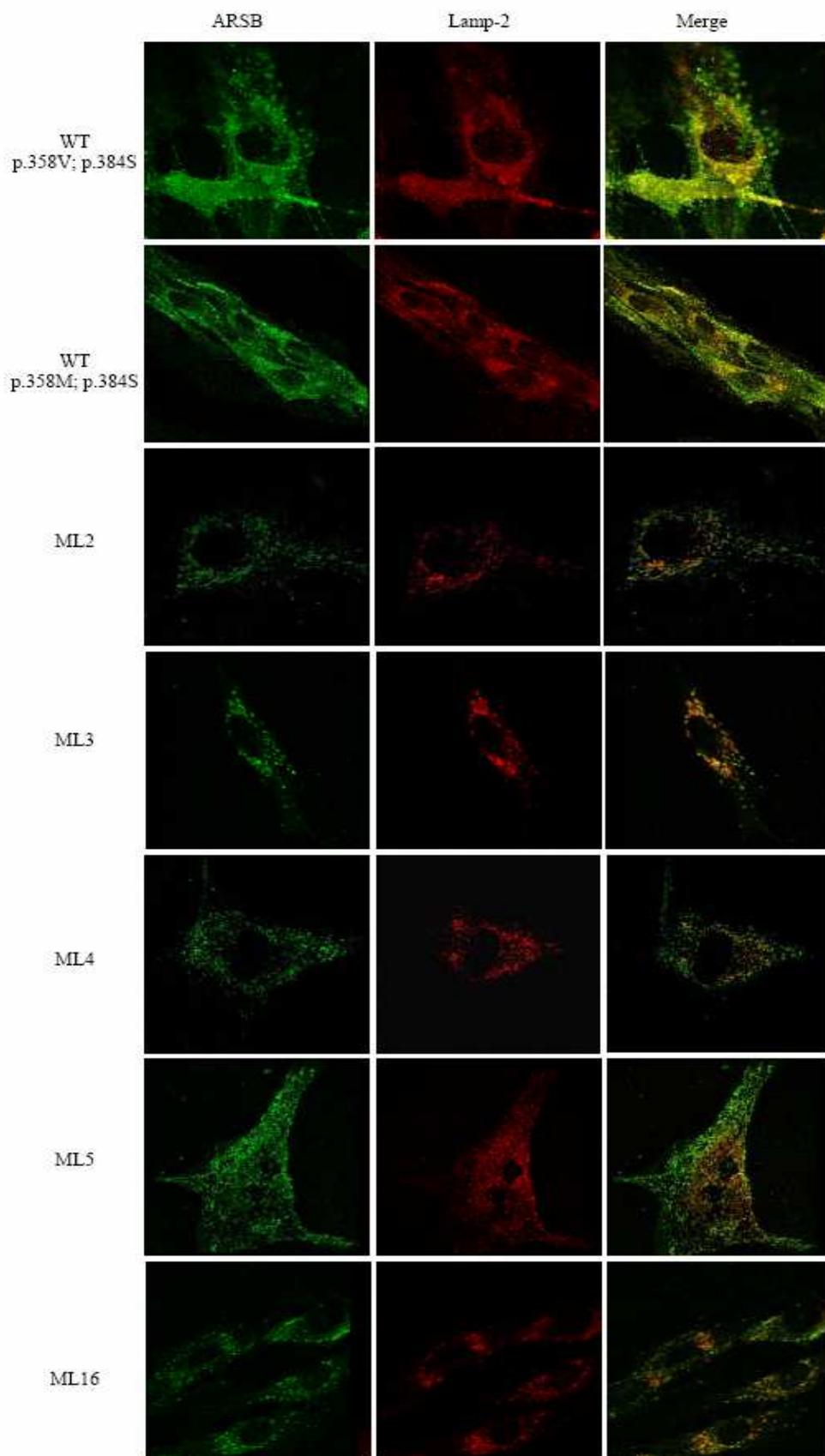


Figure 5

## 2. Material complementario al segundo artículo

### Sistema de expresión heteróloga

Como sistema de expresión en mamífero de las proteínas mutadas se eligieron células de riñón de mono verde COS-7, con las que nadie había trabajado antes en el síndrome de Maroteux-Lamy. El resto de autores habían utilizado células CHO-K1 de ovario de hámster (Litjens *et al.*, 1996; Bradford *et al.*, 2002; Karagerogos *et al.*, 2004 y 2007<sup>a</sup>; Brooks *et al.*, 2005) y células renales de ratón LTK (Wicker *et al.*, 1991; Arlt *et al.*, 1994; Isbrandt *et al.*, 1994).

Los estudios previos de prueba de sobreexpresión heteróloga del gen *ARSB* salvaje en COS-7, con extracción de proteínas al cabo de 24, 48 y 72 horas después de la transfección dieron como resultado valores equivalentes de actividad.

Dado que para la transfección con el sistema de Lipofectamina (Invitrogen) las células han de estar casi a plena confluencia, la recogida de las células al cabo de 48 horas se consideró un equilibrio entre las condiciones de confluencia del cultivo y el tiempo prudencial para permitir que la proteína heteróloga sintetizada pudiera ser procesada.

Las transfecciones fueron transitorias y se realizaron al menos por duplicado en cada caso. Se utilizó el vector GFP (*Green Fluorescent Protein*) como control de la eficiencia de transfección, aunque los datos de actividad que se ofrecen en este tipo de ensayos enzimáticos ya están corregidos respecto a la cantidad de proteína presente en el extracto celular.

En el capítulo de discusión (página 165) se ofrecen más detalles sobre el uso de células COS-7 como sistema heterólogo de expresión.

### Mutagénesis dirigida

Las mutaciones se crearon en el cDNA salvaje mediante un sistema de mutagénesis dirigida de uso común (*QuickChange XL Site-Directed Mutagenesis Kit* de Stratagene). Este sistema se basa en la amplificación completa del inserto clonado en un vector mediante el uso de dos largos cebadores complementarios que contienen la mutación deseada, y la posterior digestión de la cadena circular parental no mutada con un enzima sensible a la metilación (*DpnI*). La cadena circular mutada no digerida se transforma en células bacterianas DH5 $\alpha$  o XL-1.

En primer lugar se crearon los cDNAs de las cuatro posibles variantes haplotípicas para los cambios p.V358M y p.S384N y a continuación se introdujeron las mutaciones patológicas. Los cebadores de mutagénesis utilizados para tal fin se detallan en la Tabla 2-1 (página siguiente).

Los trabajos de clonación de fragmentos, colocación del inserto en posición invertida, mutagénesis dirigida seriada y secuenciación se llevaron a cabo primero en un vector de clonaje (pUC19), para después trasladar el inserto al vector de expresión definitivo (pcDNA3), a fin de evitar que se introdujeran mutaciones indetectables en el vector de expresión si las manipulaciones se llevaban a cabo en ese vector directamente. Además, la mutagénesis dirigida es más eficiente cuanto menor es el vector a amplificar.

**Tabla 2-1. Cebadores empleados en la mutagénesis dirigida**

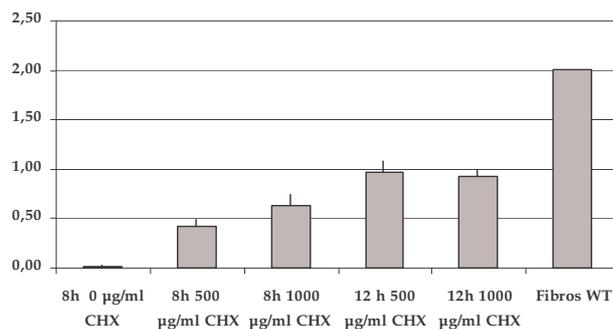
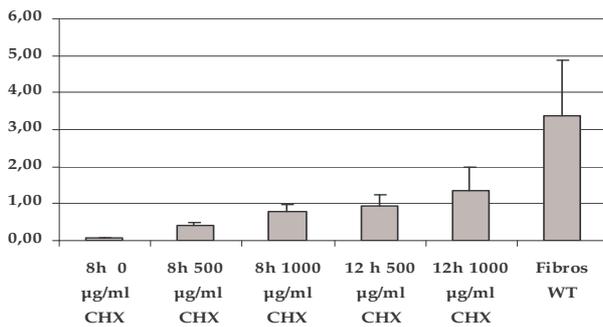
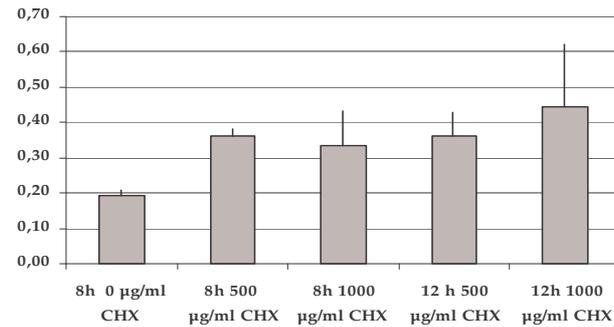
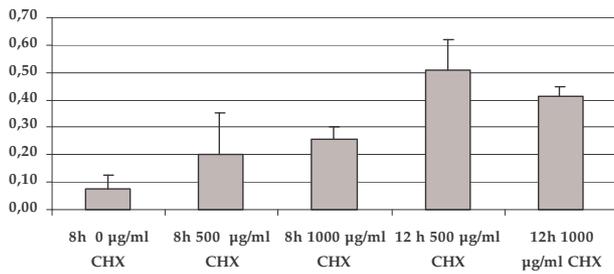
Mutación	Secuencia del cebador	N	Tm (°C)	%GC
p.L82R	F: 5'-GCGGGGTGCTCCGGGACAACACTACTAC-3' R: 5'-GTAGTAGTTGTCCCGGAGCACCCCGC-3'	26	78,5	65,4
p.Y138C	F: 5'-CCTAAAAGAAGCAGGTTGTA <sup>T</sup> ACTACCCATATGGT <sup>C</sup> CG-3' R: 5'-CGACCATATGGGTAGTACAACCTGCTTCTTTTAGG-3'	36	78,2	44,4
p.S240F	F: 5'-CCTTGCTCTCCAGTTTGTGCATGAGCCCC-3' R: 5'-GGGGCTCATGCACAAACTGGAGAGCAAGG-3'	29	78,8	58,6
p.G308R	F: 5'-GGCAGACTTTGGCAAGGGGTAATAACTGGCC-3' R: 5'-GGCCAGTTATTACCCCTTGCCAAAGTCTGCC-3'	31	78,9	54,8
p.P313A	F: 5'-GGTAATAACTGGCGCCTTCGAGGAAGAAAATGGAGC-3' R: 5'-GCTCCATTTTCTTCCTCGAAGGCGCCAGTTATTACC-3'	36	82,7	50
p.L472P	F: 5'-CCAAGACCCTCTGGCCCTTTGATATTGATCGG-3' R: 5'-CCGATCAATATCAAAGGGCCAGAGGGTCTTGG-3'	32	79,1	53,1
p.C447F	F: 5'-GCTACCCAGGCTTTGGTTACTGGTTCCC-3' R: 5'-GGGAACCAGTAACCAAAGCCTGGGTAGC-3'	30	78,8	53,3
p.V358M	F: 5'-GCTGCCAACACTCGTGAAGCTGGCCAGG-3' R: 5'-CCTGGCCAGCTTACGAGTGTGGCAGC-3'	28	80,2	64,3
p.S384N	F: 5'-CCATCAGTGAAGGAAACCCATCCCCAGAATTG-3' R: 5'-CAATTCTGGGGGATGGGTTTCCTTCACTGATGG-3'	33	79,2	51,5

El nucleótido desapareado se indica en negrita. F: *forward*; R: *reverse*. N: longitud del cebador (pb).  
Tm: temperatura de disociación del cebador.

### Tratamientos con cicloheximida

Las incubaciones de los cultivos celulares de fibroblastos de pacientes de MPS VI portadores de mutaciones susceptibles de provocar degradación del mRNA *ARSB* mediante el mecanismo de NMD se realizaron normalmente durante 8 y 12 horas con concentraciones de cicloheximida disuelta en el medio de cultivo de 500 o 1000 µg/ml. En el caso de la mutación c.238delG, no hubo evidencias consistentes de que la degradación de los transcritos revertiera con el tratamiento y se probaron concentraciones y tiempos mayores, sin que los resultados mejoraran. Los datos concretos de cuantificación de las bandas

de los geles de electroforesis tras la amplificación del cDNA tal como se explica en el artículo se encuentran en la Figura 2-1 (*página siguiente*). Como control se usó el alelo del paciente que no sufre NMD, el cual se distingue del alelo NMD por el tamaño diferencial del amplicón (en el caso del cambio c.1143-1G>C). Cuando no era posible la distinción por tamaño, o cuando los dos alelos del paciente eran susceptibles de sufrir NMD, se amplificó por PCR múltiple el gen *GAPDH* como control, con una concentración de cebadores 20 veces inferior a las utilizadas para amplificar el cDNA.



Paciente ML3 (c.1143-1G>C; p.R160Q)	Promedio alelo susceptible de NMD (c.1143-1G>C) respecto alelo sin NMD (p.R160Q)	Desv.
8 h 0 µg/ml CHX	0,074	0,052
8 h 500 µg/ml CHX	0,2	0,15
8 h 1000 µg/ml CHX	0,26	0,044
12 h 500 µg/ml CHX	0,51	0,11
12 h 1000 µg/ml CHX	0,44	0,03

Paciente ML16 (c.1143-1G>C; p.S240F)	Promedio alelo susceptible de NMD (c.1143-1G>C) respecto alelo sin NMD (p.S240F)	Desv.
8 h 0 µg/ml CHX	0,19	0,02
8 h 500 µg/ml CHX	0,36	0,02
8 h 1000 µg/ml CHX	0,33	0,1
12 h 500 µg/ml CHX	0,36	0,07
12 h 1000 µg/ml CHX	0,44	0,18

Paciente ML2 (c.1143-8T>C; c.1143-8T>C)	Promedio alelo susceptible de NMD (c.1143-8T>C) respecto GAPDH control	Desv.
8 h 0 µg/ml CHX	0,06	0,03
8 h 500 µg/ml CHX	0,42	0,06
8 h 1000 µg/ml CHX	0,8	0,17
12 h 500 µg/ml CHX	0,94	0,29
12 h 1000 µg/ml CHX	1,37	0,63
cDNA fibros WT	3,38	1,5

Paciente ML4 (c.427delG; p.W322X)	Promedio alelos susceptible de NMD (ambos) respecto GAPDH control	Desv.
8 h 0 µg/ml CHX	0,02	0,01
8 h 500 µg/ml CHX	0,42	0,07
8 h 1000 µg/ml CHX	0,63	0,1
12 h 500 µg/ml CHX	0,97	0,11
12 h 1000 µg/ml CHX	0,93	0,07
cDNA fibros WT	2,01	0

**Figura 2-1.** Cuantificación de la recuperación de mRNA tras el tratamiento con cicloheximida (CHX) en células de los pacientes ML2, ML3, ML4 y ML16. Se han ensayado distintos tiempos de incubación (8, 12 h) y concentraciones (0, 500, 1000 µg/ml) de cicloheximida. En el eje Y se indica el promedio de los cocientes obtenidos de dividir los valores de cuantificación de la banda correspondiente al alelo NMD de los valores del alelo sin NMD o el gen control. Uno de los genes cuantificados es el que aparece en el artículo (n=2).

### Medida de la actividad enzimática ARSB

De cada placa de células transfectadas se recogió un volumen final de células tripsinizadas y lavadas de 1 ml, del cual se reservaron 900  $\mu$ l para la valoración enzimática de la actividad y 100  $\mu$ l para los estudios de *western blot*.

Los estudios de medida de la actividad enzimática de la ARSB *in vitro* se llevaron a cabo en el Instituto de Bioquímica Clínica, en Barcelona, por el grupo de la Dra. Chabás.

El método utilizado fue el de la cuantificación espectrofotométrica del *p*-nitrocatecol producido por hidrólisis de un sustrato artificial de la arilsulfatasa B, el *p*-nitrocatecol sulfato (Sigma), según una modificación del método de Baum *et al.* (1959).

La especificidad de la ARSB por dicho sustrato se garantizó preparando la solución del sustrato a una concentración final de *p*-nitrocatecol sulfato 50 mM en tampón acetato de bario 0,01 M a pH de 6, a fin de inhibir la actividad de la arilsulfatasa A.

Los extractos celulares fueron resuspendidos en 1 ml de agua, después sonicados, y se realizó la determinación de la concentración de proteínas mediante el método de Lowry. La proteína se diluyó hasta una concentración adecuada para su valoración enzimática.

La incubación conjunta de 100  $\mu$ l de sustrato y 50  $\mu$ l de la enzima diluida se realizó a 37 °C por duplicado durante 30 y 90 minutos, en tubos separados para cada condición de tiempo. Al término de cada incubación la reacción se detuvo añadiendo 0,75 ml de NaOH 1N. Como blanco, se incubaron separadamente sustrato y enzima y se mezclaron con NaOH al

final de cada tiempo. La absorbancia se midió inmediatamente a  $\lambda=546$  nm. De los promedios de incubación para cada tiempo se restaron los blancos y se realizaron los siguientes cálculos:

$$X = \text{promedio } 30' - \text{blanco } 30'$$

$$Y = \text{promedio } 90' - \text{blanco } 90'$$

Z = valor de absorbancia teórica a tiempo cero mediante una estimación lineal de la absorbancia/tiempo con los valores X e Y.

$$A = \text{promedio de actividad en 1 hora} = Y - X - Z \times 0,2$$

$$\text{Actividad ARSB} = A \times 1547,7 \text{ (factor de la enzima) / concentración de proteína analizada (mg/ml) = nmols/h} \cdot \text{mg}$$

Por rutina y como control del buen estado del lisosoma y de la célula en general se midió también la actividad de la enzima lisosómica control  $\beta$ -hexosaminidasa, mediante un protocolo fluorimétrico específico usando el sustrato 4-MU-2-acetamida-2-deoxi- $\beta$ -glucopiranosido 3 mM en tampón citrato 0,5 M a pH 4,4.

A los valores de actividad obtenidos se les restó el valor de actividad ARSB endógena de las células COS-7 transfectadas con vector de expresión vacío. Los valores de actividad se pueden expresar también como porcentaje de la actividad de la proteína salvaje en el contexto haplotípico p.358V; 384S, que es el más activo.

En la Tabla 2-2 se detallan todos los promedios completos de las actividades enzimáticas (en el artículo sólo se publicó la gráfica de los valores por motivos de espacio, *ver página siguiente*). La mutación p.S240F se expresó cuando los estudios de expresión para las demás mutaciones ya estaban finalizados, y su actividad respecto a la proteína salvaje se ha calculado respecto a los valores de la proteína salvaje que se obtuvieron en ese momento (se detallan a pie de tabla).

.Tabla 2-2. Cuadro de actividades enzimáticas de mutaciones y polimorfismos en el gen ARSB

Mutación y entorno haplotípico		Actividad ARSB <sup>a</sup>	Actividad ARSB corregida <sup>b</sup>	% actividad ARSB respecto WT <sup>c</sup>	Actividad $\beta$ -hexaminidasa	Concentración de proteína <sup>d</sup>
p. 358V; 384S	Promedio (n=16)	2190,69	2141,73	100	1134,44	1,39
	Desviación	428,71	428,71	20,02	350,31	0,42
p.358V; 384N	Promedio (n=9)	1269,43	1220,47	56,99	1111,11	1,81
	Desviación	266,61	266,61	12,45	435,46	0,55
p.358M; 384N	Promedio (n=8)	401,68	352,71	16,47	1233,5	2,013
	Desviación	257,47	257,47	12,02	340,99	0,16
p.358M ; 384S	Promedio (n=6)	1549	1500,04	70,04	1081,8	1,57
	Desviación	237,81	237,81	11,10	435,86	0,349
p.L82R p.358V; 384N	Promedio (n=2)	108,8	59,84	2,79	1687	2,085
	Desviación	10,18	10,18	0,48	868,33	0,36
p.Y138C p.358V; 384S	Promedio (n=2)	123,10	74,14	3,46	1513,5	1,475
	Desviación	38,47	38,47	1,80	678,12	0,94
p.S240F * p.358V; 384S	Promedio (n=2)	30,15	18,55	4,46	1462,5	2,96
	Desviación	9,83	9,83	2,37	328,8	0
p.S240F * p.358M; 384S	Promedio (n=2)	28,6	17	0,28	5,58	3,105
	Desviación	9,9	9,9	0,16	3,25	0,16
p.P313A p.358V; 384S	Promedio (n=2)	129	80,04	3,74	1475	1,91
	Desviación	5,66	5,66	0,26	493,56	0,13
p.G308R p.358V; 384S	Promedio (n=3)	44	-4,96 <sup>e</sup>	-0,23 <sup>e</sup>	908,67	1,147
	Desviación	4,25	4,25	0,20	354,01	0,47
p.G308R p.358V; 384N	Promedio (n=2)	33,5	-15,46 <sup>e</sup>	-1,27 <sup>e</sup>	680,5	1,585
	Desviación	16,97	17	1,39	13,44	0,19
p.L472P p.358V; 384S	Promedio (n=2)	49,5	0,54	0,03	957	1,49
	Desviación	36,20	36,20	1,69	224,86	0,13
p.L472P p.358M;384S	Promedio (n=2)	57,8	8,84	0,59	725,5	1,355
	Desviación	17,68	17,68	1,18	125,16	0,19
p.C447F p.358V; 384S	Promedio (n=2)	51,45	2,49	0,12	995,5	1,69
	Desviación	2,19	2,19	0,10	521	0,14
p.C447F p.358M; 384S	Promedio (n=2)	24,15	-24,81 <sup>e</sup>	-1,65 <sup>e</sup>	673	1,78
	Desviación	6,86	6,86	0,46	28	0,24
p.358V; 384S antisentido	Promedio (n=6)	60,9	12	0,56	903,67	1,29
	Desviación	49,0	49	2,29	282,91	0,27
Control pcDNA3	Promedio (n=16)	48,96	0	0,0	1486	1,688
	Desviación	25,50	26	1,19	537	0,57
COS-7 sin transfector	Promedio (n=2)	59,25	-	2,77	1531	2,10
	Desviación	28,35	-	1,32	306,18	0,06
Fibroblastos control	Promedio (n=15)	468,99	-	21,90	10258,29	-
	Desviación	146,92	-	6,86	2103,29	-

<sup>a</sup> Actividades enzimáticas expresadas en nmoles/h· mg. n: número de réplicas. <sup>b</sup> Actividad enzimática resultante de restar el valor de actividad del control pcDNA3. <sup>c</sup> Porcentajes respecto proteína salvaje con el mismo entorno haplotípico o por defecto, en el entorno p.358V; 384S. <sup>d</sup> Concentración de proteína expresada en mg/ml. <sup>e</sup> Los valores corregidos de actividad negativos se expresaron como cero en el artículo. \* Valores corregidos respecto al promedio de actividad del control pcDNA3 de ese día ( $11,6 \pm 1,13$ ) y expresados respecto a los valores correspondientes de p.358V; 384S ( $427,15 \pm 50,28$ ) y p.358M; 384S ( $316,45 \pm 27,37$ ). Los valores de actividad de fibroblastos control fueron de  $110,9 \pm 20,36$  nmoles/h· mg, con n=2 en todos los casos.

Todas las mutaciones se expresaron en el contexto haplotípico p.358V; 384S, aunque algunas mutaciones tenían otro contexto haplotípico en el paciente con toda seguridad (como la p.S240F, p.C447F y la p.L472P, en el contexto p.358M; 384S) y en algún caso era dudosa al no haberse podido establecer la fase (p.G308R, en el contexto p.358V; p.384N o p.358M; 384S).

Los valores de actividad enzimática ARSB obtenidos por otros autores en los estudios de expresión de otras mutaciones pueden encontrarse en la Tabla 4-6 de la página 48.

### Estudios de *western blot*

Aunque las imágenes de *western blot* que se publican en el artículo fueron obtenidas siguiendo el protocolo explicado en el apartado de material y métodos del mismo, tuvieron que realizarse algunas modificaciones menores para aplicar ese protocolo al *western blot* realizado a partir de proteínas de fibroblastos de pacientes o para realizar algunas de las réplicas de la técnica que después se utilizaron para cuantificar la intensidad de las bandas (carga de 25 µg de proteína en vez de 30, pequeñas diferencias en el tiempo y el número de lavados, uso de anticuerpo primario a una concentración de 1:3000 en vez de 1:6000, o utilización de tampón TGH para la lisis celular (1% Tritón X-100, 10% glicerol, 150 mM NaCl, 50mM HEPES a pH 7,4), con agitación orbital a 4 °C durante 15 minutos y centrifugación otros 15 minutos a 4 °C antes de la desnaturalización de las muestras para su electroforesis en poliacrilamida).

Los datos de cuantificación de proteína de todos los *western blots* realizados sobre proteínas expresadas en células COS-7 se detallan en la Tabla 2-3 (página siguiente). Para la cuantificación de las bandas de *western blot* se usó el programa *Quantity One* (Biorad), que calcula intensidades y

normaliza en función del tamaño del área escogida; a dichos valores se les resta el valor de intensidad de un área representativa del fondo.

Los resultados gráficos de los valores de cuantificación expresados en la Tabla 2-3 que no se incluyen en el artículo se encuentran en la Figura 2-2 (ver página 112).

Se intentó repetidamente realizar *western blots* a partir de los fibroblastos de pacientes, pero los resultados que se obtuvieron no fueron buenos para su publicación. Ninguna de las modificaciones en el protocolo que funcionaba bien en el caso de las células COS-7 dio resultado en fibroblastos: ni la carga de más cantidad de proteína, ni los cambios en la solución de lisis de los extractos celulares, ni la eliminación del uso de tripsina en la obtención de los extractos celulares, ni las nuevas condiciones de los geles SDS-PAGE... Ni siquiera en el caso de los fibroblastos salvajes se apreciaba nítidamente la banda correspondiente a las proteínas precursora (66 KDa) y madura (43 KDa) de la ARSB (Figura 2-3, ver página 112).

Además, en el caso de fibroblastos procedentes de pacientes portadores de una o dos mutaciones que dan lugar a proteínas truncadas, tampoco se manifiestan claramente las bandas correspondientes a la proteína con el peso molecular teórico esperado, que se calculó con los programas *PeptideMass* y *Protein Mass Calculator*, los cuales arrojaron idénticos resultados de predicción: una masa molecular media de 59,7 KDa para la proteína salvaje (que concuerda con la observada en la realidad); 54,5 KDa para la proteína truncada debido a la falta del exón 5 (mutación c.1142+2T>A); 43,5 KDa para la proteína originada a partir de un transcrito sin exón 6 (mutaciones c.1143-1G>C y c.1143-8T>G); 13,8 KDa para la c.238delG; 20,2 KDa para la c.427delG y 35,8 KDa para la p.W322X.

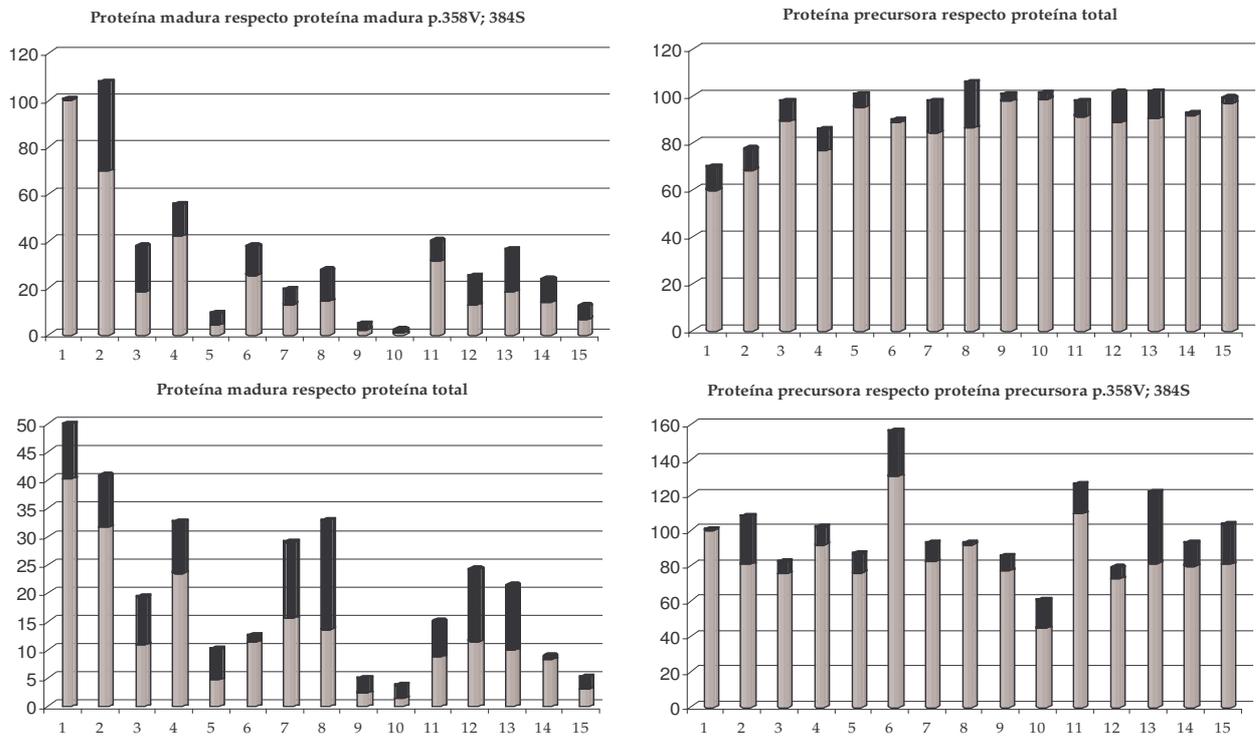
La correcta lisis celular y electroforesis del gel se comprobó mediante tinción Coomassie. Se secuenció el cDNA obtenido de diferentes fibroblastos salvajes para verificar que realmente no eran portadores de ninguna mutación

patogénica en el gen *ARSB*. En todos los *westerns* se añadía un carril cargado con proteína *ARSB* salvaje expresada en células COS-7 como control.

**Tabla 2-3. Cuadro de cuantificación de *western blot* de proteínas *ARSB* mutadas expresadas en células COS-7**

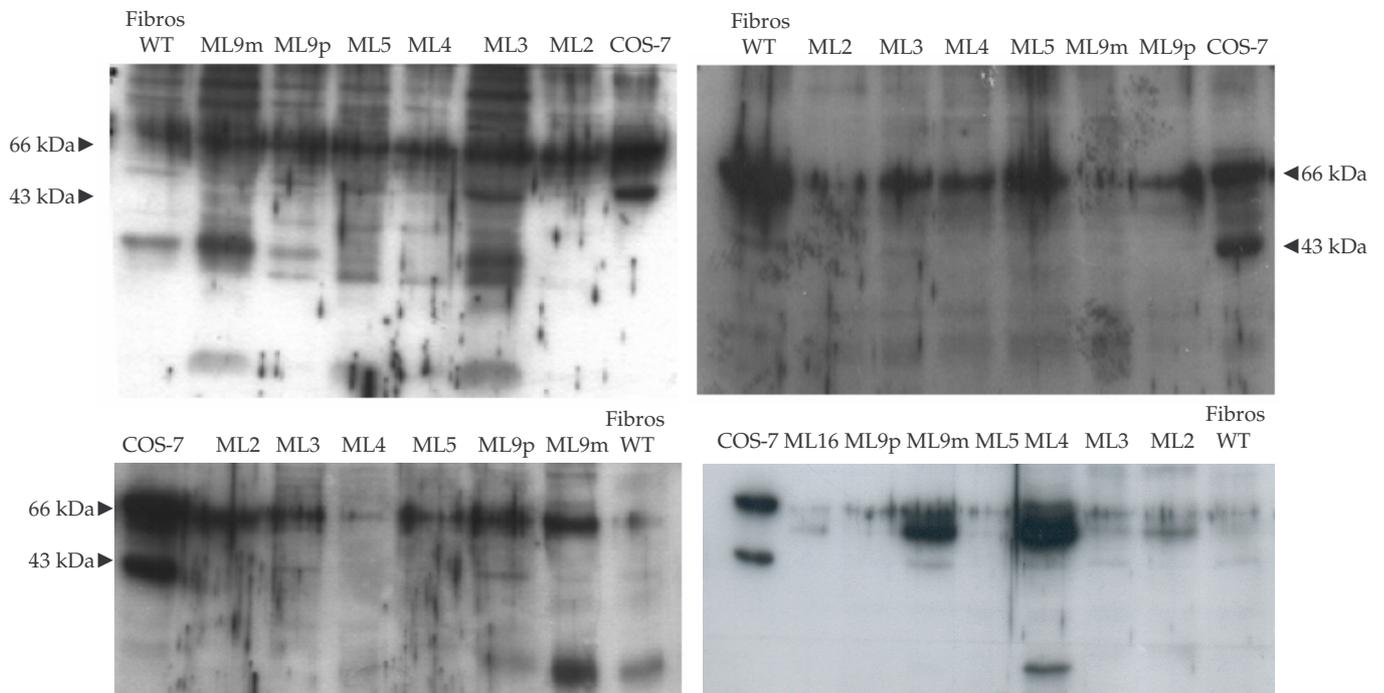
Mutación y entorno haplotípico		Proteína total respecto total p. 358V; 384S <sup>a</sup>	Proteína precursora respecto total <sup>b</sup>	Proteína madura respecto total <sup>b</sup>	Proteína precursora respecto precursora p. 358V; 384S <sup>c</sup>	Proteína madura respecto madura p. 358V; 384S <sup>c</sup>
p. 358V; 384S	Promedio (n=8)	100	59,85	40,15	100,00	100,00
	Desviación	0	9,65	9,65	0,00	0,00
p.358V; 384N	Promedio (n=3)	76,88	68,30	31,70	80,95	69,65
	Desviación	30,29	8,99	8,99	26,88	37,85
p.358M; 384N	Promedio (n=3)	54,88	89,08	10,92	75,84	18,54
	Desviación	10,06	8,29	8,29	6,43	19,11
p.358M ; 384S	Promedio (n=5)	67,86	76,47	23,53	91,77	41,93
	Desviación	14,32	9,01	9,01	9,86	13,30
p.L82R p.358V; 384S	Promedio (n=3)	46,61	95,25	4,75	75,90	4,24
	Desviación	10,06	5,28	5,28	10,62	4,71
p.Y138C p.358V; 384S	Promedio (n=3)	86,92	88,62	11,38	130,60	25,34
	Desviación	25,23	1,08	1,08	25,41	12,26
p.S240F p.358V; 384S	Promedio (n=2)	48,54	84,37	15,63	82,29	12,93
	Desviación	10,58	13,32	13,32	10,17	6,36
p.S240F p. 358M; 384S	Promedio (n=2)	53,90	86,41	13,59	91,79	14,48
	Desviación	3,78	19,22	19,22	1,10	12,88
p.G308R p.358V; 384S	Promedio (n=3)	45,95	97,69	2,31	77,07	2,10
	Desviación	7,51	2,57	2,57	8,13	2,34
p.G308R p.358V; 384N	Promedio (n=3)	23,77	98,66	1,34	44,70	0,70
	Desviación	3,83	2,32	2,32	15,82	1,22
p.P313A p.358V; 384S	Promedio (n=2/3)	66,50	91,24	8,76	109,45	31,62
	Desviación	0,84	6,12	6,12	16,63	8,18
p.L472P p.358V; 384S	Promedio (n=3)	47,89	88,58	11,42	72,42	12,58
	Desviación	11,88	12,73	12,73	6,33	12,44
p.L472P p.358M; 384S	Promedio (n=3)	69,39	90,16	9,84	81,285	18,38
	Desviación	27,71	11,46	11,46	40,14	17,95
p.C447F p.358V; 384S	Promedio (n=2)	54,70	91,75	8,26	79,775	13,63
	Desviación	20,29	0,50	0,50	12,78	9,79
p.C447F p. 358M; 384S	Promedio (n=2)	58,84	96,905	3,095	80,945	6,62
	Desviación	16,43	2,00	2,00	22,07	5,48

N: número de réplicas. <sup>a</sup> Proteína total: suma de los valores de precursora y madura. <sup>b</sup> Proteína precursora o madura respecto proteína total (precursora más madura) de la mutación correspondiente. <sup>c</sup> Comparación entre el valor de la proteína precursora o madura de cada mutación con la proteína precursora o madura del entorno enzimáticamente más activo (p. 358V; 384S).



**Figura 2-2.** Cuantificación de los *western blots* de proteínas ARSB mutadas expresadas en células COS-7. Eje Y: valores del promedio de cuantificación. Gris: promedio. Negro: desviación estándar.

- |                          |                            |                            |
|--------------------------|----------------------------|----------------------------|
| 1: p.358V; 384S          | 6: p.Y138C (p.358V; 384S)  | 11: p.P313A (p.358V; 384S) |
| 2: p.358V; 384N          | 7: p.S240F (p.358V; 384S)  | 12: p.L472P (p.358V; 384S) |
| 3: p.358M; 384N          | 8: p.S240F (p.358M; 384S)  | 13: p.L472P (p.358M; 384S) |
| 4: p.358M; 384S          | 9: p.G308R (p.358V; 384S)  | 14: p.C447F (p.358V; 384S) |
| 5: p.L82R (p.358V; 384S) | 10: p.G308R (p.358V; 384N) | 15: p.C447F (p.358M; 384S) |



**Figura 2-3.** *Western blots* de fibroblastos de pacientes de MPS VI. Diferentes réplicas de *western blots* de células de ML2 (c.1143-8T>G; c.1143-8T>G), ML3 (p.R160Q; c.1143-1G>C), ML4 (p.W322X; c.427delG), ML5 (p.L82R; p.L82R), ML9m (c.248delG; +), ML9p (c.1142+2T>A; +) y ML16 (p.S240F; c.1143-1G>C). El carril cargado con proteína ARSB p.V358; S384 sobreexpresada en COS-7 se utiliza como control de las bandas de las proteínas precursora y madura.

### Estudios de inmunofluorescencia indirecta

Se intentaron varias aproximaciones para estudiar la localización intracelular de las proteínas ARSB mutadas mediante inmunofluorescencia indirecta.

Los estudios previos habían indicado que el anticuerpo policlonal primario que detectaba la ARSB humana en los *western blots*, también servía para el marcaje de la ARSB *in vivo*. Si bien la detección de la ARSB endógena en células COS-7 era muy escasa o incluso no se detectaba en los *western blots* (ver página 103), en los cultivos celulares de COS-7 el marcaje de la proteína ARSB endógena *in vivo* era tan intenso que se juzgó imposible distinguir las células transfectadas de las no transfectadas por diferencias en la intensidad de fluorescencia. Se hicieron pruebas de marcaje de la ARSB en otros tipos celulares que no fueran de primates, como los fibroblastos embrionarios de ratón NIH 3T3 y los macrófagos de ratón RAW 264.7. Todas ellas exhibían un marcaje de la proteína endógena muy elevado, además de que eran costosas de transfectar eficientemente y su pequeño tamaño no las hacía demasiado idóneas para los estudios de microscopía.

Otra aproximación fue el intento de creación de una proteína de fusión entre la ARSB y la GFP, utilizando el vector de clonaje EGFP en la pauta de lectura correcta. El clonaje de la GFP en el extremo N-terminal de la ARSB (utilizando el codón de inicio de la GFP y fusionando la ARSB a 3' de la GFP) fue muy sencillo pero habida cuenta que las hidrolasas lisómicas requieren modificaciones post-traduccionales para su direccionalización al lisosoma y el corte proteolítico de sus primeros aminoácidos, no se consideró que la proteína de

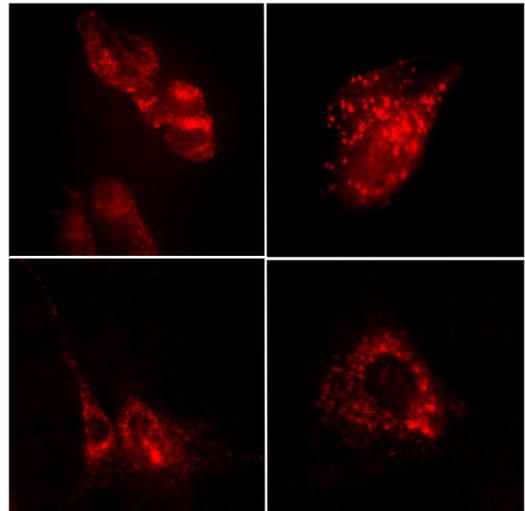
fusión resultante tuviera un comportamiento intracelular equivalente al de la ARSB salvaje. Los intentos de clonar la GFP en el extremo C-terminal de la ARSB (suprimiendo el codón de parada de traducción de la ARSB y fusionando la GFP con la ARSB en la pauta de lectura correcta) fueron infructuosos tras varios intentos.

Se probó también añadir un pequeño marcador o *tag* a la secuencia de la ARSB clonada, como por ejemplo un *tag* de *myc*, polihistidinas o hemaglutinina (HA) que después pudiera detectarse con un anticuerpo secundario unido a un fluorocromo. Los vectores portadores de tales *tags* no resultaron convenientes en cuanto a dianas adecuadas para el clonaje, y los intentos de clonación de la ARSB mediante amplificación con cebadores conteniendo la secuencia a añadir (intentando crear una gran inserción mediante mutagénesis dirigida) o fusión con un oligonucleótido con la secuencia conveniente también fracasaron. La secuencia terminal del gen *ARSB* es muy pobre en dianas de restricción y la supresión de su codón de parada unido a la creación de una diana de restricción conveniente tampoco fructificaron. Era imprescindible que cualquier secuencia que se fusionara a la de la ARSB fuera a 3', para no interferir con las modificaciones post-traduccionales.

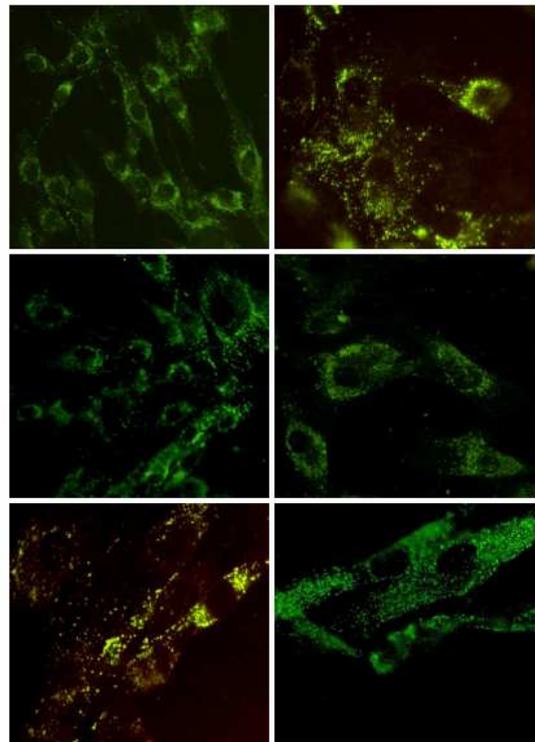
Por lo tanto los esfuerzos de localización de la ARSB mediante inmunofluorescencia indirecta se concentraron en las líneas de fibroblastos primarios procedentes de pacientes (ML2, ML3, ML4, ML5 y ML16, dado que las células del paciente ML1 sólo pudieron utilizarse para la purificación de mRNA).

Para el marcaje de lisosomas y endosomas secundarios se usó inicialmente el marcador de orgánulos ácidos *Lysotracker Red* (Molecular Probes). Tras probar varias concentraciones y tiempos de incubación con las células (10, 25, 50, 75 nM durante 30 o 60 minutos) y comprobar que parecía dar tinciones inespecíficas, se descartó su uso (Figura 2-4). No obstante, el principal problema de este marcaje es la interferencia de su espectro de fluorescencia con el de los marcajes en verde (GFP, FITC o Alexa 488 que se utilizarían posteriormente), que se puso de manifiesto en el microscopio confocal y que puede dar lugar a colocalizaciones artefactuales. Además, a nivel de microscopía confocal su marcaje no coincidía del todo con el que daba la tinción mediante anticuerpos específicos de lisosoma, y se consideró que sería un sistema más fiable el uso de un anticuerpo primario contra la proteína de membrana lisosómica Lamp-2 de mono, la cual marcaba también la forma humana de la proteína (Shen *et al.*, 2001).

Los lisosomas y endosomas secundarios son detectados como orgánulos vesiculares dispersos por todo el citoplasma de la célula, pero concentrados especialmente en la zona perinuclear (Figura 2-5). Se utilizaron diferentes preparaciones como control de autofluorescencia (células fijadas y permeabilizadas sin ningún tipo de marcaje por anticuerpos) y controles de anticuerpos secundarios (células incubadas con los diferentes anticuerpos secundarios de forma conjunta y separada, para valorar las uniones inespecíficas de los anticuerpos secundarios). Mediante el uso del microscopio confocal fue posible el ajuste de la intensidad del láser a fin de evitar la fluorescencia inespecífica, tenue y difusa, de las células sin marcaje con anticuerpos



**Figura 2-4.** Marcaje de lisosomas y endosomas secundarios mediante tinción por *Lysotracker Red* en fibroblastos (25 nM durante una hora). Los marcajes inespecíficos y las regiones con gran señal de fluorescencia son habituales en este tipo de marcaje.

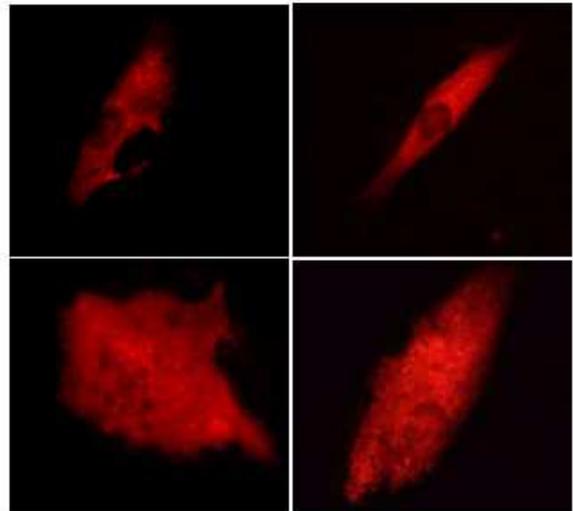


**Figura 2-5.** Marcaje de lisosomas con el anticuerpo H4B4 contra Lamp-2 en fibroblastos salvajes (anticuerpo secundario conjugado con Alexa 488, Invitrogen).

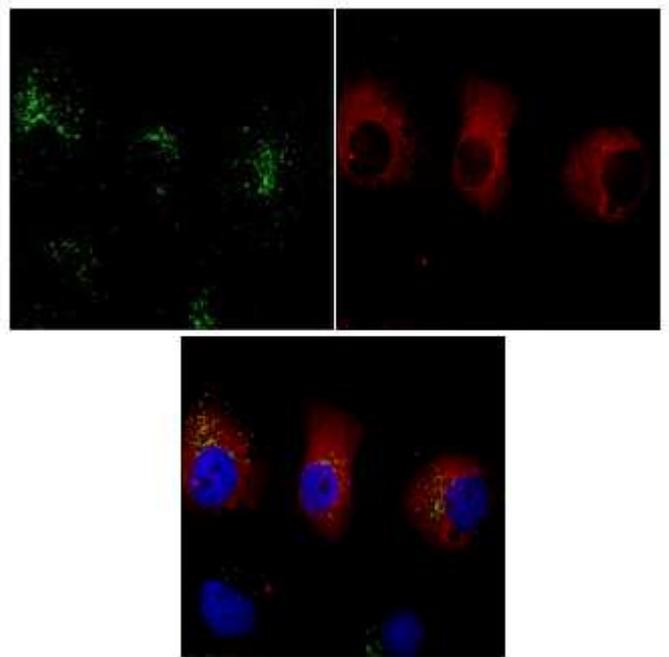
primarios, que era mayor en el espectro del verde que del rojo.

Como marcaje de retículo endoplasmático se intentó la transfección con un vector portador de una proteína fluorescente roja unida a un *tag* de calreticulina (proteína marcadora de RE), el pDsRed (Clontech), e incluso se creó una línea celular estable de células COS-7 expresando pDsRed. Pero no se consiguió transfectar dicho vector (ni ningún otro) de forma eficiente en fibroblastos humanos, aunque se usaron diferentes agentes de transfección por lípidos catiónicos en diferentes condiciones (Lipofectamina de Invitrogen, y Fugene 6 y Fugene HD de Roche). Las células transfectadas eran tan escasas y a menudo tenían tan mal aspecto que se descartó que esos campos pudieran ser significativos en caso de realizar dobles marcajes (Figura 2-6). Además, el problema de que su espectro de fluorescencia roja interfería con los marcajes en verde era idéntico al que se observaba con el *Lysotracker Red*. No obstante sirvió para constatar que el marcaje específico de Lamp-2 mediante anticuerpos era distinguible a simple vista del marcaje de RE (más difuso en el citoplasma y sin aspecto vesicular, Figura 2-7).

El marcaje de RE mediante un anticuerpo primario contra calnexina, una proteína residente en el RE (BD Biosciences) tampoco dio buenos frutos, pues el marcaje en rojo era tan tenue que apenas podía compararse con el verde en los estudios de colocalización (Figura 2-8, *página 117*). Las referencias que se tenían de este anticuerpo ya apuntaban a que, pese a ser específico, era muy problemático como marcador de RE a cualquier dilución y no pudieron obtenerse buenas imágenes en todas las líneas celulares, con lo cual se decidió no publicar ninguna.



**Figura 2-6.** Marcaje de retículo endoplasmático mediante transfección de fibroblastos humanos con el vector pDsRed.



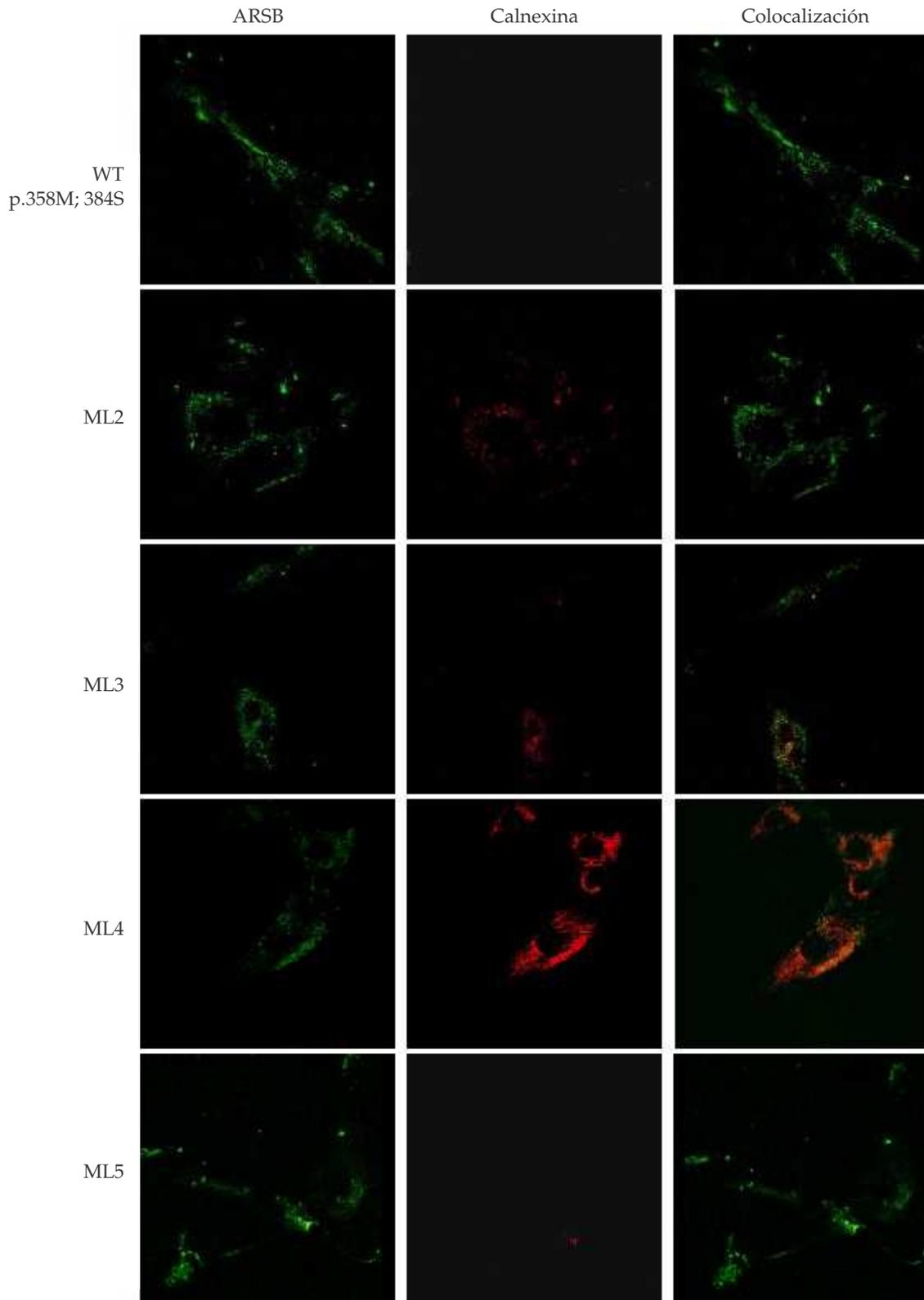
**Figura 2-7.** Marcaje de lisosomas y retículo endoplasmático mediante transfección con pDsRed (rojo) y anticuerpo secundario anti Lamp-2 (verde) en COS-7. Abajo: combinación de fluorescencias (núcleos celulares marcados con DAPI).

No obstante, en las preparaciones en las que el marcaje con calnexina era suficientemente intenso, se ponía de manifiesto que la colocalización de la ARSB mutada en algunos de los pacientes era tan intensa o más en retículo que la que se producía en lisosomas. En las Figuras 2-9 a la 2-14 (*página 118 en adelante*) pueden verse más imágenes de colocalización en fibroblastos de pacientes, adicionales a las presentadas en el artículo.

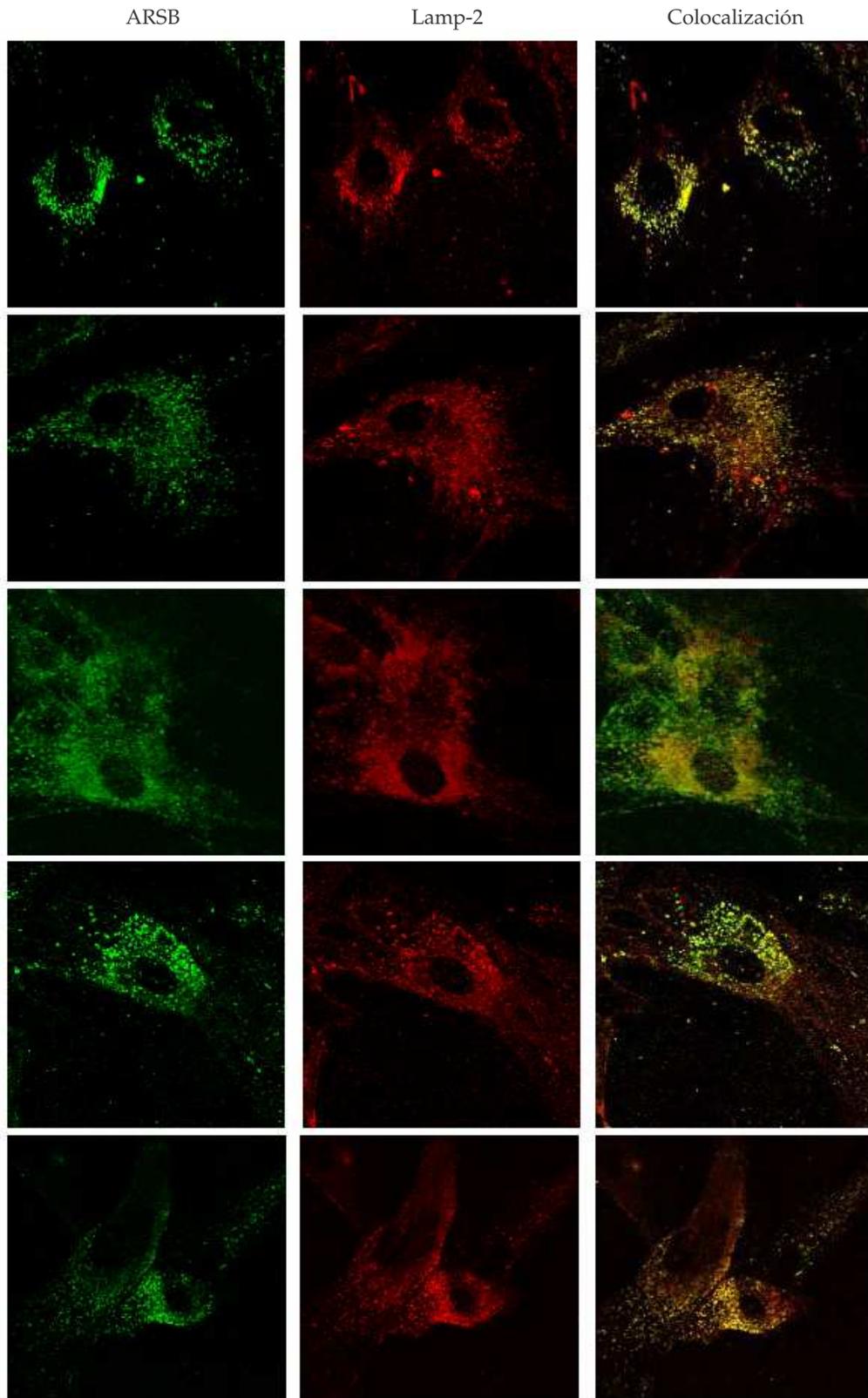
La tinción nuclear con DAPI (proporción 1:10000) se realizó en todas las preparaciones como comprobación del buen estado celular y nuclear, aunque dicha tinción no fue importante a

efectos de colocalización ya que el microscopio con el que se obtuvo la mayoría de fotos no disponía de láser UV.

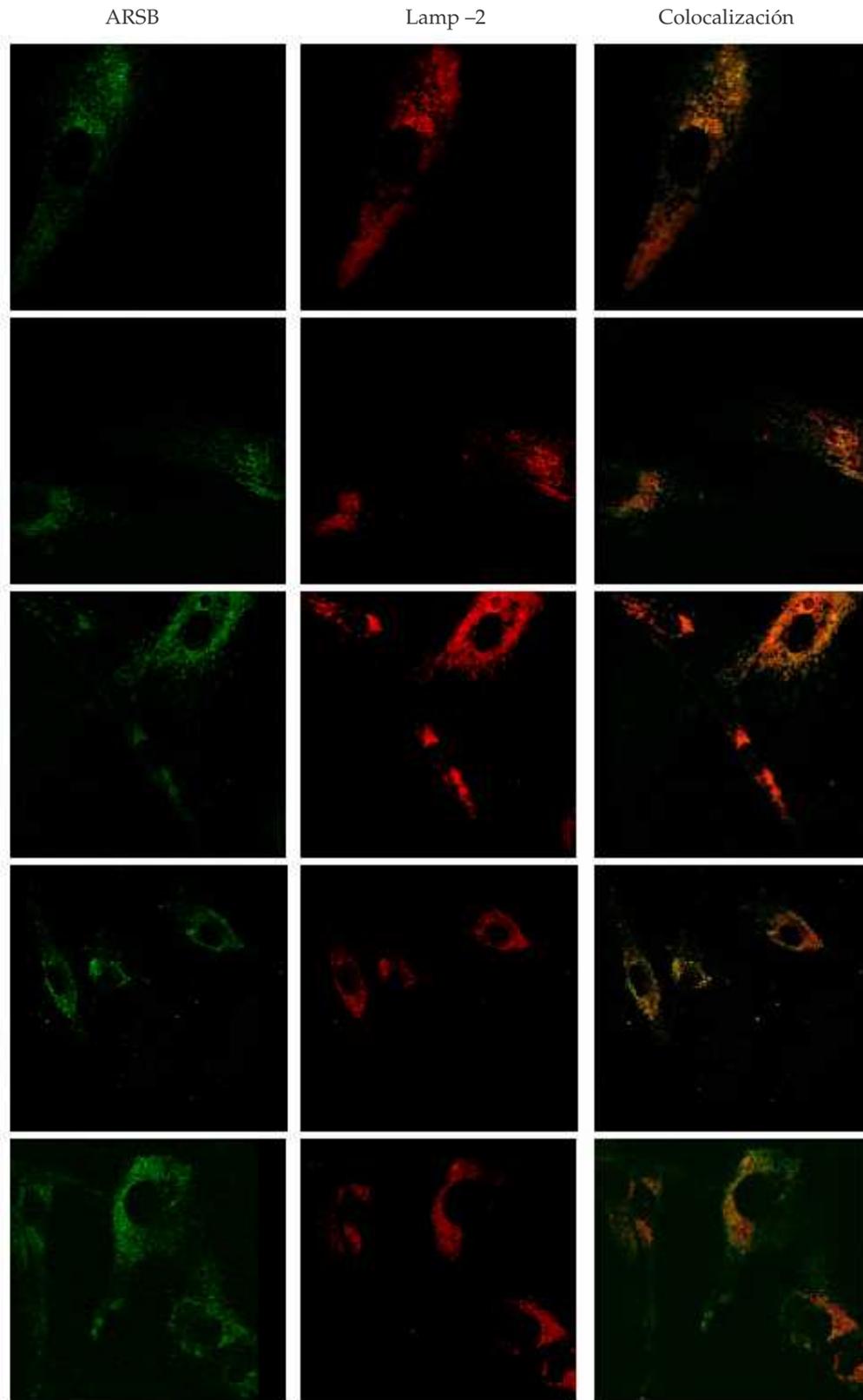
En cuanto a los anticuerpos secundarios para el marcaje de la proteína ARSB, se tuvo que descartar el uso de los fluorocromos Texas Red o Alexa 594, pues su espectro de fluorescencia podía interferir con las tinciones en verde más intensas (FITC o Alexa 488). Este problema pudo solucionarse fácilmente sustituyendo el marcaje secundario en rojo por uno en el espectro del rojo lejano (Alexa 660), visible con el microscopio confocal utilizado.



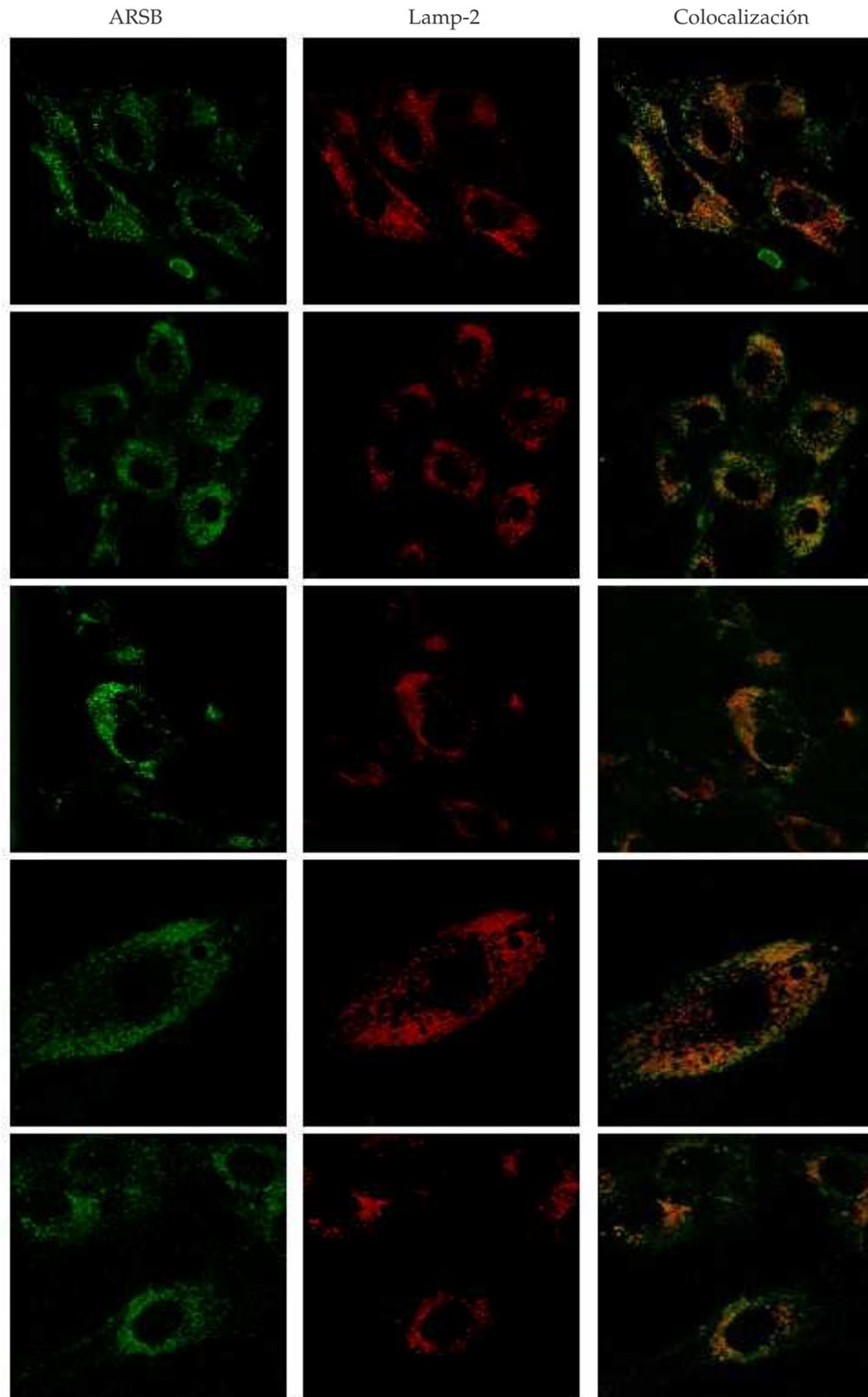
**Figura 2-8. Localización de ARSB en retículo endoplasmático de fibroblastos.** Verde (FITC): ARSB endógena de fibroblastos salvajes o de pacientes ML2 (c.1143-8T>G; c.1143-8T>G), ML3 (c.1143-1G>C; p.R160Q), ML4 (p.W322X; c.427delG) y ML5 (p.L82R; p.L82R). Rojo (Alexa 660): calnexina (marcador de retículo endoplasmático). La dilución de anticuerpos secundarios fue 1:100, y de anticuerpos primarios, 1:75 para la ARSB y 1:50 para la calnexina.



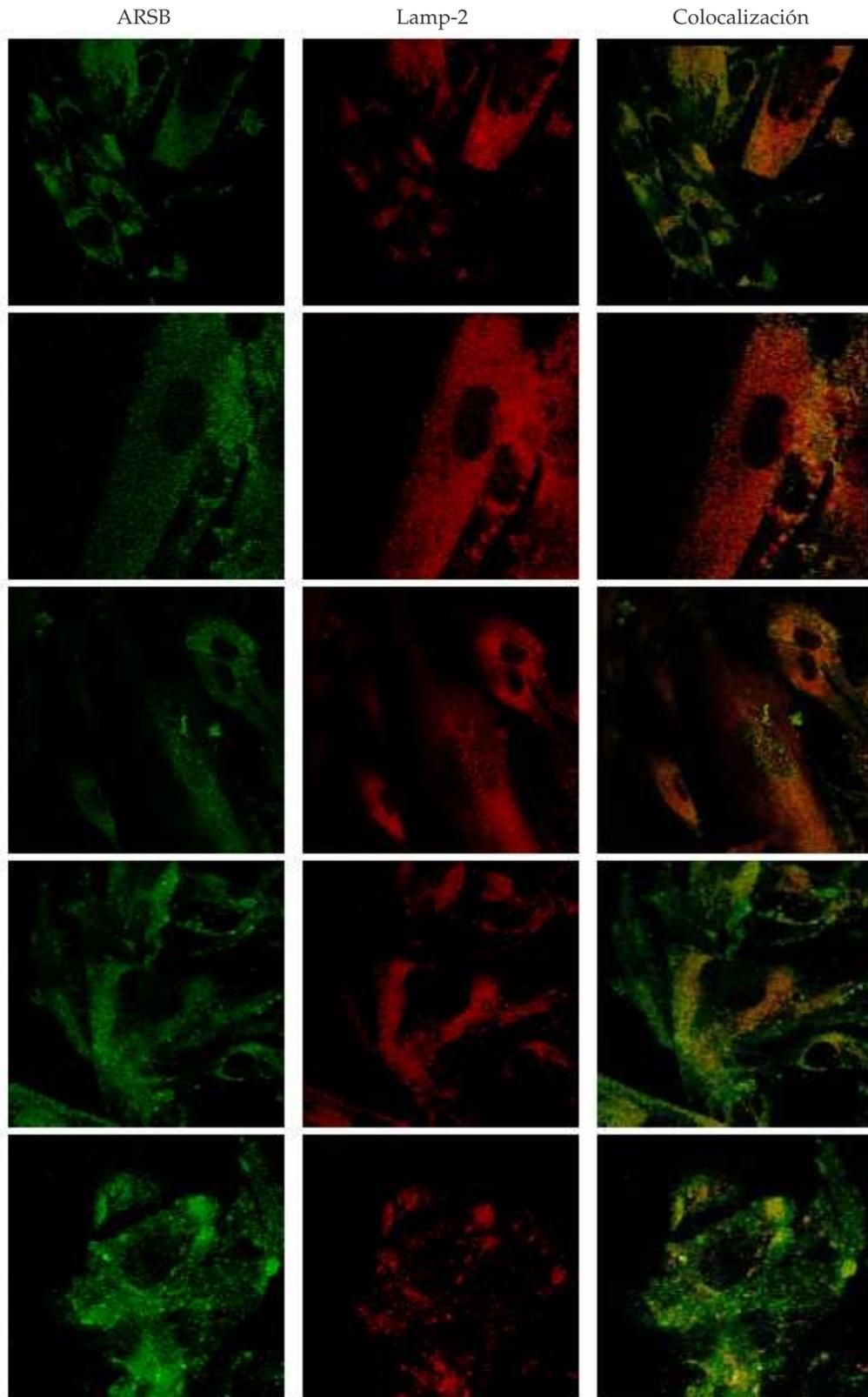
**Figura 2-9** Localización de ARSB en lisosomas de fibroblastos salvajes (las dos filas de arriba, p.358M/358M; p.384S/384S; los tres de abajo, p.358V/358V; p.384S/384S). Verde: ARSB marcada con anticuerpo secundario conjugado con FITC (dilución de anticuerpos primario y secundario 1:75). Rojo: Lamp-2 (marcador de lisosomas) marcada con anticuerpo secundario conjugado con Alexa 660 (dilución de anticuerpos primario y secundario 1:100).



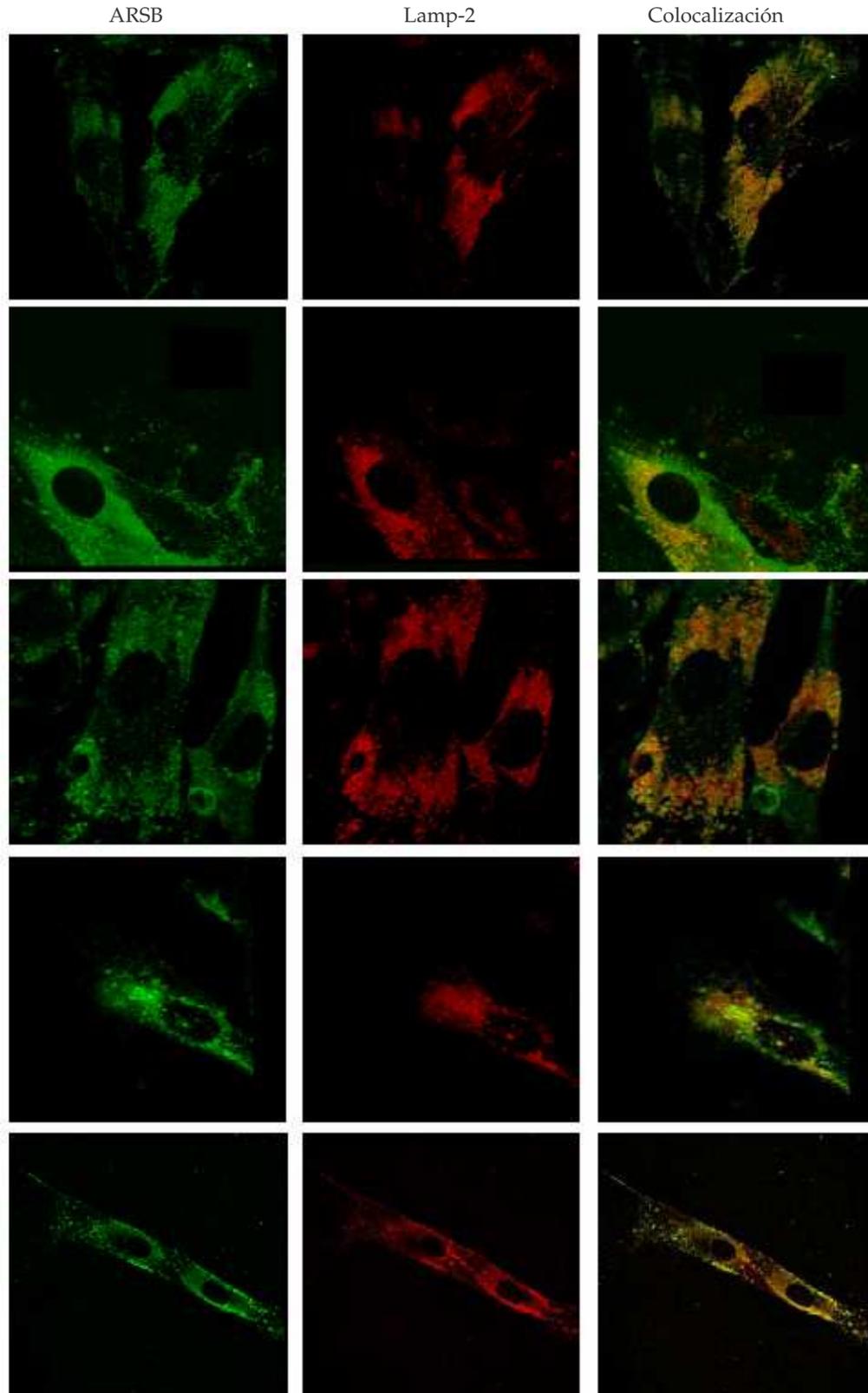
**Figura 2-10.** Localización de ARSB en lisosomas de fibroblastos del paciente ML2 (c.1143-8T>G, c.1143-8T>G). ARSB marcada con anticuerpo secundario conjugado con FITC (dilución de anticuerpos primario y secundario 1:75). Rojo: Lamp-2 (marcador de lisosomas) marcada con anticuerpo secundario conjugado con Alexa 660 (dilución de anticuerpos primario y secundario 1:100).



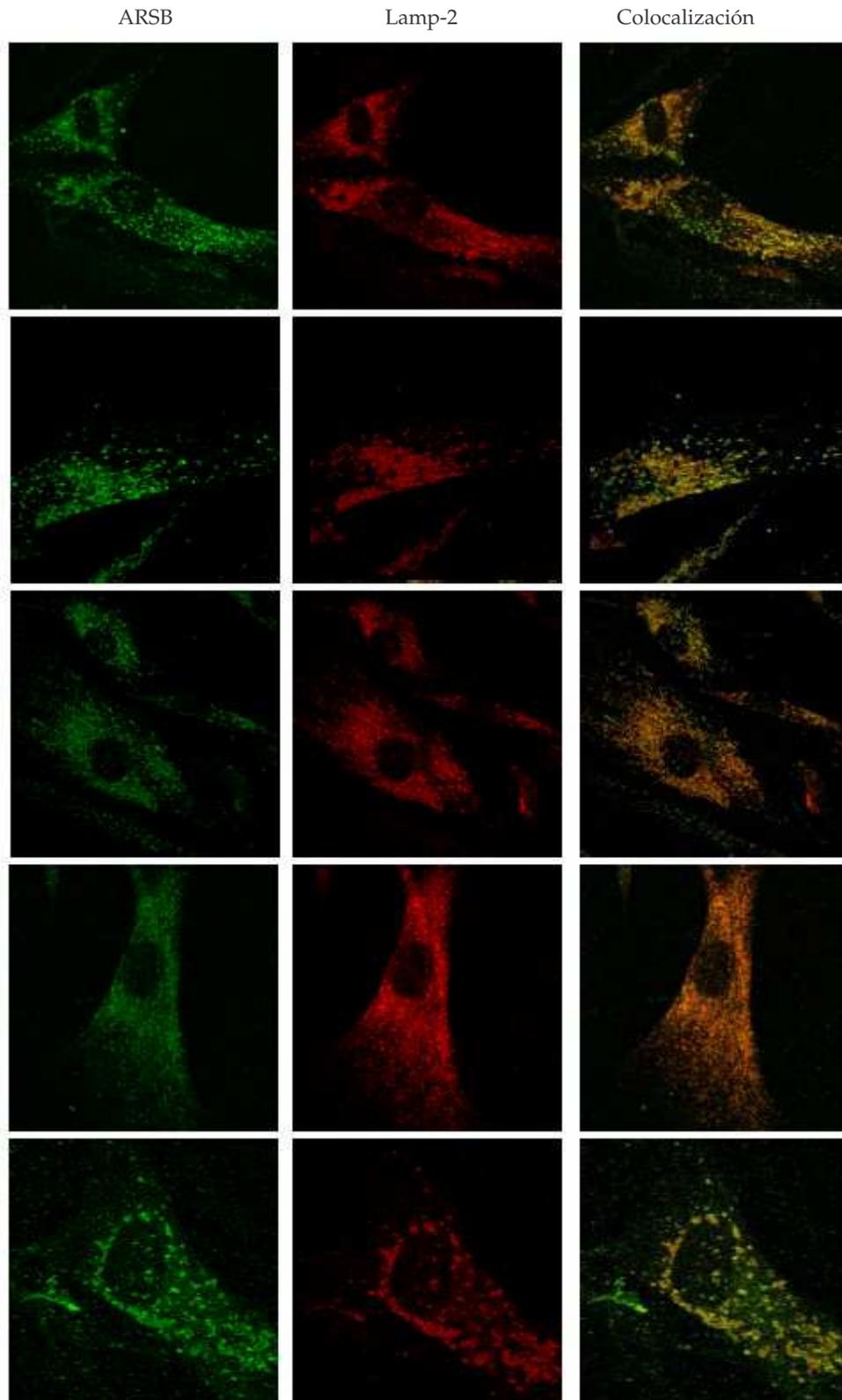
**Figura 2-11.** Localización de ARSB en lisosomas de fibroblastos del paciente ML3 (p.R160Q, c.1143-1G>C). ARSB marcada con anticuerpo secundario conjugado con FITC (dilución de anticuerpos primario y secundario 1:75). Rojo: Lamp-2 (marcador de lisosomas) marcada con anticuerpo secundario conjugado con Alexa 660 (dilución de anticuerpos primario y secundario 1:100).



**Figura 2-12.** Localización de ARSB en lisosomas de fibroblastos del paciente ML4 (p.W322X, c.427delG). ARSB marcada con anticuerpo secundario conjugado con FITC (dilución de anticuerpos primario y secundario 1:75). Rojo: Lamp-2 (marcador de lisosomas) marcada con anticuerpo secundario conjugado con Alexa 660 (dilución de anticuerpos primario y secundario 1:100).



**Figura 2-13.** Localización de ARSB en lisosomas de fibroblastos del paciente ML5 (p.L82R, p.L82R). ARSB marcada con anticuerpo secundario conjugado con FITC (dilución de anticuerpos primario y secundario 1:75). Rojo: Lamp-2 (marcador de lisosomas) marcada con anticuerpo secundario conjugado con Alexa 660 (dilución de anticuerpos primario y secundario 1:100).



**Figura 2-14.** Localización de ARSB en lisosomas de fibroblastos del paciente ML16 (p.S240F, c.1143-1G>C). ARSB marcada con anticuerpo secundario conjugado con FITC (dilución de anticuerpos primario y secundario 1:75). Rojo: Lamp-2 (marcador de lisosomas) marcada con anticuerpo secundario conjugado con Alexa 660 (dilución de anticuerpos primario y secundario 1:100).

## CAPÍTULO III

### 1. Tercer artículo

#### «Supresión de mutaciones MPS VI sin sentido inducida por gentamicina: un ensayo para una posible terapia mediada por aminoglicósidos»

(Manuscrito en preparación)

#### Resumen

El trabajo que ocupa este artículo es una aproximación a una forma de terapia complementaria a la de sustitución enzimática ya establecida para los pacientes de MPS VI, que se podría aplicar a los pacientes portadores de mutaciones sin sentido. Se trata del primer intento en esta enfermedad de intentar suprimir los codones de terminación prematura mediante el uso de antibióticos amino-glicósidos (*ver página 56 de la introducción*).

Se transfectaron células COS-7 de forma análoga a la mencionada en el segundo artículo, a fin de expresar proteínas portadoras de cuatro mutaciones sin sentido encontradas en pacientes de síndrome de Maroteaux-Lamy: p.W322X y p.R160X (encontradas en población española) y p.W146X y p.Q503X (en otras poblaciones). Estas

mutaciones se escogieron para poder ensayar la influencia del contexto nucleotídico del codón de parada en la determinación de la eficacia de la supresión de terminación prematura. Las células se incubaron en presencia de gentamicina y se compararon los niveles de mRNA y de actividad enzimática con los obtenidos en células sin tratar.

Los resultados evidenciaron que, en líneas generales, el tratamiento con gentamicina para la supresión de codones sin sentido incrementa, aunque poco, la capacidad catalítica de la ARSB, y que la eficacia del proceso parece depender del contexto nucleotídico.

Por otro lado, al disponer de una línea de fibroblastos humanos de un paciente MPS VI portador de dos alelos con terminación prematura (ML4, con genotipo p.W322X; c.427delG), pudieron realizarse ensayos de tratamiento con gentamicina y comprobar el aumento de la actividad ARSB en fibroblastos de paciente, así como una mayor estabilidad del transcrito a nivel de mRNA.

Los resultados de estos estudios son un primer paso para solicitar a la compañía *PTC Therapeutics Inc.* el envío de la molécula PTC124, cuya eficacia de supresión de los codones de terminación parece ser superior a la de los antibióticos aminoglicósidos y con la cual ya se están empezando a realizar ensayos clínicos en humanos en otras enfermedades.

## **Gentamicin-induced suppression of MPS VI-causing nonsense mutations: an assay for a possible aminoglycoside-mediated therapy**

Elena Garrido<sup>a</sup>, Amparo Chabás<sup>b</sup>, Lluïsa Vilageliu<sup>a</sup>, Bru Cormand<sup>a</sup> and Daniel Grinberg<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Departament de Genètica, Universitat de Barcelona; CIBERER, IBUB, Barcelona, Spain

<sup>b</sup> Institut de Bioquímica Clínica, Hospital Clínic; CIBERER, Barcelona, Spain

### **ABSTRACT**

Aminoglycosides are a family of antibiotics able to suppress gene translation termination induced by premature termination codon (PTC) mutations, which are responsible for 30% of heritable disorders. Stop codon read-through has been assayed as a form of therapy for a broad range of genetic disorders during the last decade, including several lysosomal accumulation diseases. Here we report the first attempt to restore some amount of full-length and active *N*-acetylgalactosamine-4-sulfatase (ARSB), which deficiency causes Maroteaux-Lamy syndrome (MPS VI), by means of gentamicin-induced translational read-through of premature stop codon mutations. After a two-day incubation with 800 µg/ml gentamicin of COS-7 cells expressing p.W146X, p.R160X, p.W322X and p.Q503X ARSB proteins, a significant increase in enzymatic activity compared to non-treated cells in the most efficient suppression context was detected, as well as a restoration of the cDNA levels. Skin fibroblasts from a MPS VI patient bearing the p.W322X mutation also showed partial recovery of ARSB activity and cDNA levels after gentamicin treatment. These results, albeit preliminar, are promising for a future therapy of this disease.

**KEYWORDS:** Maroteaux-Lamy Syndrome; Mucopolysaccharidosis VI; MPS VI; ARSB; *N*-acetylgalactosamine-4-sulfatase; stop codon read-through; gentamicin; termination suppression

## INTRODUCTION

Aminoglycosides (such as G418, gentamicin, neomicin, amikacin, kanomicin, tobramicin, paromomicin and others) constitute a well-characterized family of antibiotics with a common chemical structure [1]. They stabilize the interaction mRNA-tRNA, interfering with the reading-proof processes that assure the translation fidelity in procariotic and eucariotic cells. At high concentrations, aminoglycosides inhibit protein synthesis, whereas they induce stop codon read-through at low concentrations. When a termination codon comes to the A site of the ribosome during protein translation, both termination and suppression of termination (or stop codon read-through) are possible. Termination consists in the release of a finished full-length polypeptide, whereas in the stop codon suppression, an amino acid with a similar anticodon is added to the nascent polypeptide so translation can continue and produce a mutant protein, which in most cases can be fully or partially functional [2].

The efficiency of aminoglycosides to suppress termination is inversely proportional to the termination efficiency mediated by the three common stop codons UAA, UAG and UAA. In mammals, the proposed ranking of the relative termination efficiency is UAA(N)>UAG(N)=UGA(N)>UAGU>UGAC [3,4]. The relative frequency of termination with respect to the suppression of termination is determined by parameters such the codon context, the activity of termination factors and the natural amount of suppressor tRNA. The stop codon context is especially critical, in particular the nucleotide immediately at 3' of the stop codon, defined as +4 [4-6]. A certain level of natural suppression of termination takes place in normal cells, with a frequency of  $10^{-4}$  in mammals [4] and 0.3 % in yeasts [7].

The most used aminoglycosides in the read-through assays, both *in vivo* and *in vitro*, are G418 (the most effective *in vitro*, but which is not possible to use at the clinical level), and gentamicin, which is currently used in respiratory infections [1,8]. Preclinical studies with gentamicin have proved that the suppression of premature stop mutations can be used as a therapeutic strategy for some genetic diseases, such as cystic fibrosis [8,9] and Duchenne muscular dystrophy (DMD, [10-13]). In the case of cystic fibrosis, clinical assays have been performed successfully, and patients have demonstrated evidence of biochemical and histological improvement after the induction of stop codon read-through by nasal drug administration of gentamicin [14-16]. Similar studies have been performed in X-linked nephrogenic diabetes insipidus [17, 18], ataxia-telangiectasia [19], Smith-Lemli-Opitz syndrome [20], chronic benign familiar pemphigus or Hailey-Hailey disease [21], human atrial fibrillation [22], and in patients with mutations in the coagulation factor VII gene [23].

In the group of lysosomal accumulation diseases, studies of aminoglycosides-mediated suppression of termination in individuals with late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis [24], Hurler syndrome or MPS I [25-27], and cistinosis [28] have been reported. In all these cases it was

possible to state an increase in the amount of normal size protein of 1 to 25 % (usually near 5 %), depending on the dose of the antibiotic, the cell line used, and the context of the stop mutations.

We assessed whether aminoglycoside gentamicin can suppress premature stop mutations in fibroblasts from patients affected with Maroteaux-Lamy syndrome (MPS VI, MIM # 253200).

MPS VI is a rare lysosomal storage disease caused by a deficiency of *N*-acetylgalactosamine-4-sulfatase or arylsulfatase B (ARSB), a soluble lysosomal hydrolase involved in the degradation of dermatan sulfate. MPS VI is inherited in an autosomal recessive manner and patients present with dwarfism, skeletal defects, cardiac dysfunction, hepatosplenomegaly and corneal clouding, among other symptoms [29].

More than 125 mutations in the *ARSB* gene have been identified so far, 12 % of which are nonsense mutations.

Enzyme replacement therapy has undergone phase I and II trials with promising results. However, not all the symptoms seem to disappear, thus new therapeutic approaches, either as alternative or complementary strategies should be assayed.

## MATERIALS AND METHODS

### Analyzed mutations

For this study, mutations, p.W146X, p.R160X, p.W322X, and p.Q503X were analyzed. Two of them, p.R160X and p.W322X, were found in the Spanish group of patients [30].

Mutation p.W146X was first described by Voskoboeva et al. [31], and promotes the change of a UGGC for UGAC. The UGAC termination sequence has a low efficiency [4, 32], so it is supposed to have high suppression efficiency.

Mutation p.R160X was reported by Voskoboeva et al. [33] in a patient with the genotype p.R160X/p.R160Q, who presented an intermediate MPS VI phenotype. This change was found in homozygosity in a Spanish patient [30]. The context for the new stop codon was UGAG, which has an intermediate termination efficiency, according to [4]. No cells from this patient were available.

p.W322X was described for the first time by our group in the Spanish patient ML4, with the genotype c.427delG/p.W322X [30]. The phenotype was severe. The context of the stop codon context was UGAG as for p.R160X. Skin fibroblasts cells were available for study.

p.Q503X was reported by Villani et al. [34], in an Italian homozygous patient, who presented with an intermediate phenotype. Mutation produces the change of CAGU to UAGU, so a high to intermediate suppression of termination is supposed.

### **Isolation of RNA and cDNA amplification**

Total RNA was isolated from cultured cells using the Qiashredder<sup>®</sup> Kit and the RNeasy<sup>®</sup> Minikit (QIAGEN, Hilden, Germany). RT-PCR reactions were performed from total RNA to amplify an ARSB cDNA fragment spanning exons 4 to 8 and control  $\beta$ -actin or *GAPDH* cDNA as described [35]. Quantification of the relative intensity of the electrophoretic bands was performed using the Discovery Series Quantity One 1-D Analysis Software (www.bio-rad.com, Hercules, CA, USA). The intensity of the band corresponding to amplification of endogenous COS-7 ARSB was subtracted from the values of intensity of the other ARSB bands.

### **Cloning and cell culture**

Mutations p.W146X, p.R160X, p.W322X and p.Q503X in the haplotypic context p.358V;p.384S were introduced into the wild-type ARSB cDNA cloned into the expression vector pcDNA3.1-zeo (+) from Invitrogen (Heidelberg, Germany) as previously described [35].

### **Cell culture and transfection**

COS-7 cells and ML4 fibroblasts were maintained in DMEM medium supplemented with 10% BS and 1% penicillin/streptomycin (Gibco) at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. For transfection, 2×10<sup>6</sup> COS-7 cells were grown to 95% confluence on 100 mm plates. Cells were transfected with 6  $\mu$ g of plasmid DNA and 15  $\mu$ l of Lipofectamine<sup>™</sup> 2000 (Invitrogen, Heidelberg, Germany) following the manufacturer's instructions and harvested as described [35].

Fresh DMEM medium supplemented with 10% BS and containing a concentration of 800  $\mu$ g/ml of gentamicin (Gibco, Invitrogen Life Technologies, Heidelberg, Germany) was added to the transfected cells 4 hours post-transfection. The medium was replaced daily until harvesting cells (48 hours post-transfection).

### **Measure of 4-sulfatase activity**

In vitro 4-sulfatase activity of cell extracts was determined by the *p*-nitrocathecol sulphate method as previously described [35]. The average activity of cells transfected with empty pcDNA3 (which was equivalent to that of the endogenous 4-sulfatase of untransfected COS-7 cells) was used to correct enzyme activity of cells expressing mutated *ARSB* cDNA.

### **Indirect immunofluorescence studies of 4-sulfatase in treated fibroblasts**

WT fibroblasts and fibroblasts from MPS VI patient ML4 were grown on coverslips in 12-well plates and fixed after 6 days of treatment with increasing concentrations of gentamicin (300, 500, 100, 1200 and 1500  $\mu$ g/ml). Anti-human ARSB and Lamp-2 (a marker of lysosomes and late endosomes) antibodies were used in subcellular localization studies as in Garrido et al. [35].

### Toxicity assays

Toxicity of G418 (geneticin) and gentamicin (both from Gibco, Invitrogen Life Technologies, Heidelberg, Germany) was assayed *in vitro* before the experiments on human skin fibroblasts and COS-7 cells, which were cultured on 6-well plates in DMEM with 10% BS in absence of other antibiotics. The appropriate antibiotic volume was added directly to the medium to the desired final concentration. Both the medium and the antibiotic were replaced daily. Viability was measured by Trypan blue staining (Gibco). Changes in morphology and growth rate were also considered (data not shown). In COS-7 cells, concentrations of 50 and 100 to 1600 µg/ml in steps of 100 were assayed for gentamicin, and of 10 µg/ml, 25 to 250 µg/ml in steps of 25 and 300 to 1000 µg/ml in steps of 100 for G418. In fibroblasts, concentrations of 500 to 1500 in steps of 500 and 2000 to 4000 µg/ml in steps of 1000 were assayed for gentamicin, and of 50, 100, 125 and 200 to 500 µg/ml in steps of 100 were assayed for G418. Cells were maintained with antibiotics for a total of 120 h.

### Treatment of fibroblasts with gentamicin

ML4 patient's skin fibroblasts (genotype: p.W322X; c.427delG, [30]) were the only cells from a patient bearing a nonsense mutation available for study. Gentamicin treatment was performed in 75 cm<sup>3</sup> flasks for 96 hours at a final concentration of 0, 400 and 700 µg/ml. Three replicates for each condition were performed. Cell pellets were collected for activity assay and RNA studies.

## RESULTS

### Toxicity assays

Gentamicin impaired COS-7 cells and fibroblasts growth and produced a significant increase in mortality after eight days of treatment at 800 µg/ml or more. Cells seemed not to be affected at 300 to 500 µg/ml concentrations.

When G418 was used in COS-7 cells, significant mortality and aberrant morphology was observed from 75 µg/ml on, and from 125 µg/ml on, in fibroblasts. Only a few cells survived after eight days of treatment at these concentrations. Clear signs of toxicity appeared after at least 2 days of treatment in the case of higher concentrations. In view of these data, G418 was not used thereafter in our experiments.

### **Gentamicin treatment of COS-7 cells expressing nonsense mutations**

COS-7 cells transfected with *ARSB* cDNAs containing mutations p.W146X, p.R160X, p.W322X and Q503X showed increased levels of mutant *ARSB* activity after treatment with 800 µg/µl of gentamicin during 42 hours (6 hours after transfection).

As shown in Figure 1, gentamicin has no effect on *ARSB* activity in cells expressing WT *ARSB* nor in cells transfected with empty plasmid (data not shown). By contrast, cells expressing *ARSB* bearing the nonsense mutation p.W146X showed a relative increase in protein activity after treatment. The corrected mutated protein activity was 11.24 nmols/h·mg ± 9.18 before treatment (representing the 0.70 ± 0.57 % of WT activity in the same conditions) and raised up to 35.71 nmols/h·mg ± 15.88 after aminoglycoside treatment (2.23 ± 0.99 % of WT).

A slight increase of *ARSB* activity was also detected for the other nonsense mutations. In the case of p.R160X, corrected activity raised up from 17.33 nmols/h·mg ± 11.71 without gentamicin to 27.67 ± 11.8 nmols/h·mg with gentamicin. For the p.W322X mutation, *ARSB* activity was 37.96 nmols/h·mg ± 23.52 before treatment and 70.91 nmols/h·mg ± 30.55 after treatment. Mutation p.Q503X showed the slightest increment of activity: 27.78 nmols/h·mg ± 2.75 to 34.50 nmols/h·mg ± 6.32.

In order to assess the recovery in the *ARSB* mRNA level of cells expressing these mutations, an RT-PCR experiment was performed, and results from amplification of the *ARSB* cDNA were validated through comparison with the β-actin transcript (Figure 2). A slight recovery in the levels of the *ARSB* transcript could be observed after treatment, in all cases and mainly for the p.W146X and p.W322X mutations. However, the large SD values make the results not conclusive.

### **Gentamicin treatment of patient's fibroblasts**

After 96 hours of treatment with gentamicin, *ARSB* activity in patient ML4 fibroblasts (genotype: p.W322X; c.427delG) was twice to three times that of untreated fibroblasts in the 400 and 700 µg/ml conditions (Figure 3). RT-PCR studies were also performed on RNA from these cells and the intensity of electrophoretic bands was quantified. The *GAPDH* cDNA was amplified as a control (Fig. 4A). Digestion with the *DdeI* restriction enzyme showed that the amount of mRNA increased for both alleles (Fig. 4B). The results of the *ARSB*:*GAPDH* ratio, obtained by quantification of the bands, are shown in Fig. 4C: without antibiotic, the ratio was 0.48 ± 0.09 (1:2 approx.); at 400 µg/ml of gentamicin, the ratio was 0.57 ± 0.20 (1: 1.75), and at 700 µg/ml, it was of 0.62 ± 0.08 (1:1.6)

### **Subcellular localization of *ARSB* in MPS VI fibroblasts after gentamicin treatment**

In WT fibroblasts, the pattern of *ARSB* localization was independent of gentamicin treatment (data not shown). In ML4 fibroblasts cultured in absence of antibiotic, a reduced amount of *ARSB* and minor colocalization in late endosomes was shown, as previously reported [35]. Lamp-2 was

used as a marker of lysosomes and can also be assumed as a control protein which remained invariable after treatment. As shown in Fig. 5, when gentamicin was present in the medium, slight levels of recuperation of ARSB protein were observed (for concentrations of 500 µg/ml of gentamicin or more). This recovered protein goes to the lysosome as shown by the increased level of colocalization in the merged images.

## DISCUSSION

Patients of genetic diseases bearing premature termination mutations in homozygosis or heterozygosis represent between 5 and 70 % of the total number of patients, depending on the illness and the population [2].

Premature termination codons are frequent in most types of lysosomal storage disorders [32]. In the particular case of MPS VI, mutations causing PTCs represent the 36.5% (46/126) of the total number of mutations. However, these include mutations that cause frameshifts, which would not be corrected by termination suppression drugs. Thus, only nonsense mutations are relevant for this form of therapy. In MPS VI, almost 12% of the total of mutations (15/126) are nonsense mutations. This represents a high percentage of the total of mutations. In most genetic diseases, nonsense mutations represent 5-15%, although this frequency depends on the specific population [2,16,27]. The percentage of nonsense MPS VI mutations (and therefore, the number of patients which would take profit of this form of therapy) is higher than those found in other lysosomal storage disorders, including mucopolysaccharidosis [32].

Although in the case of MPS VI a good genotype-phenotype correlation can not be established, stop codon mutations are supposed to contribute to a especially severe clinical presentation [36]. However, patients with a low-fidelity premature stop codon mutation can develop a clinical attenuated phenotype as a consequence of the natural stop codon read-through [27].

It is probable that only a sub-group of patients carrying stop codon mutations could potentially benefit from the treatment with aminoglycosides. Thus, it is important that the patients included in these assays are chosen under the criterion of their possible response to the suppression according to the context of their stop codon mutations, in order to obtain significant levels of suppression of termination [37].

Gentamicin and other drugs used to induce suppression of termination are of lower molecular weight and more permeable than the proteins that are used for the enzyme replacement therapy, so they are supposed to act in tissues and organs that are not easily accessible and where other therapies are unsuccessful. As an effective therapy for patients with a lysosomal storage disorder, a

combined approach that consists of both enzyme-replacement therapy and stop-codon read-through therapy has been proposed [32].

We have assayed the effect of gentamicin treatment on four heterologously expressed nonsense mutations found in MPS VI patients and on fibroblasts from one patient. A concentration of 800 µg/ml for COS-7 cells and a maximum of 700 µg/ml in the case of fibroblasts were chosen according to the toxicity studies performed by us and others [23]. Our results are promising as they show that gentamicin treatment on p.W146X, a nonsense mutation in the highest suppression efficiency context [4,32], promotes the highest recovery of the enzyme activity (about a 3-fold rise from untreated cells, representing more than 2% of WT activity). This agrees with the expected advantage of being in the nucleotide context (UGAC) with the highest suppression efficiency, accordingly with the results in the bibliography [4-6]. Moreover, the mutation involves a triptophan and there are evidences in prokaryotes that the stop codon UGA could be preferentially substituted with a Trp codon during stop codon read-through [38]. Because of the similarity between the Trp codon (UGG) and the termination codon generated by the p.W146X mutation in the *ARSB* gene (UGA), it can be assumed that the correct amino acid could be incorporated to the nascent peptide during translation, and a non-mutated full-length *ARSB* protein would be produced.

In contrast, mutation p.Q503X, which also generates a stop codon in a context associated with a high suppression efficiency (UAGU) and which is not suspicious of promoting transcript degradation by nonsense mediated RNA decay (NMD), since it is in the last exon, showed the lowest recovery of activity. More experiments would be needed to confirm this result.

The other two mutations (p.R160X and p.W322X) create a UGA stop codon with G as the +4 nucleotide position, so an intermediate efficiency of termination (and therefore stop-codon read-through efficiency) was expected. They showed a 1.5 and 1.8-fold increase in *ARSB* activity after gentamicin treatment, respectively.

In a former report [35] mutations p.W322X and/or c.427delG (present in fibroblasts from patient ML4) were confirmed to trigger NMD. NMD can limit the efficiency of therapeutic strategies that look for enhancing nonsense suppression [39]. In our case, gentamicin treatment of fibroblasts bearing NMD-causing alleles showed a similar recovery of mRNA levels (2-fold) that the treatment with cycloheximide [35], which inhibits NMD. This can indicate that a decrease in mRNA turnover could participate in the enzyme activity recovery [40]. The RNA recovery was, indeed, observed in the present study for all mutations except for p.Q503X (that was not supposed to be affected by NMD).

It is important to state that good results of nonsense suppression may be due to the quality of the gentamicin employed in the experiments. Experiences of other authors showed that the brand and purification of gentamicin may be critical for positive results [40,41]. In our case, we obtained no positive results in previous experiments with gentamicin from other brands. The present results in fibroblasts and COS-7 cells were achieved with gentamicin from Gibco.

A main objection to the use of aminoglycosides is that their long-term use is associated to nephrotoxicity and ototoxicity. Although in the assays of termination of suppression sub-poisonous antibiotic concentrations are used, they are 10-15 times higher to those used for prokaryotes. Moreover, the action of the antibiotics is not specific. However, the use of certain pure C1 isoform of gentamicin [42] and other molecules with less side effects (as amikacine or negamicine, [42,43]), could solve this problem. In fact, gentamicin is currently used in respiratory infections since it is sure by inhalation.

The company PTC Therapeutics Inc. has reported a non-antibiotic highly-efficient read-through drug, PTC124, which can be taken orally. Clinical trials to prove the safety of this compound have been completed in patients with cystic fibrosis and Duchenne muscular dystrophy [40,44]. PTC124 has high permeability with less toxic effects, and seems to be more efficient in suppressing termination than gentamicin. There are evidences that it could act preferentially in premature termination codons but not in natural termination codons. It would be interesting to investigate the potential of PTC124 in MPS VI patients (or in patients with other lysosomal storage disorders) in preclinical studies, as it seems to be more attractive and safe for long-term treatments.

In summary, the results presented here provide preliminary evidence that stop-codon readthrough therapy could be a possible future therapeutic option for MPS VI. However, further studies, particularly with other drugs such as PTC124, should be performed.

## REFERENCES

- [1] Yoshizawa S, Fourmy D, Puglisi JD. Structural origins of gentamicin antibiotic action. *EMBO J* (1998) 17(22):6437-48.
- [2] Kellermayer R. Translational readthrough induction of pathogenic nonsense mutations. *Eur J Med Genet* (2006) 49(6):445-50.
- [3] Howard MT, Shirts BH, Petros LM, Flanigan KM, Gesteland RF, Atkins JF. Sequence specificity of aminoglycoside-induced stop codon readthrough: potential implications for treatment of Duchenne muscular dystrophy. *Ann Neurol* (2000) 48(2):164-9.
- [4] Manuvakhova M, Keeling K, Bedwell DM. Aminoglycoside antibiotics mediate context-dependent suppression of termination codons in a mammalian translation system. *RNA* (2000) 6: 1044–55.
- [5] Kopelowitz J, Hampe C, Goldman R, Reches M, Engelberg-Kulka H. Influence of codon context on UGA suppression and readthrough. *J Mol Biol* (1992) 225(2):261-9.
- [6] McCaughan KK, Brown CM, Dalphin ME, Berry MJ, Tate WP. Translational termination efficiency in mammals is influenced by the base following the stop codon. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1995) 92(12):5431-5.

- [7] Namy O, Hatin I, Rousset JP. Impact of the six nucleotides downstream of the stop codon on translation termination. *EMBO Rep* (2001) 2(9):787-93.
- [8] Howard M, Frizzell RA, Bedwell DM. Aminoglycoside antibiotics restore CFTR function by overcoming premature stop mutations. *Nat Med* (1996) 2: 467–9.
- [9] Bedwell DM, Kaenjak A, Benos DJ, Bebok Z, Bubien JK, Hong J, Tousson A, Clancy JP, Sorscher EJ. Suppression of a CFTR premature stop mutation in a bronchial epithelial cell line. *Nat Med* (1997) 3:1280–4.
- [10] Du M, Jones JR, Lanier J, Keeling KM, Lindsey JR, Tousson A, Bebok Z, Whitsett JA, Dey CR, Colledge WH, Evans MJ, Sorscher EJ, Bedwell DM. Aminoglycoside suppression of a premature stop mutation in a *Cftr*<sup>-/-</sup> mouse carrying a human CFTR-G542X transgene. *J Mol Med* (2002) 80(9):595-604
- [11] Barton-Davis ER, Cordier L, Shoturma DI, Leland SE, Sweeney HL. Aminoglycoside antibiotics restore dystrophin function to skeletal muscles of mdx mice. *J Clin Invest* (1999) 104: 375–81.
- [12] Howard MT, Anderson CB, Fass U, Khatri S, Gesteland RF, Atkins JF, Flanigan KM. Readthrough of dystrophin stop codon mutations induced by aminoglycosides. *Ann Neurol* (2004) 55(3):422-6.
- [13] Politano L, Nigro G, Nigro V, Piluso G, Papparella S, Paciello O, Comi LI. Gentamicin administration in Duchenne patients with premature stop codon. Preliminary results. *Acta Myol* (2003) 22(1):15-21.
- [14] Wilschanski M, Famini C, Blau H, Rivlin J, Augarten A, Avital A, Kerem B, Kerem E. A pilot study of the effect of gentamicin on nasal potential difference measurements in cystic fibrosis patients carrying stop mutations. *Am J Respir Crit Care Med* (2000) 161(3 Pt 1):860-5.
- [15] Wilschanski M, Yahav H, Yaacov Y, Blau H, Bentur L, Rivlin J, Aviram M, Bdolah-Abram T, Bebok Z, Shushi L, Kerem B, Kerem E. Gentamicin-induced correction of CFTR function in patients with cystic fibrosis and CFTR stop mutations. *N Engl J Med* (2003) 349:1433–41
- [16] Clancy JP, Bebok Z, Ruiz F, King C, Jones J, Walker L, Greer H, Hong J, Wing L, Macaluso M, Lyrene R, Sorscher EJ, Bedwell DM. Evidence that systemic gentamicin suppresses premature stop mutations in patients with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* (2001) 163(7):1683-92.
- [17] Schulz A, Sangkuhl K, Lennert T, Wigger M, Price DA, Nuuja A, Gruters A, Schultz G, Schoneberg T. Aminoglycoside pretreatment partially restores the function of truncated V(2) vasopressin receptors found in patients with nephrogenic diabetes insipidus. *J Clin Endocrinol Metab* (2002) 87(11):5247-57.
- [18] Sangkuhl K, Schulz A, Rompler H, Yun J, Wess J, Schoneberg T. Aminoglycoside-mediated rescue of a disease-causing nonsense mutation in the V2 vasopressin receptor gene in vitro and in vivo. *Hum Mol Genet* (2004) 13: 893–903.

- [19] Lai CH, ChunHH, Nahas SA, Mitui M, Gamo KM, Du L, Gatti RA. Correction of ATM gene function by aminoglycoside-induced readthrough of premature termination codons. *Proc Natl Acad Sci USA* (2004) 101: 15676–81.
- [20] Correa-Cerro LS, Wassif CA, Wayne JS, Krakowiak PA, Cozma D, Dobson NR, Levin SW, Anadiotis G, Steiner RD, Krajewska-Walasek M, Nowaczyk MJ, Porter FD. DHCR7 nonsense mutations and characterisation of mRNA nonsense mediated decay in Smith-Lemli-Opitz syndrome. *J Med Genet* (2005) 42(4):350-7.
- [21] Kellermayer R, Szigeti R, Keeling KM, Bedekovics T, Bedwell DM. Aminoglycosides as potential pharmacogenetic agents in the treatment of Hailey-Hailey disease. *J Invest Dermatol* (2006) 126(1):229-31.
- [22] Olson TM, Alekseev AE, Liu XK, Park S, Zingman LV, Bienengraeber M, Sattiraju S, Ballew JD, Jahangir A, Terzic A. Kv1.5 channelopathy due to KCNA5 loss-of-function mutation causes human atrial fibrillation. *Hum Mol Genet* (2006) 15(14):2185-91.
- [23] Pinotti M, Rizzotto L, Pinton P, Ferraresi P, Chuansumrit A, Charoenkwan P, Marchetti G, Rizzuto R, Mariani G, Bernardi F. Intracellular readthrough of nonsense mutations by aminoglycosides in coagulation factor VII. *J Thromb Haemost* (2006) 6:1308-14.
- [24] Sleat DE, Sohar I, Gin RM, Lobel P. Aminoglycoside-mediated suppression of nonsense mutations in late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. *Eur J Paediatr Neurol* (2001) 5 Suppl A:57-62.
- [25] Keeling KM, Brooks DA, Hopwood JJ, Li P, Thompson JN, Bedwell DM. Gentamicin-mediated suppression of Hurler syndrome stop mutations restores a low level of alpha-L-iduronidase activity and reduces lysosomal glycosaminoglycan accumulation. *Hum Mol Genet* (2001) 10: 291–9.
- [26] Keeling KM, Bedwell DM. Clinically relevant aminoglycosides can suppress disease-associated premature stop mutations in the IDUA and P53 cDNAs in a mammalian translation system. *J Mol Med* (2002) 80(6):367-76.
- [27] Hein LK, Bawden M, Muller VJ, Sillence D, Hopwood JJ, Brooks DA. alpha-L-iduronidase premature stop codons and potential read-through in mucopolysaccharidosis type I patients. *J Mol Biol* (2004) 338(3):453-62.
- [28] Helip-Wooley A, Park MA, Lemons RM, Thoene JG. Expression of CTNS alleles: subcellular localization and aminoglycoside correction in vitro. *Mol Genet Metab* (2002) 75(2):128-33.
- [29] E.F. Neufeld, J. Muenzer, The Mucopolysaccharidoses, in: C.R. Scriver, A.L. Beaudet, W.S. Sly, D. Valle (Eds.), *The metabolic and molecular basis of inherited disease*, 8<sup>th</sup> McGraw-Hill, New York, 2001, pp. 2465-2494.
- [30] Garrido E, Chabás A, Coll MJ, Blanco M, Domínguez C, Grinberg D, Vilageliu L, Cormand B, Identification of the molecular defects in Spanish and Argentinian mucopolysaccharidosis VI

(Maroteaux-Lamy syndrome) patients, including 9 novel mutations. *Mol Genet Metab* (2007) 92(1-2):122-130.

[31] Voskoboeva E, Krasnopol'skaia KD, Peters K, von Figura K. Identification of mutations in the arylsulfatase B gene in Russian mucopolysaccharidosis type VI patients. *Genetika* (2000) 36:837-43.

[32] Brooks DA, Muller VJ, Hopwood JJ. Stop-codon read-through for patients affected by a lysosomal storage disorder. *Trends Mol Med* (2006) 12(8):367-73.

[33] Voskoboeva E, Isbrandt D, von Figura K, Krasnopol'skaya X, Peters C. Four novel mutant alleles of the arylsulfatase B gene in two patients with intermediate form of mucopolysaccharidosis VI (Maroteaux-Lamy syndrome). *Hum Genet* (1994) 93:259-64.

[34] Villani GR, Balzano N, Vitale D, Saviano M, Pavone V, Di Natale P. Maroteaux-Lamy syndrome: five novel mutations and their structural localization. *Biochim Biophys Acta* (1999) 1453:185-92.

[35] Garrido E, Cormand B, Hopwood JJ, Chabás A., Grinberg D, Vilageliu L. Maroteaux-Lamy syndrome: functional characterization of pathogenic mutations and polymorphisms in the arylsulfatase B gene. Submitted.

[36] Litjens T, Hopwood JJ. Mucopolysaccharidosis type VI: Structural and clinical implications of mutations in N-acetylgalactosamine-4-sulfatase. *Hum Mutat* (2001) 18, 282-95.

[37] Bidou L, Hatin I, Perez N, Allamand V, Panthier JJ, Rousset JP. Premature stop codons involved in muscular dystrophies show a broad spectrum of readthrough efficiencies in response to gentamicin treatment. *Gene Ther* (2004) 11(7):619-27.

[38] Nilsson M, Ryden-Aulin M. Glutamine is incorporated at the nonsense codons UAG and UAA in a suppressor-free *Escherichia coli* strain. *Biochim Biophys Acta* (2003) 1627(1):1-6.

[39] Frischmeyer PA, van Hoof A, O'Donnell K, Guerrerio AL, Parker R, Dietz HC. An mRNA surveillance mechanism that eliminates transcripts lacking termination codons. *Science* (2002) 295(5563):2258-61.

[40] Welch EM, Barton ER, Zhuo J, Tomizawa Y, Friesen WJ, Trifillis P, Paushkin S, Patel M, Trotta CR, Hwang S, Wilde RG, Karp G, Takasugi J, Chen G, Jones S, Ren H, Moon YC, Corson D, Turpoff AA, Campbell JA, Conn MM, Khan A, Almstead NG, Hedrick J, Mollin A, Risher N, Weetall M, Yeh S, Branstrom AA, Colacino JM, Babiak J, Ju WD, Hirawat S, Northcutt VJ, Miller LL, Spatrick P, He F, Kawana M, Feng H, Jacobson A, Peltz SW, Sweeney HL. PTC124 targets genetic disorders caused by nonsense mutations. *Nature* (2007) 447(7140):87-91.

[41] Dunant P, Walter MC, Karpati G, Lochmuller H. Gentamicin fails to increase dystrophin expression in dystrophin-deficient muscle. *Muscle Nerve* (2003) 27(5):624-7.

[42] Du M, Keeling KM, Fan L, Liu X, Kovacs T, Sorscher E, Bedwell DM. Clinical doses of amikacin provide more effective suppression of the human CFTR-G542X stop mutation than gentamicin in a transgenic CF mouse model. *J Mol Med* (2006) 84(7):573-82.

- [43] Arakawa M, Shiozuka M, Nakayama Y, Hara T, Hamada M, Kondo S, Ikeda D, Takahashi Y, Sawa R, Nonomura Y, Sheykholeslami K, Kondo K, Kaga K, Kitamura T, Suzuki-Miyagoe Y, Takeda S, Matsuda R. Negamycin restores dystrophin expression in skeletal and cardiac muscles of mdx mice. *J Biochem (Tokyo, 2003)* 134(5):751-8. Erratum: *J Biochem (Tokyo, 2004)* 35(2):277.
- [44] Hirawat S, Welch EM, Elfring GL, Northcutt VJ, Paushkin S, Hwang S, Leonard EM, Almstead NG, Ju W, Peltz SW, Miller LL. Safety, tolerability, and pharmacokinetics of PTC124, a nonaminoglycoside nonsense mutation suppressor, following single- and multiple-dose administration to healthy male and female adult volunteers. *J Clin Pharmacol.* (2007) 47(4):430-44.

## FIGURE LEGENDS

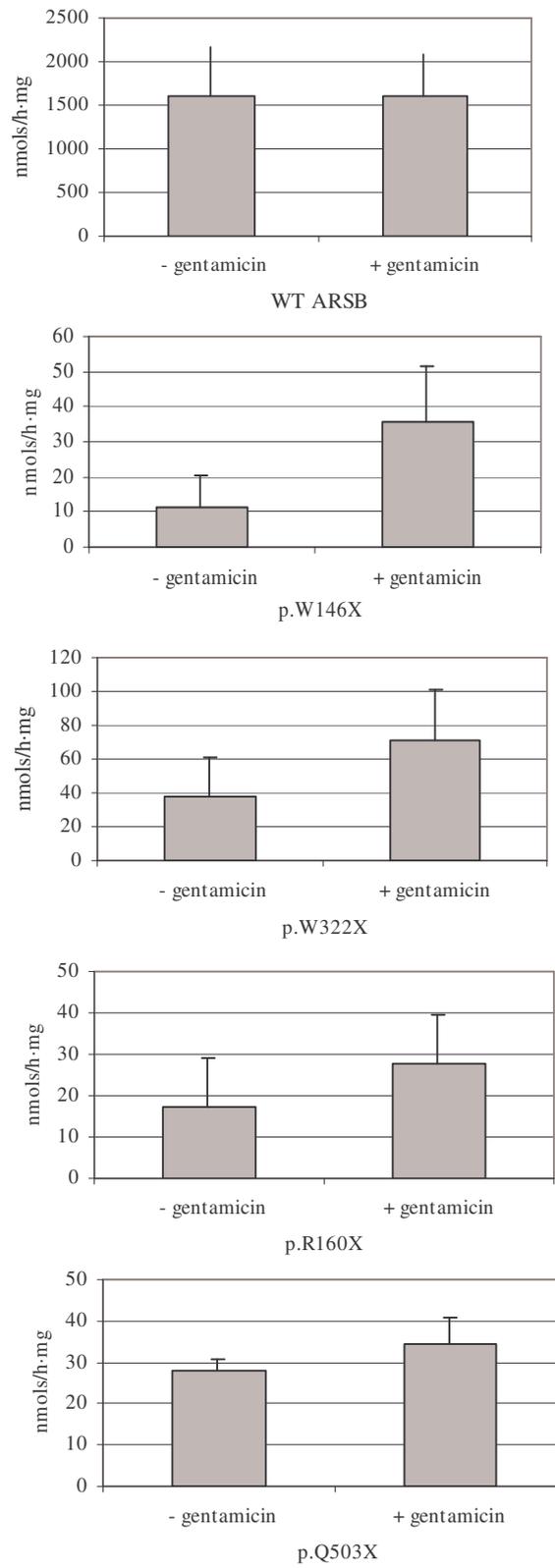
**Figure 1.** Effect of gentamicin treatment (800 µg/ml for 42 hours, 48 hours post-transfection) on COS-7 cells transfected with WT or mutated *ARSB* cDNA. *ARSB* activity (expressed as nmols of substrate per hour per mg of protein) is corrected by subtracting the value of endogenous *ARSB* activity obtained in COS-7 cells transfected with empty pcDNA3 plasmid under the same conditions of antibiotic. Grey: mean. Bars: standard deviation (WT *ARSB*: n=10; p.W146X: n=16; p.R160X: n=10; p.W322X: n=4; p.Q503X: n=4, control pcDNA3: n=4).

**Figure 2.** A) Amplification of cDNA obtained from RNA of COS-7 cells transfected with nonsense mutations p.W146X, p.R160X, p.W322X and p.Q503X, showing the effect of 0 (-) or 800 µg/ml of gentamicin (+) after 42 hours. Endogenous amplification of monkey *ARSB* and β-actin is showed as controls. *ARSB* cDNA fragment from exon 2 to exon 4: 473 bp. β-actin fragment: 838 bp. B) Quantification of mRNA levels. Each experiment was repeated twice.

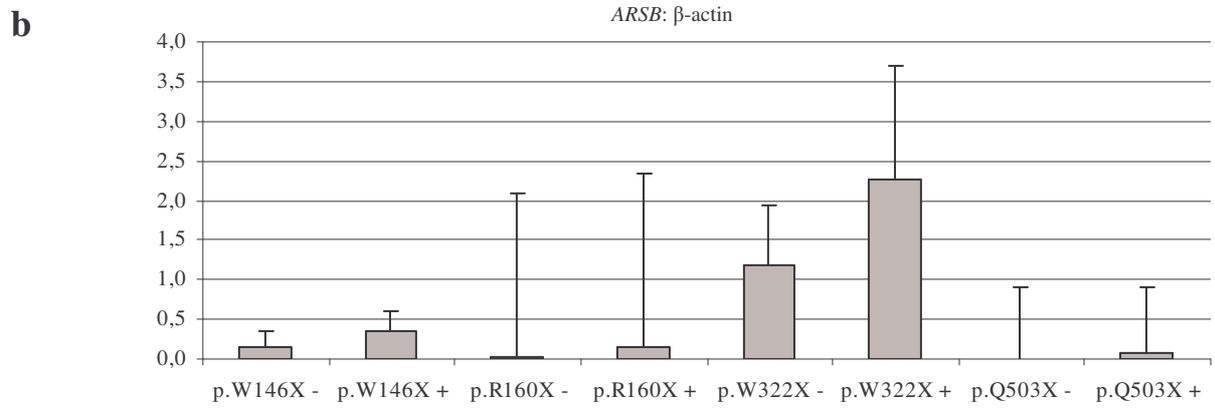
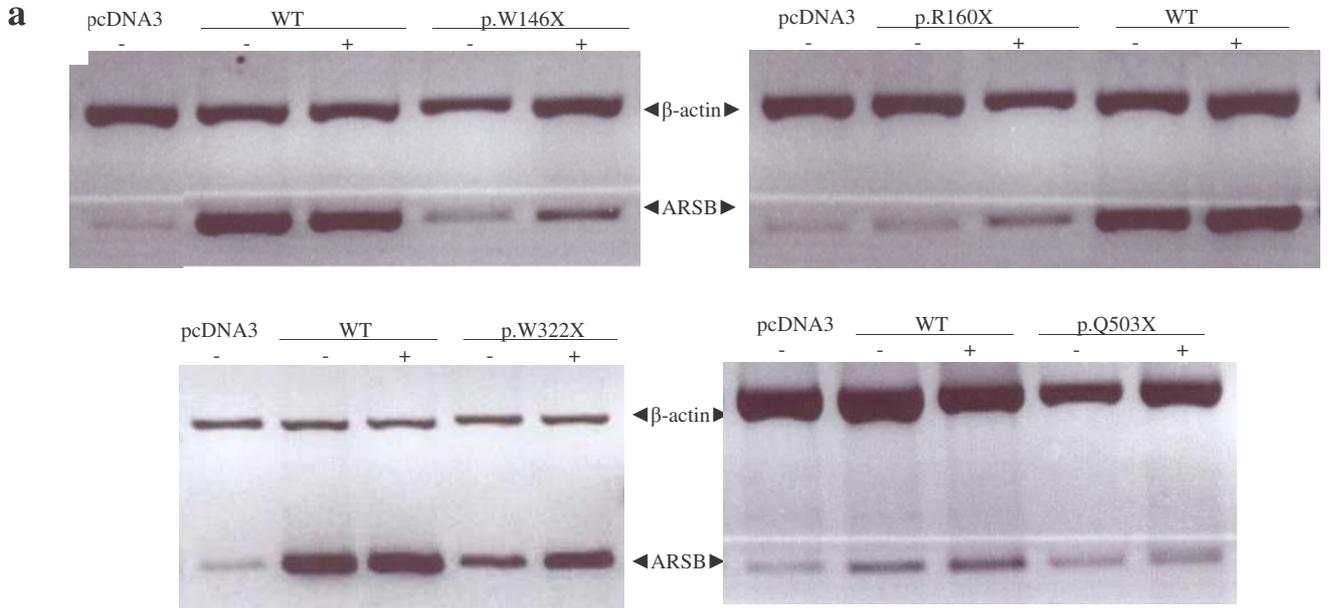
**Figure 3.** Effect of 96 hours of gentamicin treatment (at different concentrations) on *ARSB* activity of primary fibroblasts from a MPS VI patient (p.W322X; c.427delG).

**Figure 4.** A) Effect of gentamicin treatment on *ARSB* cDNA levels. *GAPDH* gene was amplified as a control. B) Digestion of p.W322X allele with *DdeI* to show the recovery in cDNA levels in both p.W322X and c.427delG alleles after gentamicin treatment. C) Quantification of the *ARSB*:*GAPDH* ratio for each treatment condition.

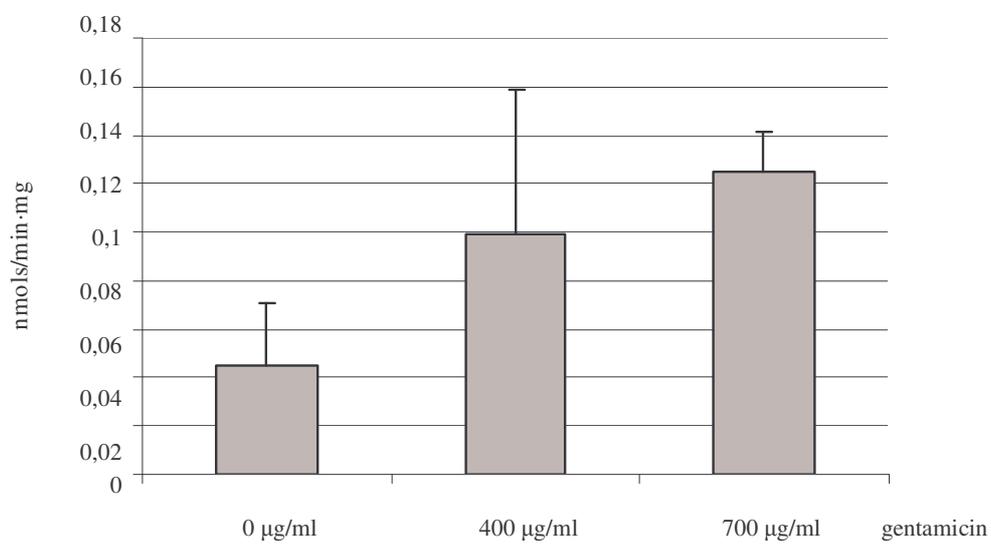
**Figure 5.** Indirect immunofluorescence of WT fibroblasts and those from the ML4 MPS VI patient (bearing stop codon mutation p.W322X). Patient's fibroblasts were treated with different gentamicin concentrations as indicated. *ARSB* protein was detected with a FITC-conjugated secondary antibody (green). Colocalization with Lamp-2 (an endogenous marker of lysosomes and late endosomes, marked in red) is shown in the overlay. Magnification: 600X.



**Figure 1**



**Figure 2**



**Figure 3**

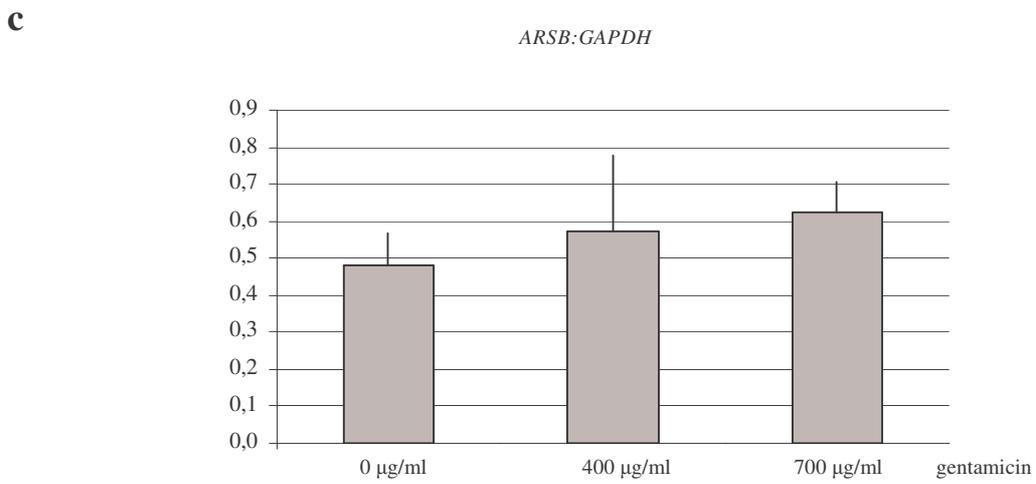
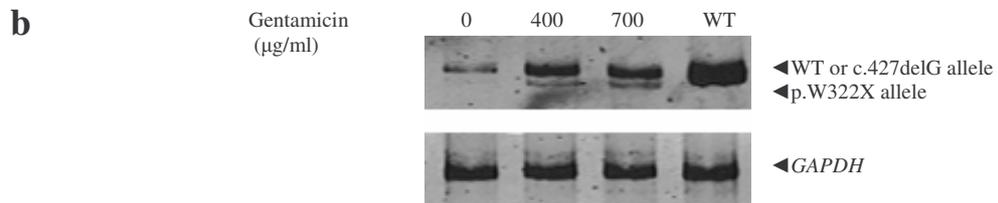
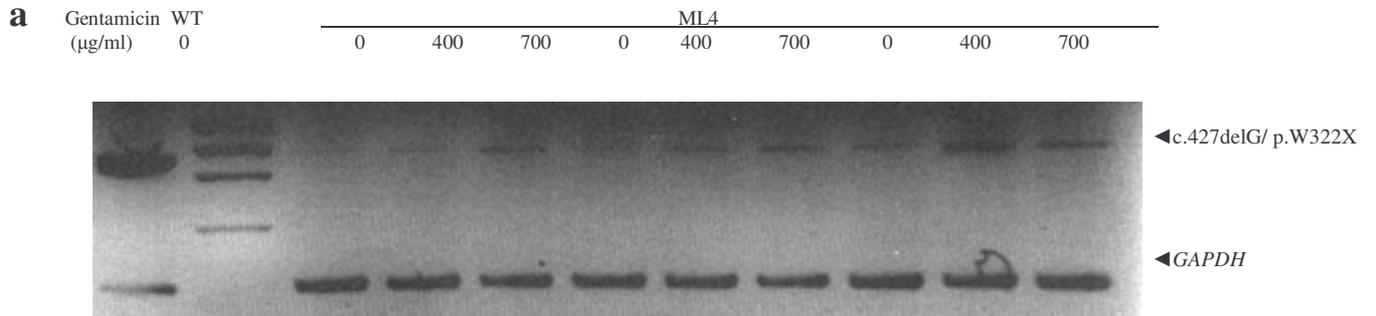


Figure 4

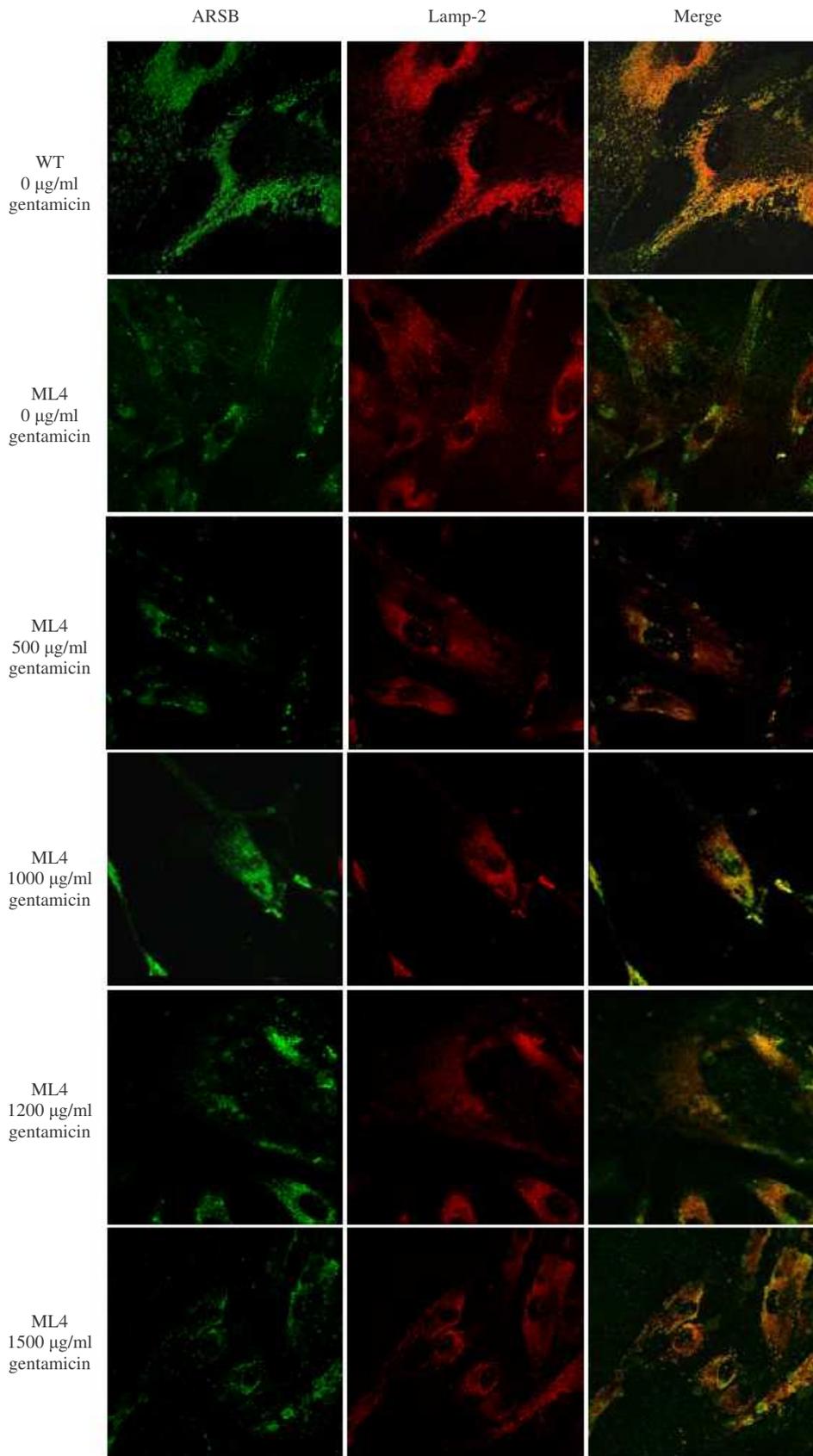


Figure 5

## 2. Material complementario al tercer artículo

### Mutagénesis dirigida

La introducción de las mutaciones de terminación prematura en la secuencia salvaje del cDNA del gen *ARSB* se realizó mediante mutagénesis dirigida de forma análoga a la explicada en el Capítulo II, con los cebadores de mutagénesis que se detallan en la Tabla 3-1 (*página siguiente*). Se utilizó en este caso el plásmido pcDNA3.1 resistente a zeocina para que dicha resistencia no pudiera interferir en el tratamiento, pues el plásmido usado para los estudios de expresión anteriores era resistente a neomicina, que es un antibiótico aminoglicósido.

Todas las mutaciones fueron introducidas en el contexto haplotípico p.358V; 384S.

### Transcripción / traducción *in vitro*

Debido a las limitaciones de tiempo inicialmente se pensó en evitar los estudios de expresión heteróloga en cultivos celulares y optar por un proceso de transcripción y traducción *in vitro* más rápido. Se probó el método TNT® T7 Coupled Reticulocyte Lysate System (Promega) para transcribir los plásmidos portadores del cDNA *ARSB* mutado con mutaciones de terminación prematura y realizar las incubaciones con el antibiótico *in vitro*. Mediante un sistema de detección basado en estreptoavidina y peroxidasa ácida (*Trascend™ Non-Radioactive Translation Detection Systems*) se pretendía detectar un aumento en los niveles de producción de proteína no truncaada.

El uso de un sistema de membranas microsomaes pancreáticas caninas garantizaba en principio un procesamiento post-traducciona correcto de la

*ARSB*. No obstante, no se pudo obtener ninguna evidencia de síntesis de la proteína *ARSB* a partir de ninguno de los plásmidos utilizados, ni siquiera a partir de cDNA *ARSB* WT en forma lineal, a pesar de que el sistema sí producía proteína control luciferasa. Las minipreparaciones de plásmido estaban bien concentradas y no parecían tener contaminaciones por calcio o etanol que pudieran afectar a la reacción. Se intentaron evitar posibles problemas de incompatibilidad del promotor de la transcripción clonando el cDNA en el plásmido recomendado por el fabricante, pCMVTNT, sin resultado. Por ello se realizaron finalmente los estudios de expresión heteróloga y las medidas enzimáticas de la *ARSB* mutada a partir de células COS-7. De todos modos, los tamaños predichos de algunas de las proteínas truncadas eran demasiado pequeñas para que pudieran ser observadas fácilmente por esta u otras técnicas (15,8 KDa para p.W146X; 17,6 KDa para p.R160X; 35,9 KDa para p.W322X y 56,2 KDa para p.Q503X según el programa *PeptideMass*), y podrían ser inestables y sufrir degradación.

### Medida de la actividad enzimática *ARSB*

Los estudios bioquímicos de valoración enzimática de la actividad *ARSB* se realizaron esta vez en nuestro laboratorio y no en el Institut de Bioquímica Clínica (Barcelona), pero adaptando el mismo protocolo explicado en el Capítulo II (*ver página 108*) y aumentando el número de réplicas (un mínimo de 4).

La Tabla 3-2 (*página siguiente*) resume los resultados de actividad enzimática de dichos estudios.

La dificultad de obtener los valores de actividad *ARSB* en fibroblastos, donde se parte de menor concentración de

proteína que en los estudios de sobreexpresión, explican la ausencia de resultados sobre el tratamiento de G418

(geneticina) en fibroblastos de paciente, de manera que sólo se publicarán los resultados obtenidos con gentamicina.

**Tabla 3-1. Cebadores utilizados en la mutagénesis dirigida para la creación de mutaciones sin sentido**

Mutación	Secuencia del cebador	N	Tm°C	%GC
p.R160X	F: 5'-GCCTTCCAACCCGCTGAGGATTTGATACCTAC-3' R: 5'-CGGAAGGTTGGGCGACTCCTAAACTATGGATG-3'	32	79,1	53,1
p.W146X	F: 5'-CATATGGTTCGGAAAATGACACCTGGGAATGTACCG-3' R: 5'-GTATACCAGCCTTTTACTGTGGACCCTTACATGGC--3'	35	79,3	48,6
p.W322X	F: 5'-GGAGCCTGTGAGAAGGAGGCGTCCG-3' R: 5'-CCTCGGACACTCTTCCTCCGCAGGC-3	25	78,4	68
p.Q503X	F: 5'-GCTCCTGTCCCGCCTATAGTTCTACCATAAACAC-3' R: 5'-CGAGGACAGGGCGGATATCAAGATGGTATTTGTG-3'	34	79,2	50

El nucleótido cambiado está en negrita. F: *forward*; R: *reverse*. Tm: temperatura de disociación del cebador.

**Tabla 3-2. Cuadro de actividades enzimáticas de mutaciones sin sentido antes y después del tratamiento con gentamicina**

Mutación y entorno haplotípico		Actividad ARSB	Actividad ARSB corregida	% actividad ARSB respecto WT*
p. 358V; 384S 0 µg/ml	Promedio (n=10)	1616,96	1598,66	100
	Desviación	565,21	565,21	35,36
p. 358V; 384S 800 µg/ml	Promedio (n=10)	1617,67	1599,4	100
	Desviación	487,62	487,62	30,49
p.W146X 0 µg/ml	Promedio (n=16)	29,76	11,24	0,70
	Desviación	8,56	9,18	0,57
p.W146X 800 µg/ml	Promedio (n=16)	53,99	35,71	2,23
	Desviación	15,88	15,88	0,99
p.R160X 0 µg/ml	Promedio (n=10)	35,63	17,33	1,08
	Desviación	11,71	11,71	0,73
p.R160X 800 µg/ml	Promedio (n=10)	45,95	27,67	1,73
	Desviación	11,8	11,8	0,74
p.W322X 0 µg/ml	Promedio (n=4)	56,26	37,96	2,37
	Desviación	23,52	23,52	1,47
p.W322X 800 µg/ml	Promedio (n=4)	89,19	70,91	4,43
	Desviación	30,55	30,55	1,91
p.Q503X 0 µg/ml	Promedio (n=4)	46,08	27,78	1,74
	Desviación	2,75	2,75	0,17
p.Q503X 800 µg/ml	Promedio (n=4)	52,78	34,5	2,16
	Desviación	6,32	6,32	0,4
Control pcDNA3 0 µg/ml	Promedio (n=4)	18,30	0	0
	Desviación	2,66	2,66	0,2
Control pcDNA3 800 µg/ml	Promedio (n=4)	18,28	0	0
	Desviación	6,57	6,57	0,4

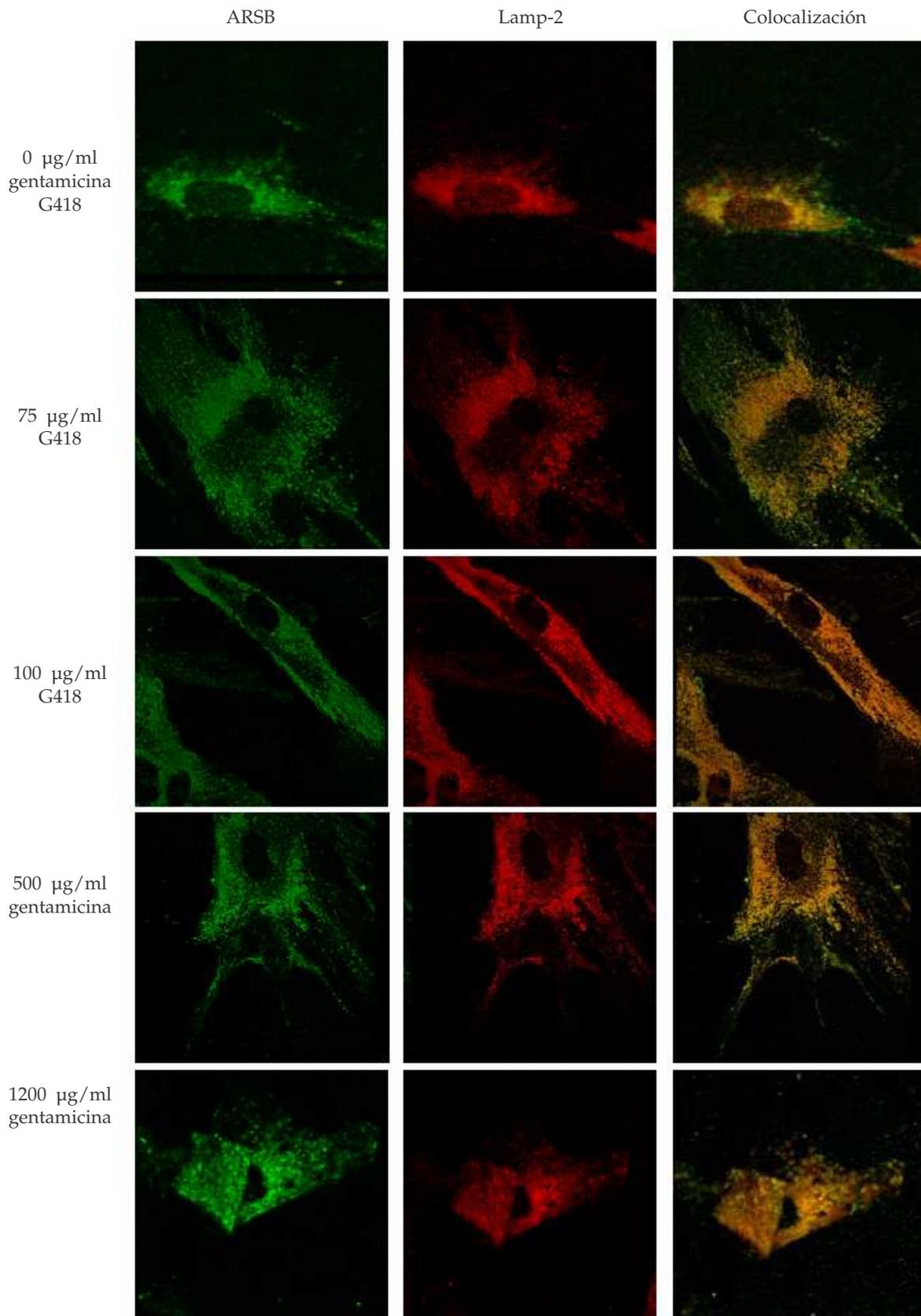
Actividades enzimáticas expresadas en nmoles/h. mg. Actividad corregida restando el valor de actividad del control pcDNA3 con la misma concentración de antibiótico. n: número de réplicas.

\* Porcentajes respecto proteína salvaje con el mismo entorno haplotípico p.358V; 384S y la misma concentración de antibiótico.

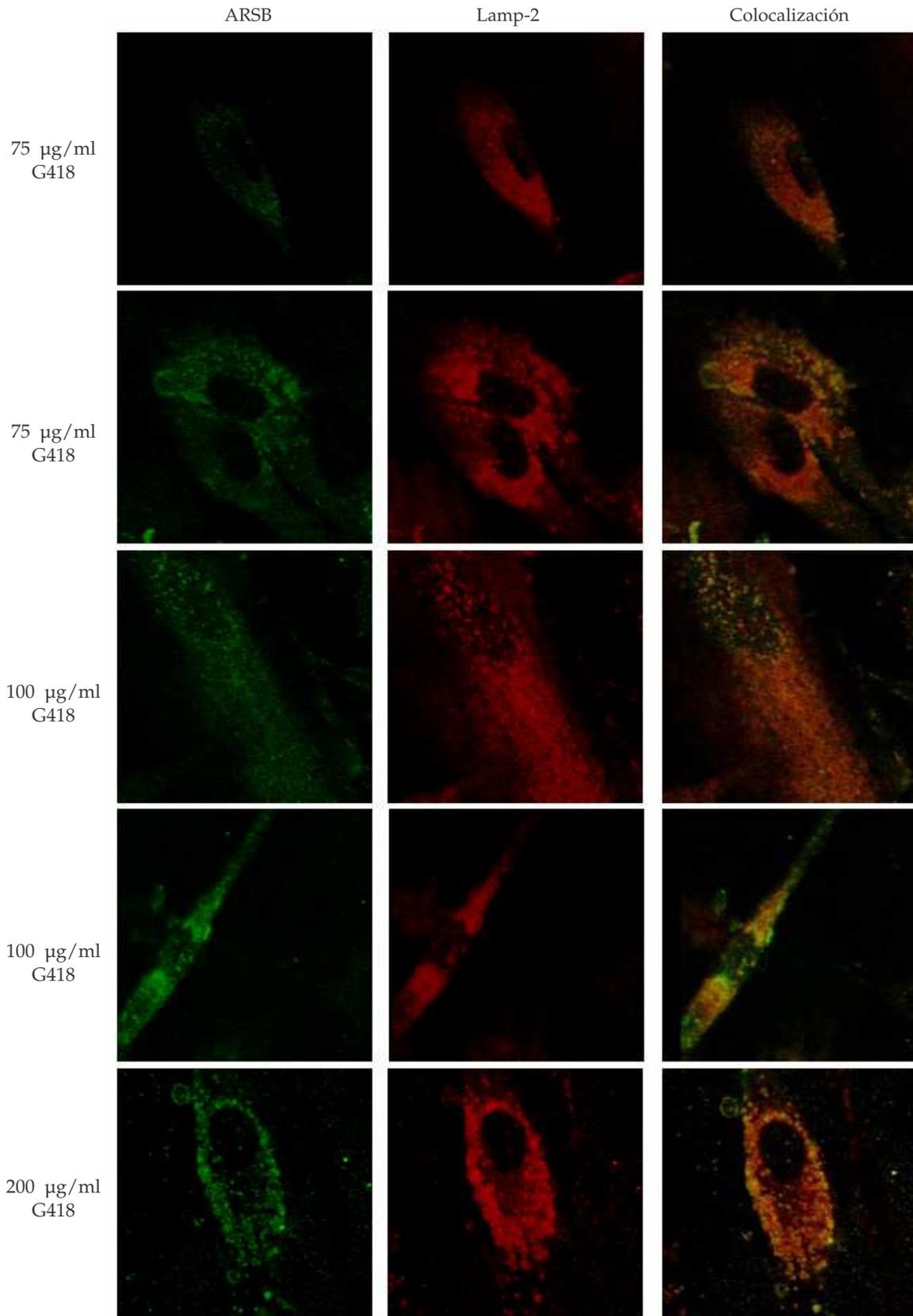
### **Localización intracelular de ARSB mutada en fibroblastos**

Los problemas para realizar estudios de inmunolocalización en células COS ya fueron reseñados en el anterior capítulo. Aparte de las incluidas en el artículo, pueden verse más imágenes de los efectos sobre fibroblastos del paciente ML4 tratados con gentamicina y geneticina en las Figuras 3-2 y 3-3 (*página 148 y 149*).

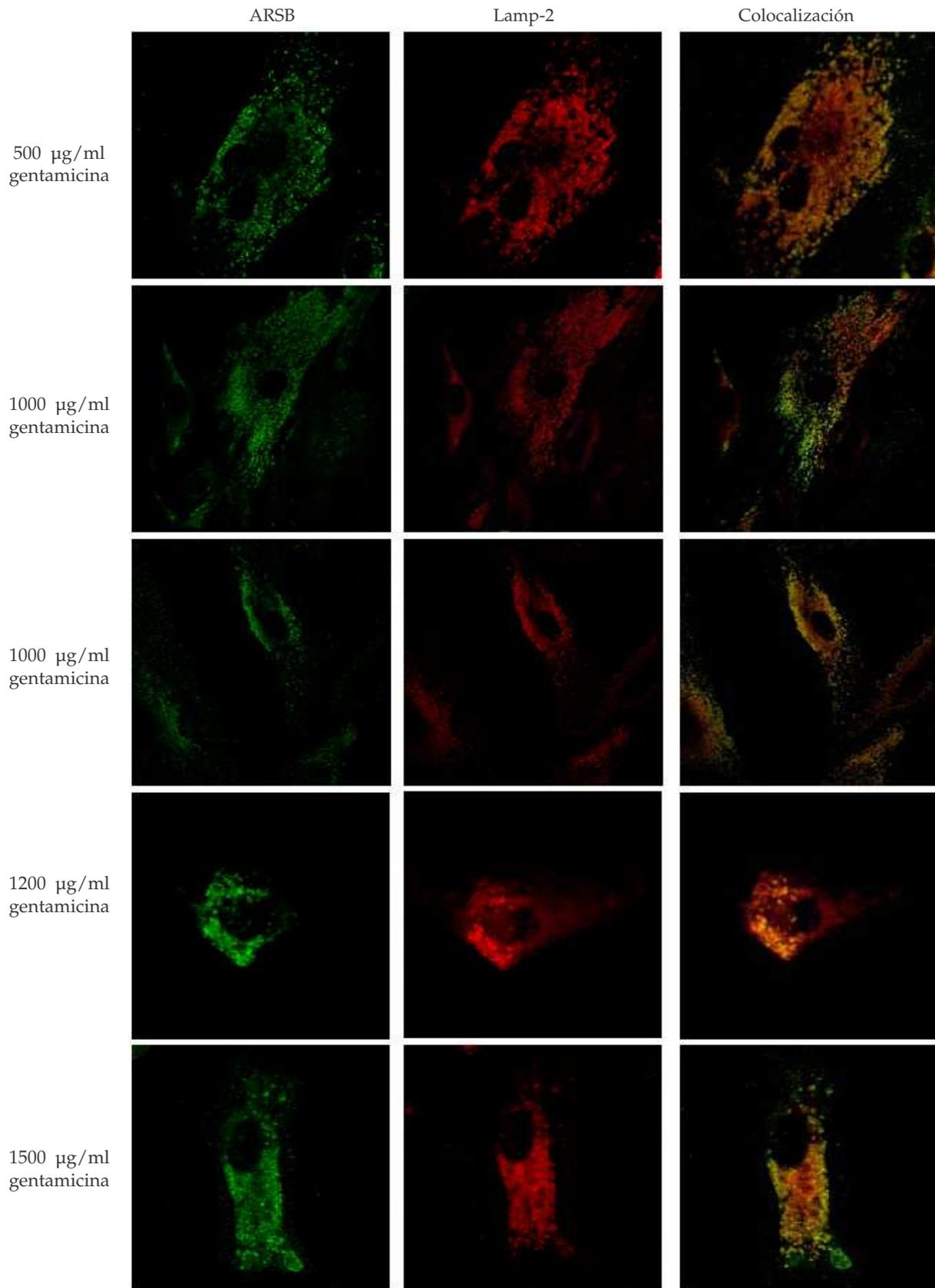
Por problemas de tiempo sólo se realizaron ensayos de recuperación de actividad con gentamicina a una concentración de 800 µg/ml que, según los ensayos de toxicidad y por las referencias bibliográficas, parecía la concentración óptima y más alta entre las seguras. En los cultivos destinados a inmunofluorescencia se pudieron probar concentraciones más altas, si bien las células empezaron a mostrar variaciones morfológicas al cabo de unos días debido a la toxicidad.



**Figura 3-1.** Localización de la proteína ARSB en fibroblastos control (p.358V; 384S) tras el tratamiento con gentamicina (G418) y gentamicina. Verde: ARSB marcada con FITC (dilución de anticuerpo primario y secundario: 1:75). Rojo: Lamp-2 (marcador de lisosomas) conjugado con Alexa 660 (dilución de anticuerpo primario y secundario: 1:100). No están representadas todas las concentraciones que se probaron.



**Figura 3-2.** Localización de la proteína ARSB en fibroblastos ML4 (p.W322X; c.427delG) tras el tratamiento con geneticina (G418). Verde: ARSB marcada con FITC (dilución de anticuerpo primario y secundario: 1:75). Rojo: Lamp-2 (marcador de lisosomas) conjugado con Alexa 660 (dilución de anticuerpo primario y secundario: 1:100).



**Figura 3-3.** Localización de la proteína ARSB en fibroblastos ML4 (p.W322X; c.427delG) tras el tratamiento con gentamicina. Verde: ARSB marcada con FITC (dilución de anticuerpo primario y secundario: 1:75). Rojo: Lamp-2 (marcador de lisosomas) conjugado con Alexa 660 (dilución de anticuerpo primario y secundario: 1:100).



# *Discusión*



## DISCUSIÓN

### 1. Motivo de la tesis

El motivo principal de este trabajo fue el análisis, por vez primera en la literatura, de las mutaciones presentes en pacientes españoles y argentinos con mucopolisacaridosis de tipo VI o síndrome de Maroteaux-Lamy. Posteriormente se añadieron al estudio pacientes de otras nacionalidades: un paciente belga y dos estadounidenses de origen dominicano. De forma paralela hemos realizado el diagnóstico molecular de familiares de algunos de dichos pacientes.

La caracterización genotípica completa es un paso necesario para abordar el establecimiento de correlaciones genotipo-fenotipo fiables en una enfermedad genética. En el caso de la MPS VI, el hecho de que la mayoría de pacientes tengan mutaciones privadas y sean heterocigotos compuestos dificulta el establecimiento de este tipo de correlaciones. Los datos obtenidos han permitido realizar cálculos de frecuencias alélicas en la población española e investigar el origen de las mutaciones más prevalentes.

Además, el análisis mutacional abre las puertas a los estudios funcionales de las nuevas mutaciones identificadas, con el objetivo de profundizar en la comprensión del mecanismo patogénico. En los últimos 15 años se han realizado estudios funcionales de menos de la mitad de las mutaciones identificadas hasta ahora en el gen *ARSB* (Wicker *et al.*, 1991; Jin *et al.*, 1992; Arlt *et al.*, 1994; Isbrandt *et al.*, 1994; Litjens *et al.*, 1996; Bradford *et al.*, 2002; Brooks *et al.*, 2005; Dou *et al.*, 2006; Karageorgos *et al.*, 2004 y 2007a). Esta tesis contribuye al estudio funcional de 9 mutaciones y polimorfismos en el gen *ARSB*.

Finalmente, el análisis mutacional también es un requisito previo deseable para predecir la eficacia de la terapia de restitución enzimática y considerar la aplicación de otros tipos de terapia en el futuro, como la modulación de la degradación del RNA mediada por codones sin sentido (NMD) o la supresión de codones de terminación mediante antibióticos aminoglicósidos (*ver página 56*). Los experimentos que aquí se presentan demuestran que esta última aproximación terapéutica es factible en el caso de la MPS VI y dan pie a posteriores investigaciones.

### 2. Fenotipo clínico de los pacientes de MPS VI españoles y argentinos

La información relativa al fenotipo clínico de los pacientes analizados aquí ha sido escasa, especialmente con los pacientes de origen no español, aunque en la mayoría de casos se disponía de la reseña de los principales síntomas clínicos y la concentración de glicosaminoglicanos excretados en orina. No obstante, la clasificación clínica de los pacientes se pudo realizar a semejanza de otros autores (*ver páginas 19 y 71*), en base a la interpretación de los síntomas clínicos, la edad de diagnóstico que manejábamos y la mayor o menor excreción de GAG en orina, cuando este dato era conocido.

Cabe destacar el caso de dos pacientes (ML4 y ML11) que presentaban retraso psicomotor severo y que se suman a los pocos casos descritos hasta la fecha de pacientes de MPS VI con retraso psicomotor (Taylor *et al.*, 1978; Paterson *et al.*, 1982; Vestermark *et al.*, 1987). Walkley y colaboradores (2005) proponen que la terapia de sustitución enzimática que está empezando a administrarse para tratar la MPS VI, y que conlleva un aumento de la supervivencia del paciente, podría conducir en algunos casos a la aparición de síntomas neurológicos que normal-

mente no llegan a presentarse dada la temprana mortalidad.

### 3. Distribución y prevalencia de las mutaciones encontradas en el gen *ARSB*

La mayoría de los 21 alelos diferentes encontrados en nuestro estudio son privados y están presentes en heterocigosis en un único paciente. La mutación más prevalente es la c.1143-1G>C (7/38 alelos; 18% del total), que altera un sitio de *splicing* y que está presente tanto en población española como argentina, seguida de la c.1143-8T>G (4/38 alelos; 10,5%), p.P313A (3/38 alelos, 8%) y p.G324V (3/38 alelos, 8%), esta última presente en población de origen dominicano. La mutación p.R315Q, la segunda más frecuente en Brasil (Petry *et al.*, 2003), se encontró en 1 alelo de 38, en un paciente argentino. No se han encontrado en la serie de pacientes estudiados otros alelos frecuentes descritos en la bibliografía, como p.R152W (Rusia), p.Y120C, p.H393P o c.1533\_1555del (Brasil, *ver página 45*).

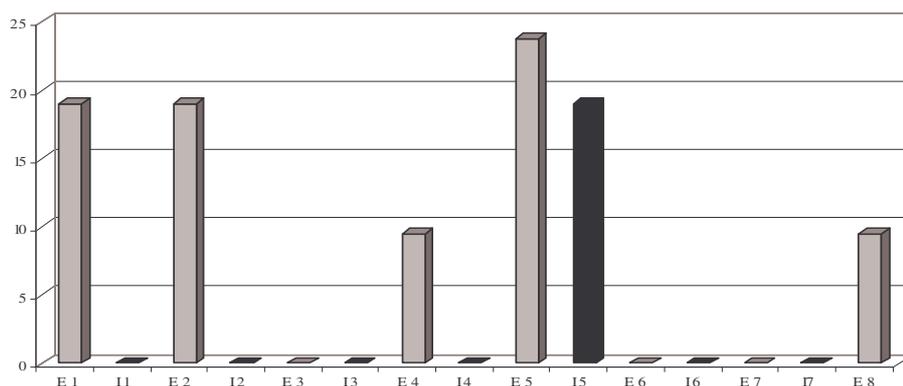
El análisis haplotípico de varios polimorfismos intragénicos que flanquean las mutaciones comunes encontradas en nuestra serie de pacientes parece indicar que los distintos alelos c.1143-8T>G, c.427delG, c.1143-1G>C y p.C447F tienen un origen único, aunque sería deseable ampliar los haplotipos con nuevos polimorfismos para tener una certeza estadística.

### 4. Análisis del gen *ARSB*: búsqueda de mutaciones causantes del síndrome de Maroteaux-Lamy

Se han identificado el 100% de los alelos *ARSB* mutados en 19 pacientes de MPS VI. En total, se han descrito 21 alelos diferentes en regiones codificantes o periexónicas del gen *ARSB*, de los cuales 9 no habían sido descritos previamente. Aproximadamente el 57% de los alelos corresponden a mutaciones de cambio de sentido, el 14,3% a mutaciones que afectan a lugares de corte y empalme de exones (*splicing*), el 19% son pequeñas y grandes deleciones y el 9,5% son mutaciones sin sentido; la inmensa mayoría se encuentran en regiones codificantes (Figura 1-1), siendo el exón 5 y el intrón 5 las regiones en las que se acumulan más mutaciones. En la población general de pacientes de MPS VI (*ver página 45*) las mutaciones están más repartidas a lo largo de todos los exones, si bien los exones 1 y 5 son los que concentran la mayor parte de cambios. Las mutaciones de *splicing* y sin sentido se encuentran sobrerrepresentadas en nuestra población.

La patogenicidad de dichos cambios fue establecida mediante análisis de población control y estudios funcionales.

A continuación se hará un breve comentario resumen sobre cada uno de dichos alelos.



**Figura 1-1.** Distribución de las mutaciones encontradas en pacientes de MPS VI a lo largo del gen *ARSB*. Eje Y: porcentaje respecto al total de alelos identificados (21). E: exón (en gris). I: intrón (en negro).

### Mutaciones de cambio de sentido

En total se han encontrado 12 mutaciones de cambio de sentido diferentes en el grupo de pacientes analizados, que representan el 57% del total de alelos distintos identificados.

#### *p.L82R (c.245T>G)*

Esta mutación se encontró en homocigosis en un paciente español (ML2) y no había sido descrita con anterioridad. Karageorgos *et al.* (2007b) han descrito recientemente en un paciente alemán un polimorfismo sinónimo localizado en la misma posición (p.L82L), no presente en las bases de datos de SNPs, así como una mutación patogénica en el aminoácido contiguo (p.D83Y) asociada a la forma leve de la enfermedad. En nuestro caso el paciente ML5 manifiesta un fenotipo intermedio o severo.

Dicha mutación se localiza hacia el exterior de la proteína, fuera de las secuencias consenso comunes entre las sulfatasas y fuera de los residuos conservados del sitio catalítico, pero en un aminoácido conservado en la secuencia del gen *ARSB* de todos los mamíferos analizados. Según los programas de predicción de estructuras secundarias el cambio aminoacídico no parece afectar la conformación de la hélice  $\alpha$  de la que forma parte.

Los transcritos de mRNA para dicha mutación no parecen sufrir degradación si los comparamos con los niveles de mRNA salvaje, tal como era de esperar.

La mutación conlleva la reducción de la actividad *ARSB* hasta menos de un 3% respecto a la *ARSB* salvaje y una reducción casi del 50% en la producción total de proteína, de la cual el 95% se encuentra en forma precursora y apenas

se metaboliza a forma madura. No obstante, la proteína madura localiza en el lisosoma de las células de forma más apreciable que en el caso de otras mutaciones que alteran en mayor medida la estructura de la enzima.

#### *p.R95Q (c.284G>A)*

Fue descrita por Litjens *et al.* (1996) y se ha encontrado en pacientes australianos (Karageorgos *et al.*, 2007a). Se asocia a fenotipo severo y es una de las pocas mutaciones identificadas en este estudio que afecta claramente al núcleo catalítico de la *ARSB*, en concreto a un residuo al que se atribuyen funciones estabilizadoras del residuo formilglicina, indispensable para la actividad. Ofrecía menos de un 1% de actividad respecto a la *ARSB* salvaje en los estudios de expresión (Litjens *et al.*, 1996).

#### *p.Y138C (c.415A>G)*

Esta mutación, no descrita con anterioridad, se detectó en heterocigosis con la alteración de *splicing* c.1143-8T>G. Wicker *et al.* (1991) descubrieron que la mutación que afectaba al codón inmediatamente anterior (p.G137V) producía la degradación de la forma madura de la proteína y de la mayor parte de la forma precursora mediante estudios de *pulse-chase* durante 24 horas.

Este residuo no forma parte del sitio catalítico de la *ARSB* pero queda englobado dentro la región que algunos autores consideran importante para el ensamblaje del sitio catalítico (Hanson *et al.*, 2004). Reduce la actividad *ARSB* hasta menos del 4% de la actividad salvaje y los estudios de *western blot* confirman que la mayor parte de la proteína se encuentra en su forma precursora.

*p.R160Q (c.479G>A)*

Voskoboeva *et al.* (1994) describieron la mutación p.R160Q en heterocigosis con el cambio p.R160X en un paciente con fenotipo intermedio, al igual que el paciente español heterocigoto para esta mutación (ML3, junto con el cambio intrónico c.1143-1G>C). La actividad enzimática ARSB calculada en fibroblastos del paciente es de aproximadamente un 19% respecto a los valores controles, siendo la segunda actividad más elevada encontrada en nuestro grupo de pacientes. No ha sido expresada de forma heteróloga. Es de suponer que impide la correcta maduración de la proteína ARSB, pues en los estudios de inmunolocalización realizados en esta tesis los niveles de proteína en el interior de los lisosomas era muy escaso y no podían explicarse por el alelo c.1143-1G>C, que altera el *splicing* del mRNA.

El cambio no se encuentra en ninguna de las regiones del sitio catalítico o secuencias conservadas entre sulfatasas, aunque es un residuo conservado en las secuencias de la ARSB de mamíferos. El cambio de aminoácido no parece alterar la estructura secundaria de la proteína. Curiosamente, en la arilsulfatasa A el residuo correcto en la posición 160 es una glutamina (Q).

*p.S240F (c. 719C>T)*

Es una mutación descrita por primera vez en un paciente español, el ML16, en heterocigosis con la mutación c.1143-1G>C, y se asocia a un fenotipo intermedio. Queda muy cercana al residuo del sitio catalítico p.H242, implicado en la unión al sustrato, aunque es un aminoácido que sólo está presente en la secuencia ARSB humana. Wu *et al.* (2000) describieron una mutación en la posición inmediatamente anterior (p.Q239R) pero no hay datos sobre la gravedad de su fenotipo.

Produce una reducción de más del 50% en la producción de proteína ARSB y la mayoría se encuentra en forma precursora, aunque hay niveles apreciables de proteína madura en comparación con otras mutaciones de cambio de sentido. En estudios de inmunocolocalización se encuentran niveles apreciables de proteína en los lisosomas y deben ser atribuibles a este alelo, si bien la proteína manifiesta una actividad reducida a menos de un 5% de la salvaje. Si se expresa en el entorno haplotípico real en el paciente (p.358M/p.384S) la actividad disminuye hasta el 1% respecto al WT.

*p.P244T (c.730C>A)*

Mutación nueva descrita en heterocigosis en un paciente dominicano (ML20) junto con otra mutación de cambio de sentido (p.G324V) después de que los estudios de expresión presentados en esta tesis ya estuvieran finalizados. Por lo tanto, no se dispone de datos acerca de su actividad residual. De todos modos, sus posibles efectos sobre la estructura secundaria de la proteína pueden suponerse equiparables a las de la mutación p.S240F.

*p.G308R (c.922G>A)*

Mutación nueva encontrada en heterocigosis en un paciente argentino (ML14) junto con otra mutación de cambio de sentido (p.R315Q), produciendo un fenotipo intermedio a severo. Sorprende que el fenotipo no sea más grave dado que este alelo produce una reducción en la cantidad de proteína sintetizada superior al 50%, la síntesis de proteína madura queda prácticamente abolida y conlleva una actividad enzimática nula. El otro alelo no aporta tampoco actividad y además el paciente es portador del cambio p.S384N, una variante polimórfica con efectos funcionales (*ver página 164*).

El residuo p.G308 queda cercano a los residuos p.D300 y p.D301, implicados en la coordinación con el ion metal de la enzima (*ver página 40*), aunque no forme parte de las regiones conservadas entre sulfatasas ni entre la ARSB de diferentes especies. Villani *et al.* (1998) describieron la mutación próxima p.G302R, que sí que es un residuo conservado en todas las sulfatasas eucariotas y pertenece a un hexapéptido conservado en humano, rata y gato. La sustitución de una glicina neutra por una arginina cargada positivamente puede alterar la estructura de la región.

*p.P313A (c. 937C>G)*

Esta mutación fue descrita por Brooks *et al.* (2005) cuando nuestro manuscrito sobre análisis mutacional estaba en preparación y realizábamos los ensayos de actividad. Esa es la razón por la cual se incluye una mutación ya descrita en los estudios de expresión y en los análisis de *western blot*. En el grupo de pacientes españoles analizados, esta mutación se halló en hemicigosis en el paciente ML1 junto con el alelo c.899\_1142del, después de que los estudios de RT-PCR sobre RNA revelaran dos transcritos de tamaño diferente y pudiera descartarse la homocigosis del alelo p.P313A, tal como se había pensado en un principio. Posteriormente se encontró dicha mutación en homocigosis en el paciente belga ML17, sin posibilidad de estudiar su RNA. Ambos pacientes parecen manifestar un fenotipo intermedio.

Esta mutación fue expresada por Brooks *et al.* (2005) y no se detectó actividad enzimática, aunque en nuestro sistema de expresión heteróloga tenía algo menos de un 4% de actividad respecto a la ARSB salvaje. También produce una reducción importante en la producción de proteína total, especialmente la madura.

Esta mutación se encuentra próxima a la lisina 318, que es uno de los aminoácidos del núcleo activo implicados en la unión al sustrato (Hopwood y Ballabio, 2001; Hanson *et al.*, 2004), pero en la estructura tridimensional de la molécula de ARSB queda alejada de los dominios catalíticos. Por lo demás, no pertenece a las regiones consenso entre sulfatasas y la posición sólo está conservada en rata.

La mutación en el mismo aminoácido p.P313S fue descrita por Karageorgos *et al.* (2007b) pero no se dispone de datos sobre el fenotipo asociado o su actividad en ensayos de expresión.

*p.R315Q (c.944G>A)*

Se encuentra en heterocigosis en el paciente argentino ML14, junto con el alelo p.G308R, asociado a un fenotipo intermedio a severo. Fue descrita por Villani *et al.* (1999) y expresada por el grupo de Karageorgos (2007a), dando lugar a una actividad enzimática no detectable. A nivel molecular, sus implicaciones pueden ser parecidas a las del cambio p.P313A.

Esta mutación es especialmente frecuente en pacientes procedentes del norte de Portugal y Brasil (Petry *et al.*, 2005; Karageorgos *et al.*, 2007b; *ver página 59*), y se sospecha que se produjo un efecto fundador, aunque nadie ha realizado estudios haplotípicos para confirmarlo. Se ha descrito a menudo en homocigosis en los pacientes y además en muchos casos el alelo p.S384N está presente en el mismo cromosoma como tercer cambio en el paciente. En el caso del paciente ML14 la fase para el SNP p.S384N no está establecida pero si nos guiáramos por los haplotipos que se han publicado, la mutación p.R315Q estaría presente en el mismo cromosoma que p.S384N.

*p.G324V (c.971G>T)*

Se encontró en homocigosis y en heterocigosis en los pacientes de origen dominicano ML18 y ML19, respectivamente. Fue descrita inicialmente en varios pacientes estadounidenses (Karageorgos *et al.*, 2007b). No se dispone de datos fenotípicos ni de expresión, si bien es probable que sea una mutación severa ya que la actividad ARSB medida en fibroblastos de los pacientes no era detectable en ninguno de los casos. Se localiza en una región bastante conservada entre sulfatasas y entre las proteínas ARSB de diferentes mamíferos, pero no forma parte del sitio catalítico.

*p.C447F (c.1340G>T)*

Esta mutación fue publicada por Karageorgos *et al.* (2007b). La encontramos en heterocigosis en dos pacientes españoles junto a sendos alelos sin actividad enzimática (c.427delG y c.1143-1G>C), pero asociada a un fenotipo severo (ML10) en un caso y a un fenotipo intermedio en el otro (ML15). Curiosamente, en el paciente alemán en el que fue descrita por otros autores se encontraba también en heterocigosis con la mutación c.427delG. Aunque el grupo de Karageorgos no detalla los haplotipos de ese paciente, es probable que el alelo p.C447F también esté en fase con la variante p.358M, igual que en el paciente español, y también en fase con el alelo c.1143-27A, lo cual resolvería los haplotipos dudosos en los pacientes españoles portadores de la mutación c.427delG (que de esta manera se supondrían en fase con el alelo c.1143-27C, *ver página 79*).

La mutación p.C447F está situada cerca de un sitio potencial de glicosilación. Los cambios en los lugares de glicosilación podrían afectar a la captación de la enzima por parte de los diferentes tipos celulares, dado que las

formas de la enzima con glicosilación diferente no se unen con la misma afinidad al receptor manosa-6-fosfato de la membrana del Golgi (Fuller *et al.*, 1998). No es un residuo conservado pero la alteración de una cisteína podría afectar la formación del puente disulfuro que se crea entre los residuos 405 y 447 (*ver Figura 3-5 de la página 38*). En la misma posición se encuentra el cambio p.C447S (Karageorgos *et al.*, 2007b).

En nuestros estudios de expresión la proteína mutada tenía una actividad enzimática casi nula. Además, la proteína madura tenía escasa presencia en el contexto p.358V, pero en el contexto de los pacientes (p.358M) prácticamente no se detectó ni proteína madura ni actividad.

*p.L472P (c.1415T>C)*

La mutación p.L472P está presente en un paciente español con fenotipo intermedio (ML6, en heterocigosis con un cambio intrónico que provoca el salto de un exón) y fue descrita por Karageorgos *et al.* (2007b) cuando nuestro primer artículo estaba en revisión.

Se encuentra en un residuo próximo a la posición 476. La mutación p.L476P es responsable de un fenotipo severo en la forma felina de la MPS VI (Yogalingam *et al.*, 1998), no presentaba actividad en los estudios de expresión y se observó sólo en su forma precursora. El residuo 476 está conservado entre otras 6 sulfatasas y se especula que este aminoácido podría ser necesario para la integridad funcional de la proteína.

La posición 472 no está conservada entre especies animales ni entre sulfatasas. En nuestros estudios de expresión tiene una actividad inferior al 1% comparada con la ARSB salvaje y menos del 12% de proteína total

sintetizada se encuentra en forma madura.

### Mutaciones sin sentido

Sólo 2 de los 21 alelos identificados en el gen ARSB en nuestro grupo de pacientes son mutaciones sin sentido. Estos cambios son candidatos a sufrir NMD, y en el caso de que haya cierta producción proteica, dan lugar a productos truncados en los que falta más de una tercera parte de los residuos.

#### *p.R160X (c.478C>T)*

Fue descrita inicialmente por Voskoboeva *et al.* (1994) y se encuentra en homocigosis en el paciente español ML8. La proteína truncada resultante conserva menos del 30% de aminoácidos de la salvaje. Se ha asociado en todos los pacientes descritos al fenotipo severo.

Al ser una de las mutaciones sin sentido encontrada en nuestra serie de pacientes, fue seleccionada en los estudios de supresión de codones de terminación prematura mediante antibióticos aminoglicósidos (*ver página 168*).

#### *p.W322X (c.966G>A)*

Fue descrita por nuestro grupo en heterocigosis con el cambio c.427delG en un paciente español (ML4) con fenotipo intermedio a severo. La proteína truncada resultante ha perdido un tercio de sus residuos.

Al disponer de fibroblastos de este paciente pudimos realizar estudios sobre mRNA; los dos alelos del paciente predicen terminación prematura y mediante estudios de RT-PCR y tratamiento de las células con cicloheximida pudimos comprobar que ambos alelos contribuyen a la

degradación de los transcritos por el mecanismo de NMD.

A nivel celular, la degradación del mRNA explica la baja presencia de proteína madura en el interior de los lisosomas, que se intentó aumentar con los experimentos de supresión de codones de terminación con gentamicina (*ver página 168*).

### Deleciones

Se han identificado cuatro mutaciones por deleción, que representan un 19% de los 21 alelos distintos identificados. Todas ellas provocan un desplazamiento de la pauta de lectura, con aparición de codones de parada prematuros.

#### *c.237\_243delGGTGCTC (p.V80WfsX32)*

Se encontró en heterocigosis con la mutación de *splicing* c.1143-8T>G en el paciente español ML7, asociada a fenotipo severo. Produce un cambio de pauta de lectura y una proteína truncada que tiene menos del 25% de aminoácidos de la salvaje. Fue descrita inicialmente por Voskoboeva *et al.* (1994)

#### *c.238delG (p.V80CfsX34)*

Fue descrita inicialmente por Litjens *et al.* (1992). Se encontró en heterocigosis con la mutación de *splicing* c.1142+2T>A en los pacientes gemelos ML9a y ML9b, y produce un cambio de pauta de lectura y una proteína resultante con menos del 25% de aminoácidos de la salvaje. Está asociada a fenotipo intermedio, aunque estos pacientes empezaron a recibir pronto la terapia de sustitución enzimática, y la aparición de los síntomas más graves puede haberse enlentecido.

Se dispuso de células maternas (portadoras de la mutación) con las cuales pudieron realizarse estudios de RT-PCR y

tratamiento con cicloheximida para evaluar si el alelo era responsable de degradación del mRNA por NMD. Pese al ensayo de distintas condiciones experimentales no se obtuvieron resultados consistentes.

Los únicos alelos de terminación prematura que no parecen producir NMD son los que se localizan en el último exón (lo cual es lógico teniendo en cuenta los mecanismos moleculares que han de tener lugar para que se produzca el NMD, *ver página 59*) o muy próximos al codón de inicio de la traducción. Se hipotetiza que este fenómeno de la reiniciación se debe a que existe un codón AUG muy próximo al codón de terminación prematura, y entonces el transcrito se sigue sintetizando y escapa a la degradación por NMD (Perrin-Vidoz *et al.*, 2002).

Sin embargo, no parece posible que en el caso de la mutación c.238delG pueda producirse un fenómeno de reiniciación de la transcripción que evite el NMD, dado que el cambio de pauta de lectura causado por la mutación, si bien da lugar a la aparición de numerosos codones para metionina posteriores, cercanos al codón de terminación prematura, también produce la creación de sucesivos codones de terminación muy cerca de dichos codones para metionina, con lo cual un nuevo inicio de transcripción se vería igualmente abortado.

*c.427delG (p.V143SfsX41)*

Fue descrita por Karageorgos *et al.* (2004) cuando la habíamos identificado en un paciente español. Produce un cambio de pauta de lectura y la proteína truncada conserva menos del 35% de aminoácidos de la ARSB salvaje. Se encontró en heterocigosis en dos pacientes españoles diferentes (ML4, con la mutación p.W322X y fenotipo intermedio a severo,

y ML10, con la mutación p.C447F y fenotipo severo).

Era candidata a producir degradación de mRNA mediante NMD, y así se puso de manifiesto tras estudios de tratamiento con cicloheximida (*ver página 101*)

Pese a que el paciente ML4 tenía el mayor porcentaje de actividad ARSB en fibroblastos (23% del control), en los estudios de inmunofluorescencia parece que apenas tiene proteína madura contenida en lisosomas y los resultados podrían indicar que la proteína truncada pudiera haber quedado retenida en el RE para su degradación.

*c.899\_1142del (p.T299fsX194)*

Arlt y colaboradores (1994) describieron una delección genómica que incluía el exón 5 pero cuya extensión exacta no fue determinada, ya que todavía no se había establecido la secuencia de los intrones 4 y 5 del gen *ARSB*. Recientemente, Karageorgos *et al.* (2007a) encontraron en heterocigosis una delección genómica que incluía el exón 5, y si bien tampoco describieron sus límites, bien podría tratarse de la misma delección descrita por el grupo de Arlt.

La ausencia del exón 5 (de 244 pb) a nivel del mRNA provoca un cambio en la pauta de lectura que da lugar a una terminación prematura de la traducción con un polipéptido resultante de 491 aminoácidos.

En el grupo de pacientes españoles analizados esta mutación se halló junto con el alelo p.P313A en un único paciente (ML1, fenotipo intermedio), gracias a que la disponibilidad de RNA permitió descubrir dos transcritos de tamaño diferente. Lamentablemente la línea de células se perdió y no se pudo comprobar si esta delección, que al igual que el

cambio 1142+2T>A da lugar a un transcrito sin el exón 5, producía NMD.

Durante la realización de este trabajo nos planteamos definir la extensión precisa de esta deleción genómica. Una posible causa de la deleción, que podría ser muy extensa, sería un entrecruzamiento inter (en *trans*) o intracromosómico (en *cis*) entre secuencias repetidas (normalmente, Alu). Las Alus son elementos SINE de unos 300 pb que se encuentran frecuentemente en intrones y constituyen un 10% del genoma humano. Los reordenamientos provocados por secuencias Alu de la misma familia ya se ha identificado como causa de más de una veintena de enfermedades hereditarias y cánceres (Ricci *et al.*, 2003), incluyendo una doble deleción en el gen de la *N*-acetilgalactosamina-6-sulfatasa, responsable de la MPS IIID (Deininger *et al.*, 1999). La gran mayoría de secuencias Alu implicadas en enfermedades genéticas se insertan dentro de regiones codificantes, o en intrones relativamente cerca de un exón y en lugares donde puedan afectar el proceso de corte y empalme de exones. Además se ha propuesto que un núcleo de 26 pb bastante conservado entre todas las familias de Alu podría ser un punto caliente recombinacional.

Si esto fuera aplicable al caso de la deleción que nos ocupa, una explicación plausible de su origen podría ser una recombinación entre una Alu situada en el intrón 4 y otra de la misma familia en el intrón 5. En los intrones 4 (de unas 69,5 Kb) y 5 (46 Kb) del gen *ARSB* se identificaron más de 40 elementos Alu y MIR (programa *RepeatMasker*) que podrían dar lugar a la recombinación. Mediante alineamiento múltiple CLUSTAL entre las diferentes familias de secuencias Alu más representadas en esos intrones (AluSx, AluJb y AluJo) se observó que el número de posibles parejas de Alus de la misma familia a ambos lados del exón 5 era tan elevado

que resultaba difícil escoger las mejores candidatas para el posterior análisis molecular.

Una opción para determinar los límites de la deleción sería amplificar por PCR sobre DNA genómico la región colindante a las secuencias y ver si hay reducción de dosis en el caso de que no se anillen los cebadores. Sin tener que recurrir a la PCR en tiempo real, podrían realizarse PCR semicuantitativas amplificando fragmentos de aproximadamente 1 Kb por cada 10 Kb de los intrones 4 y 5 (unas 6 reacciones para el intrón 4 y unas 4 para el otro) para empezar a acotar la región implicada.

Otras estrategias propuestas para acotar la región exacta del genoma afectada por la deleción son el análisis de polimorfismos de tipo microsatélite o SNP con el objetivo de detectar descompensación de dosis, o el análisis de *Southern blot* con diferentes sondas de la región. Finalmente se deshechó la idea de delimitar la extensión de la deleción al considerar que la cantidad de trabajo que reportaba no compensaba los resultados.

### Mutaciones implicadas en el mecanismo de corte y empalme de exones

Las mutaciones que afectan lugares moduladores de corte y empalme de exones (*splicing*) pueden dar lugar a moléculas de RNA más largas o más cortas de lo normal, alterando la región codificante. Si una mutación destruye un sitio de *splicing*, la maquinaria de corte y empalme (spliceosoma) utiliza a veces el siguiente sitio o reconoce un lugar críptico que antes no era utilizado.

*c.1142+2T>A (p.D300VfsX193)*

Es una mutación nueva descrita en heterocigosis en los pacientes ML9a y ML9b, hermanos, que cambia la secuencia donadora de *splicing* consenso de GT a

GA. Como consecuencia, el mRNA no retiene el exón 5, de 244 nucleótidos de longitud, y se rompe la pauta de lectura. Sólo cuando se dispuso de células fibroblásticas del progenitor paterno, portador de la mutación, se pudo caracterizar el transcrito aberrante mediante RT-PCR y secuenciación. La mutación reúne las condiciones para promover la degradación del mRNA mediante NMD, hecho que corroboran los experimentos con cicloheximida y RT-PCR, aunque la recuperación es muy débil.

*c.1143-8T>C (p.S381RfsX12)*

Petry *et al.* (2005) describieron la mutación *c.1143-8T>G* en población brasileña pero no analizaron su efecto sobre el *splicing*. Es un caso claro de cómo una mutación en la serie de pirimidinas situada en el extremo 3' del intrón puede disminuir la eficiencia de corte y empalme de exones, hasta modificar del todo la selección de lugares de corte dando lugar a un mRNA sin uno de los exones, en este caso el exón 5.

Las mutaciones que afectan a regionesceptoras de *splicing* suelen estar como mucho en la posición -3 respecto al inicio del exón (Krawczak *et al.*, 2006), pero se han descrito mutaciones en la serie de pirimidinas a 3' en las posiciones -7, -8 y -13, que afectan negativamente al ensamblamiento correcto del mRNA (Cooper *et al.*, 2001; Loudianos, 2002). Al quedar inutilizado el sitio aceptor habitual, la maquinaria de *splicing* usa a veces el siguiente sitio aceptor, eliminando un exón (situación que en este caso rompe la pauta de lectura dando lugar a una proteína truncada) o en otros casos recurre a un lugar críptico que normalmente no se usa.

Esta mutación es la segunda más prevalente en el grupo de pacientes de MPS VI estudiado y provoca la degradación del RNA mediante NMD, tal como se comprobó en el caso del paciente ML2 en los experimentos de recuperación con cicloheximida (*ver páginas 91 y 101*). Ambos alelos del paciente degradan los transcritos portadores de la mutación y se encuentra poca presencia de proteína ARSB en los lisosomas de las células.

Los individuos ML7 y ML11 presentan también este cambio pero no se dispuso de fibroblastos ni de sangre fresca para realizar estudios a nivel de RNA.

*c.1143-1G>C (p.S381RfsX12)*

Esta mutación fue descrita en pacientes brasileños y franceses por Karageorgos *et al.* (2007b). Es la mutación más prevalente entre los pacientes de MPS VI españoles y argentinos y constituye una excepción por su elevada frecuencia en una enfermedad en la que la mayoría de mutaciones son privadas. Introduce un cambio en la región 100% conservada de un aceptor de *splicing* (de AG a AC) provocando la eliminación del exón 6 del transcrito maduro, lo que conlleva un cambio de pauta de lectura. Sus consecuencias respecto a la degradación del transcrito mutado por el mecanismo de NMD fueron puestas de manifiesto en los experimentos de RT-PCR y tratamiento con cicloheximida realizados con los fibroblastos de los pacientes ML3 y ML16, en los cuales se pudo utilizar el otro alelo mutado (con una mutación de cambio de sentido que no producía NMD) como control.

Este cambio se ha encontrado en homocigosis en una pareja de hermanos afectados de MPS VI con fenotipo severo (ML13a y ML13b).

## 5. Estudio de polimorfismos en el gen ARSB

En este estudio se han identificado diversos cambios polimórficos no patogénicos descritos anteriormente o presentes en las bases de datos de SNPs: c.313-26T>C, c.691-22T>C, c.973A>G (p.G324G), c.1072G>A (p.V358M), c.1126G>A (p.V376M), c.1143-27A>C, c.1151G>A (p.S384N), c.1191G>A (p.P397P), c.1337-32C>G, c.1362G>A (p.P454P). No se encontraron otros cambios sinónimos descritos por otros autores en otras poblaciones (*ver página 47*).

Durante la realización de esta tesis, además, se determinaron las frecuencias alélicas de algunos de los polimorfismos más frecuentes en población sana caucasoide de nacionalidad española (*ver página 80*), que coincidían aproximadamente con los datos disponibles en las bases de datos para la población europea.

### *p.V358M (c.1072G>A)*

Sólo en el caso de los polimorfismos p.V358M y p.V376M se habían realizado previamente estudios de expresión (Karageorgos *et al.*, 2004 y 2007a). El cambio p.V376M es neutro y no afecta a la actividad ARSB; el cambio p.V358M reduce la actividad de la proteína a un 42% de la salvaje. Tanto p.V358M como p.V376M y p.P397P están causados por transiciones en dinucleótidos CpG, un sitio altamente susceptible a ser mutado.

El cambio p.V358M es el polimorfismo no sinónimo más frecuente en población caucasoide y está presente en un 42% de los alelos analizados en nuestro grupo de pacientes. Que un cambio de aminoácido idéntico al de p.V376M en una región próxima y no conservada tenga efectos sobre la actividad enzimática es destacable. En nuestros estudios de expresión, la actividad del alelo p.358M

era un 70% de la del alelo p.358V, es decir, por encima de los valores obtenidos por otros grupos de investigadores, pero los sistemas de expresión son diferentes y por tanto no comparables. La reducción de la cantidad de proteína total producida no es muy notable y se sigue metabolizando a su forma madura intralisosómica, aunque en menor cantidad, tal como hemos puesto de manifiesto en estudios de *western blot*.

El cambio p.V358M combinado con un cambio patogénico en el mismo cromosoma (y por lo tanto en la misma molécula de proteína) puede reducir aún más la actividad de la enzima y la cantidad de proteína que llega a su forma madura. Ello podría explicar en parte la variabilidad fenotípica de los pacientes que tienen aparentemente el mismo genotipo para las mutaciones causales de la enfermedad.

El efecto de las variantes polimórficas funcionales del gen ARSB podría no limitarse a los pacientes de MPS VI; algunos autores recomiendan prestar más atención a las sulfatasas para explicar la patofisiología de la fibrosis quística (Bhattacharyya *et al.*, 2007). En los pacientes de fibrosis quística se detecta un incremento de dermatán sulfato en las secreciones; cuando se corrige la deficiencia de proteína CFTR farmacológicamente también aumenta la actividad ARSB. Una de las consecuencias de la fibrosis quística es la alteración del pH de los lisosomas, que provoca que al menos la ARSB no sea plenamente funcional. Por lo tanto, una baja actividad ARSB puede afectar a las características de las secreciones de los pacientes de fibrosis quística, debido al metabolismo imperfecto de los GAG (Tobacman *et al.*, 2003).

En el caso de los polimorfismos con implicaciones funcionales descritos en la ARSB (p.V358M en homocigosis, por ejemplo), podría ser uno de los factores

de variabilidad fenotípica observada en los pacientes de fibrosis quística con el mismo genotipo para el gen *CFTR*, pues una actividad ARSB reducida de forma natural unida a la reducción de la actividad como consecuencia de los efectos de la fibrosis quística puede relacionarse con una concentración particularmente elevada de dermatán sulfato en las secreciones, siempre y cuando no haya compensación de la actividad ARSB por el otro alelo. De la misma forma, una actividad ARSB reducida de forma natural aunque no patológica puede estar implicada en la variabilidad fenotípica de otros trastornos en los que la funcionalidad de los lisosomas esté comprometida. Y a la inversa: alelos modificadores de la actividad del gen *CFTR* u otro gen implicado en el mantenimiento de la fisiología del lisosoma que se encuentren en pacientes de MPS VI pueden contribuir a explicar la variabilidad fenotípica que encontramos entre los individuos afectados.

*p.S384N (c.1151G>A)*

Desde su descripción el año 2000, la sustitución p.S384N se ha considerado una mutación patogénica asociada al fenotipo severo MPS VI. Aunque se han descrito unos pocos pacientes homocigotos para este cambio (Voskoboeva *et al.*, 2000; Karageorgos *et al.*, 2007b), lo más frecuente es encontrarla asociada a dos alelos patogénicos más, especialmente con la mutación p.R315Q en homocigosis o en heterocigosis (Karageorgos *et al.*, 2007b).

Sin embargo, p.S384N consta en las bases de datos como un SNP con una frecuencia para la isoforma p.384N de 0,067 en población europea. En el presente trabajo se calculó aproximadamente la misma frecuencia alélica en población control caucasoide de nacionalidad española. La probabilidad

de encontrar un individuo homocigoto para el cambio p.S384N en la población es, por tanto, de aproximadamente 1 entre 200; lo suficientemente baja para que no se encontrara ninguno en nuestro análisis de 100 cromosomas control pero incompatible con la bajísima prevalencia de la MPS VI como enfermedad. Por lo tanto, es posible que un homocigoto para el cambio p.S384N no manifieste ninguna patología, a pesar de que nuestros estudios de expresión revelan que este cambio aislado provoca una reducción de la actividad ARSB del 57% respecto al alelo p.S384, con producción de proteína madura incluso superior que en el caso p.V358M y que la actividad ARSB se ve reducida a menos del 17% si va acompañada del cambio p.V358M. No obstante, se han descrito mutaciones con más de un 17% de actividad respecto a la proteína salvaje que sí eran patológicas (*ver página 48*). Por tanto, queda en tela de juicio si la p.S384N ha de considerarse mutación patogénica de pleno derecho o un alelo modificador que sólo tiene implicaciones funcionales serias cuando está en homocigosis acompañado de otra variante polimórfica con actividad reducida o de otras mutaciones patológicas.

Se han descrito otros casos de presencia de tres alelos mutados en el mismo paciente, dos de ellas en el mismo cromosoma, y de las que ninguna es p.S384N (Karageorgos *et al.*, 2007b). La mayoría de estos tres alelos son cambios de sentido que no han sido expresados. Sin embargo, hay algunos casos de coincidencia de tres alelos de terminación prematura en un paciente que, obviamente, tienen efectos funcionales todos ellos.

En el caso de la población control española en la cual se realizó el estudio de frecuencias alélicas de diferentes polimorfismos, sólo se obtuvieron datos de los polimorfismos p.V358M y p.S384N a la vez en 25 individuos (50 cromosomas

en total). De ellos, 9 eran homocigotos p.358V; 384S, 1 era homocigoto para p.358V y heterocigoto p.384N, 12 eran heterocigotos para p.358M y homocigotos p.384S y 3 eran homocigotos p.358M; 384S.

*p.P454P (c.1362G>A)*

De la misma manera que se han descrito polimorfismos neutros en pacientes que no constan en las bases de datos de SNPs (p.L82L, p.I114I, p.L124L, p.G324G y p.Y505Y), en un paciente de origen dominicano se encontró en homocigosis un SNP neutro descrito en las bases de datos pero que ningún autor había publicado hasta ahora. El hecho de que dicho polimorfismo sólo se haya descrito en población africana y que no se tengan datos de su presencia en población caucasoide invita a pensar que el paciente en cuestión tiene ancestros africanos.

## 6. Correlación genotipo-fenotipo

La comparación entre pacientes con idéntico genotipo (en relación con las mutaciones causales de la enfermedad) y diferente fenotipo no ha permitido el establecimiento de una correlación genotipo-fenotipo clara. Los estudios de expresión y tráfico intracelular parecen indicar que las mutaciones de cambio de sentido, que a primera vista pueden parecer menos trascendentes que las de terminación prematura, producen casi idénticos niveles de degradación de la proteína en el RE, que impiden el procesamiento a proteína madura y su localización en el lisosoma y repercuten en la bajísima actividad enzimática. Por tanto, han de buscarse otras explicaciones, por ejemplo el fondo genético o ambiental, a las que se deba la falta de correlación.

A efectos clínicos, la cuantificación de la excreción de GAG en orina parece ser

el único sistema que aporta datos para la predicción de la gravedad y el avance de los síntomas (Karageorgos *et al.*, 2007b).

## 7. Estudios de expresión de mutaciones en el gen ARSB

### Comentarios sobre el sistema de expresión

La determinación del fenotipo bioquímico de una mutación en un sistema de sobreexpresión y usando un sustrato artificial no refleja necesariamente los eventos moleculares reales dentro del lisosoma pero puede ser usado como guía para predecir el fenotipo.

Las células COS-7 se consideraron un sistema más cercano al humano que los utilizados por otros autores, basados en células de roedor. Además, los valores de actividad de la proteína endógena podían ser sustraídos de los valores de actividad obtenidos tras la sobreexpresión. Los ensayos enzimáticos realizados tras diferentes períodos post-transfección indicaban que pese a la sobreexpresión artificial de la proteína no parecía producirse saturación del sistema celular y se eligieron las 48 horas como tiempo suficiente en el que la proteína sintetizada podía ser procesada correctamente.

Tampoco se consideró necesario recurrir a la creación de líneas de expresión estables, porque el uso prolongado de antibióticos de selección y el mantenimiento de los pasajes podría llegar a ser más artefactual incluso que la expresión transitoria de una gran cantidad de proteína.

De todos modos, hay que tener en cuenta que el procesamiento hacia la forma madura de la ARSB depende de la enzima que cataliza la modificación post-traducciona del residuo cisteína 91 (SUMF1). De hecho en los últimos

experimentos de terapia génica en gatos con MPS VI, con administración intramuscular de vectores víricos que expresan ARSB, se expresó de forma análoga SUMF1 para prevenir la saturación de la enzima (Anson *et al.*, 1993; Comsa *et al.*, 2003; Haskins *et al.*, 2005), a pesar de que había indicios de que tal saturación no era probable que se produjera, al menos en células hepáticas (Haskins *et al.*, 2004). Si SUMF1 es rápidamente saturada con la sobrexpresión de una sulfatasa *in vivo* o *in vitro*, podría haber limitaciones en la cantidad de enzima que se puede producir y una reducción de la actividad de otras sulfatasas que requieren la misma modificación. Esto sólo es importante cuando se parte de un número muy elevado de copias del gen (Haskins *et al.*, 2004). El receptor manosa-6-fosfato, situado en la membrana del Golgi, es otro paso del sistema que se podría saturar. En el caso de nuestros estudios de expresión al menos un 50% del total de proteína salvaje es procesada a su forma madura, y en el caso de los alelos mutados no parece haber indicios de saturación. La medida de otra sulfatasa lisosómica que requiera el mismo proceso mediado por SUMF1 hubiera permitido saber si se estaba produciendo una saturación del sistema.

#### **Posibles efectos de las mutaciones en el plegamiento correcto y la degradación de la proteína**

Todas las mutaciones de cambio de sentido expresadas en este trabajo dan lugar a una actividad enzimática muy disminuída. Esto puede deberse a que estén afectando sitios funcionales de la proteína o a que disminuyan los niveles de proteína que llegan al lisosoma desde su lugar de síntesis (debido a la degradación prematura, al mal plegamiento y/o a la alta tasa de recambio de la conformación plegada).

Sólo el cambio p.Y138C parece estar afectando un residuo importante a nivel catalítico. Las mutaciones que afectan directamente sitios funcionales no suelen ser las más frecuentes entre las enfermedades genéticas clínicamente reconocibles (Bross *et al.*, 1999). Las mutaciones que afectan residuos cisteína y prolina (p.P313A, p.L472P, p.C447F y p.Y138C) implican además cambios conformacionales en la estructura de la proteína que quizá tengan un efecto funcional.

Es difícil predecir o estimar el efecto de una mutación dada sobre el plegamiento de un polipéptido y su tendencia a la degradación. Aunque la predicción biocomputacional puede resultar útil, en última instancia siempre es necesario recurrir a experimentos empíricos de expresión. En relación con las estimaciones computacionales, sin la ayuda de modelizaciones 3-D *in silico* basadas en estructuras cristalográficas reales, los programas de predicción de estructuras secundaria de uso común dan resultados poco fiables. Sin embargo, durante la realización de esta tesis se usaron algunos de estos programas, como *NNPredict* y *Protein Structure Prediction Server (PSIPRED v.2.5)*, que es el más utilizado en la bibliografía), cuyos resultados deben interpretarse con precaución.

En relación con los estudios de expresión, existe el problema de la comparación de los resultados obtenidos mediante sistemas de expresión y laboratorios diferentes. Los niveles relativos de proteína mutante o funcional acumulada pueden variar enormemente en función del sistema celular usado, el método de transfección, las condiciones físico-químicas concretas de cada experimento y otros parámetros. Todos los estudios de expresión publicados hasta la fecha (*ver página 48*), si bien realizados en sistemas de expresión diferentes, apuntan a que la retención y

degradación de la ARSB plegada incorrectamente en el RE podría explicar los bajos niveles de proteína observados en los pacientes y en los ensayos de sobreexpresión.

Los estudios de Arlt *et al.* (1994), Isbrandt *et al.* (1994), Brooks *et al.* (1995), Bradford *et al.* (1999) y Karageorgos *et al.* (2004) demostraron para distintas mutaciones de cambio de aminoácido que la forma precursora es retenida en RE y se degrada antes de llegar a la red trans-Golgi, y mucho menos al sistema endosoma/lisosomas. No se detectó procesamiento de la ARSB hacia la forma madura y las formas mutantes tampoco eran secretadas al medio extracelular.

Nuestros resultados de *western blot* e inmunolocalización apuntan también a un defecto de procesamiento hacia proteína madura y a una disminución de la cantidad total de proteína ARSB en la célula, más que a una ubicación incorrecta de la enzima.

Bradford *et al.* (2002) también demostraron que la baja actividad ARSB debida a la mutación p.Y210C podía explicarse por algún problema de estabilidad, pues al tratar células portadoras de la mutación con el estabilizador glicerol aumentó la concentración de la proteína en los endosomas.

Es posible que la proteína retenida en el RE interactue con chaperonas como BiP, pero esto no es necesariamente sintomático de degradación porque BiP parece interactuar tanto con la forma salvaje como con la mutada de la proteína (Brooks *et al.*, 1995). Los ensayos cinéticos de la proteína residual indican que en la mayoría de casos, si hubiera niveles normales de proteína, habría suficiente actividad catalítica para revertir las manifestaciones clínicas (Brooks *et al.*, 1991 y 1993).

## 8. Estudios sobre la degradación de mRNA mediante el NMD

Hay muchos ejemplos de patologías humanas causadas por mutaciones sin sentido o que introducen cambios de pauta de lectura y que son moduladas por el mecanismo de NMD. La degradación específica de mRNAs que codifican proteínas truncadas podría tener un sentido atenuador de los síntomas, puesto que en muchos casos la ausencia de proteína sería menos perjudicial que la presencia de una proteína truncada. Sin embargo, resulta difícil valorar en qué casos el NMD proporciona realmente un efecto protector (mitigando parcialmente las consecuencias de la mutación). Perrin-Vidoz *et al.* (2002) determinaron que el NMD se lleva a cabo en el 80% de los alelos responsables de terminación prematura y que resulta en una reducción de 1,5 a 5 veces de la abundancia del mRNA. Pero se han descrito mutaciones de terminación prematura que no dan lugar a NMD pese a cumplir los requisitos teóricos para ello (Perrin-Vidoz *et al.*, 2002).

Holbrook *et al.* (2004) también indicaron que es importante no asumir que todos los mRNA que contienen codones de terminación prematura resultan en la producción de proteínas truncadas o que son degradados por NMD. En cualquier caso, las consecuencias funcionales de una mutación de terminación prematura deben ser establecidas experimentalmente. Estos análisis deben medir cuantitativamente el RNA que se supone se está degradando (por ejemplo, *northern blot*, protección contra RNAsa o RT-PCR cuantitativa). Otros ensayos que pueden utilizarse para medir la sensibilidad al NMD de transcritos que contienen codones de terminación prematura son la limitación de la expresión de proteínas implicadas en el NMD mediante RNA de interferencia y la sobreexpresión de mutantes dominantes negativos. Los

inhibidores pleiotrópicos de la transcripción, como la cicloheximida, son considerados poco específicos por algunos autores (Holbrook *et al.*, 2004), pero son ensayos mucho más rápidos de realizar.

En nuestro caso los tratamientos con cicloheximida evidenciaron una protección a la degradación del mRNA en la mayoría de mutaciones de terminación prematura analizadas, y sólo en un caso los resultados no fueron concluyentes ni para rechazar ni para aceptar la hipótesis del NMD, si bien esta mutación cumplía todos los criterios teóricos para que se produjera. Para determinar si se produce un aumento sustancial de la producción de proteínas truncadas en células tratadas con cicloheximida, deberían detectarse estos niveles de expresión mediante *western blot*, pero por problemas metodológicos no se pudo llevar a cabo.

## **9. Terapia con antibióticos aminoglicósidos**

El uso de antibióticos aminoglicósidos para promover la síntesis de una proteína funcional o parcialmente funcional o aumentar su actividad residual en un grado suficiente como para revertir parte de las manifestaciones fenotípicas se ha aplicado con éxito en varias enfermedades genéticas (*ver página 56*) y es una alternativa terapéutica a considerar para los pacientes de dichas enfermedades portadores de mutaciones de terminación prematura que no produzcan cambios de pauta de lectura.

En el caso de la MPS VI, la terapia de sustitución enzimática se está empezando a aplicar con éxito en los pacientes más jóvenes, pero fracasa en el rescate de algunas manifestaciones clínicas como la opacidad corneal, los problemas de agudeza visual o algunos movimientos

articulares. La combinación de la terapia de sustitución enzimática y la administración de antibióticos aminoglicósidos de uso común para la supresión de codones de terminación podría mejorar la eliminación del sustrato acumulado. Los aminoglicósidos y otras moléculas equivalentes de bajo peso molecular entrarían en células, tejidos y órganos por difusión y tendrían un acceso más generalizado, y mejorarían el metabolismo del sustrato en sitios afectados que son fácilmente accesibles sin tener que recurrir por ejemplo a los vectores virales de la terapia génica (Byers *et al.*, 2006).

Su administración podría ser ocular, nasal o parenteral. Otra de las aproximaciones clínicas que se han sugerido es el uso de parches percutáneos con el fármaco diluido para minimizar los efectos secundarios y conseguir niveles terapéuticos optimizados y seguros.

Uno de los efectos negativos a considerar en este tipo de terapia es si la supresión a largo plazo de codones de terminación prematura fisiológicos (debidos a reordenaciones naturales en los genes, por ejemplo) o la transcripción potencial de pseudogenes podría causar una acumulación de proteínas mutantes que desencadenaran problemas a nivel celular. De todas formas, hay que tener en cuenta que la supresión de la terminación también es un fenómeno fisiológico que ocurre en la célula, aunque con baja frecuencia, que pese al uso de supresores exógenos la eficiencia de supresión siempre será minoritaria y que las concentraciones de antibióticos que se están manejando son subtóxicas. En los ensayos clínicos en humanos que ya se están llevando a cabo, además, no se ha descubierto ningún efecto secundario más importante que los que tienen lugar en los otros tipos de terapia.

### Influencia del contexto de nucleótidos en la supresión de codones de terminación

Determinar el genotipo de cada paciente es fundamental para saber si es portador de una mutación sin sentido y es candidato a una posible terapia con aminoglicósidos. Además, es importante determinar cuál es el contexto nucleotídico a 3' de la mutación.

Cuando un codón de terminación está en un contexto de los considerados «débiles» según la naturaleza del codón y del nucleótido +4 (UAGU y UGAC, Manuvakhova *et al.*, 2000; Namy *et al.*, 2001; *ver página 56*), la supresión de este codón de terminación durante la traducción puede ocurrir de forma natural. Esto no sería aplicable a los pacientes de MPS VI analizados en este estudio, pues ninguna de las dos mutaciones sin sentido encontradas en nuestra población (p.W322X y p.R160X) se encuentran en el contexto de terminación «débil».

Otro fenómeno que podría producirse de forma natural es el de la reiniciación, si el codón de terminación va seguido de cerca por un codón ATG en pauta, pero tampoco es el caso de las mutaciones que nos ocupan.

En nuestros estudios, aún preliminares, hemos observado que al menos en el caso de las mutaciones p.W146X, p.W322X y p.R160X se observa una apreciable mejora en la actividad ARSB y también una recuperación del transcrito de mRNA, antes degradado por NMD.

Es importante señalar que, en el caso concreto de las mutaciones p.W146X y p.W322X, es probable que el aminoácido que se incorpora en lugar del codón de terminación sea precisamente el codón correcto en la proteína salvaje (triptófano), pues está descrito que los aminoácidos que se incorporan preferen-

cialmente durante la supresión de la terminación, al menos en *E. coli*, son la glutamina (en los codones de parada UAA y UAG, parecidos a los codones de glutamina, CAA y CAG) y el triptófano (en el codón de parada UGA, parecido al codón triptófano, UGG; Nilsson *et al.*, 2003).

La producción de proteína resultante de la terapia con aminoglicósidos, incluso si sólo es en pequeña cantidad, puede ser funcionalmente significativa. Esto es especialmente cierto en el caso de las enfermedades recesivas, donde la actividad de la proteína suele estar abolida casi totalmente. En muchos casos, incluso un 1% de función proteica normal puede restaurar un fenotipo severo a un fenotipo clínico menos grave, y hay algunos estudios que incluso sugieren que también podría funcionar en algunas enfermedades autosómicas dominantes (Zingman *et al.*, 2007).

No obstante, según la experiencia de otros autores, no siempre se puede predecir la eficiencia de la supresión de terminación (y por lo tanto su potencial beneficio) basándose en el contexto de nucleótidos alrededor de la mutación. Se requiere un estudio individual de cada mutación para aportar información útil antes de someter al paciente a ensayo clínico. Estas observaciones enfatizan la importancia de aprender más sobre las secuencias y mecanismos que promueven la supresión de terminación y la terminación de la traducción en general, de cara a permitir un uso racional de los fármacos para el tratamiento de las enfermedades asociadas a mutaciones sin sentido.

## **Interferencia del NMD en la terapia de supresión de codones de terminación**

Los resultados de esta tesis indican que el mecanismo de NMD es responsable de la degradación del mRNA mutado en la mayoría de los casos de mutaciones de terminación prematura (por deleciones pequeñas, deleciones de exones, alteraciones en sitios de *splicing* o mutaciones sin sentido) identificadas en nuestra serie de pacientes que se han podido analizar, y no se ha podido descartar que no lo sea en otros casos.

Algunos autores (Frishmeyer *et al.*, 2002; Linde *et al.*, 2007) han apuntado que el NMD puede limitar la eficiencia de las estrategias terapéuticas destinadas a potenciar la supresión de mutaciones sin sentido y puede contribuir a la toxicidad asociada a la terapia por aminoglicósidos. El NMD puede hacer que disminuya notablemente la cantidad de transcrito mutado que después pueda traducirse a proteína, con lo cual los aminoglicósidos no tendrían sobre qué transcrito mutado actuar.

Aunque sin duda el NMD puede tener significación médica a la hora de valorar el éxito de la terapia por aminoglicósidos, los ensayos clínicos y preclínicos realizados hasta la fecha sí indican que puede haber un cierto beneficio (*ver página 56*). El NMD no ha de ser un fenómeno ignorado por los investigadores pero no debe frenar los intentos de beneficiarse de este tipo de terapia.

Una combinación de técnicas de supresión del NMD y supresión de la terminación prematura por aminoglicósidos podría resultar aún más eficaz (*ver página 59*), pero el NMD es un proceso fisiológico de protección cuya anulación también podría tener consecuencias fatales para la célula.

## **El uso de PTC124 como agente de supresión de codones de terminación prematura**

Aunque en la bibliografía referente a la supresión de codones de terminación prematura mediante el uso de antibióticos aminoglicósidos el compuesto utilizado es en general la gentamicina, en los últimos años los resultados más prometedores hacen referencia al uso del PTC124. Se trata de un compuesto no antibiótico desarrollado por la farmacéutica *PTC Therapeutics Inc.* con el que se están llevando a cabo ensayos clínicos en pacientes de fibrosis quística y DMD. Según los primeros resultados, con PTC124 se obtienen unos niveles de recuperación de actividad distrofina en miotubos *mdx* notablemente superiores a los que se venían obteniendo hasta ahora con el uso de gentamicina (Welch *et al.*, 2007).

Durante la realización de esta tesis nos pusimos en contacto con los responsables de investigación clínica de dicha compañía para proponerles el uso de PTC124 aplicado a la supresión de codones de terminación prematura causantes de la MPS VI, que podría mejorar los resultados obtenidos con la gentamicina. Sin embargo, nos comunicaron que sólo aceptan colaboraciones para usar su producto después de valorar los resultados obtenidos en experimentos de supresión *in vitro* con gentamicina. La empresa no suministra al grupo investigador colaborador la PTC124 directamente, sino dos o tres compuestos codificados de los que revelan el nombre una vez se analizan los resultados. Si dichos resultados son positivos, pasa a evaluarse la propuesta de continuar con los ensayos con PTC124 *in vivo*.

Por tanto, no pueden realizarse directamente ensayos de supresión con PTC124 si no se han realizado antes ensayos prometedores de supresión con gentamicina. El trabajo que se presenta ofrece ya resultados positivos preliminares con el tratamiento con gentamicina *in vitro* en dos tipos celulares distintos, analizando diversas mutaciones de terminación prematura localizadas en

diferentes contextos nucleotídicos. Los resultados permiten suponer que los estudios con PTC124 aplicado a la MPS VI tengan posibilidades reales de éxito y que la terapia de supresión de codones de terminación prematura es una alternativa viable como terapia complementaria de los pacientes de síndrome de Maroteaux-Lamy portadores de este tipo de mutaciones.



*Conclusiones*



## CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos en esta tesis podemos concluir:

- Se ha caracterizado el 100% de los alelos mutados responsables del síndrome de Maroteaux-Lamy en un grupo de 11 pacientes españoles, 4 argentinos, 1 belga y 2 estadounidenses de origen dominicano.

- Del total de 21 alelos mutados diferentes encontrados en el gen *ARSB*, el 33% corresponde a mutaciones no descritas previamente en la bibliografía: p.L82R, p.Y138C, p.S240F, p.P244T, p.G308R, p.W322X y c.1142+2T>A, y se ha descartado que se trate de variantes polimórficas frecuentes en la población general.

- Se han realizado estudios haplotípicos de las mutaciones prevalentes encontradas en pacientes españoles y argentinos, que indican que cada uno de los distintos alelos p.C447F, c.1143-1G>C, c.1143-8T>G y c.427delG posiblemente tenga un origen común.

- El hecho de que la mayoría de las mutaciones descritas en este trabajo sean privadas dificulta el establecimiento de correlaciones genotipo-fenotipo fiables.

- Se ha demostrado la patogenicidad de las mutaciones de cambio de sentido p.L82R, p.Y138C, p.S340F, p.G308R, p.C447F y p.L472P mediante estudios de expresión que permiten concluir que estos cambios producen una reducción considerable de la actividad enzimática y de la cantidad de proteína madura.

- Los estudios de expresión del polimorfismo p.V358M confirman que la variante p.358M no es un alelo neutro, puesto que reduce la actividad enzimática *ARSB* y produce una

reducción en la cantidad de proteína madura. El estudio del cambio p.S384N, anteriormente considerado una mutación patogénica, indicaría que se trata en realidad de un polimorfismo funcional. Por lo tanto se propone que p.V358M y p.S384N sean considerados variantes modificadoras.

- Los estudios de inmunofluorescencia indirecta en fibroblastos de 5 pacientes de MPS VI apuntan a que solamente niveles muy reducidos de proteína madura llegan al lisosoma (consistente con los resultados obtenidos en los estudios de expresión y *western blot*).

- La mutación más prevalente en el grupo de pacientes analizado es el cambio intrónico c.1143-1G>C, que al igual que el cambio c.1143-8T>G, da como resultado la ausencia del exón 6 en el mRNA del gen *ARSB*. El cambio c.1142+2T>A produce la ausencia del exón 5 en el mRNA. Estos cambios, al igual que las mutaciones de terminación prematura p.W322X y c.427delG, también se han encontrado asociados a la degradación de mRNA mediante el mecanismo de *nonsense-mediated RNA decay* (NMD).

- Se ha mostrado que el tratamiento con gentamicina de células COS-7 que sobrexpresan mutaciones sin sentido provoca un aumento de la cantidad de mRNA y de la actividad enzimática *ARSB*. Se han obtenido resultados similares en fibroblastos de un paciente portador de una de estas mutaciones.



# *Bibliografía*



## BIBLIOGRAFÍA

- Agashe VR, Hartl FU (2000). *Roles of molecular chaperones in cytoplasmic protein folding*. *Semin Cell Dev Biol*. 11(1):15-25.
- Ahmed V, Ispahany M, Ruttgaizer S, Guillemette G, Taylor SD (2005). *A fluorogenic substrate for the continuous assaying of aryl sulfatases*. *Anal Biochem*. 1;340(1):80-8.
- Ahner A, Brodsky JL (2004). *Checkpoints in ER-associated degradation: excuse me, which way to the proteasome?* *Trends Cell Biol*. 14(9):474-8.
- Alam SL, Wills NM, Ingram JA, Atkins JF, Gesteland RF (1999). *Structural studies of the RNA pseudoknot required for readthrough of the gag-termination codon of murine leukemia virus*. *J Mol Biol*. 88(5):837-52.
- Alberts B, Dennis B, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD (2002). *Molecular biology of the cell*. 4<sup>a</sup> ed. Barcelona: Ed. Omega. Capítulo 13.
- Anson DS, Muller V, Bielicki J, Harper GS, Hopwood JJ (1993). *Overexpression of N-acetylgalactosamine-4-sulphatase induces a multiple sulphatase deficiency in mucopolysaccharidosis-type-VI fibroblasts*. *Biochem J*. 294, 657-62.
- Anson DS, Taylor JA, Bielicki J, Harper GS, Peters C, Gibson GJ, Hopwood JJ (1992). *Correction of human mucopolysaccharidosis type-VI fibroblasts with recombinant N-acetylgalactosamine-4-sulphatase*. *Biochem J*. 284, 789-94.
- Applegarth DA, Toone JR, Lowry RB (2000). *Incidence of inborn errors of metabolism in British Columbia, 1969-1996*. *Pediatrics*. 105(1):e10.
- Arakawa M, Shiozuka M, Nakayama Y, Hara T, Hamada M, Kondo S, Ikeda D, Takahashi Y, Sawa R, Nonomura Y, Sheykhosslami K, Kondo K, Kaga K, Kitamura T, Suzuki-Miyagoe Y, Takeda S, Matsuda R (2003). *Negamycin restores dystrophin expression in skeletal and cardiac muscles of mdx mice*. *J Biochem (Tokyo)*. 134(5):751-8. *Erratum: J Biochem (Tokyo)*. 2004; 35(2):277.
- Arlt G, Brooks DA, Isbrandt D, Hopwood JJ, Bielicki J, Bradford TM, Bindloss-Petherbridge CA, von Figura K, Peters C (1994). *Juvenile form of mucopolysaccharidosis VI (Maroteaux-Lamy syndrome). A C-terminal extension causes instability but increases catalytic efficiency of arylsulfatase B*. *J Biol Chem*. 269, 9638-43.
- Auclair D, Hopwood JJ, Brooks DA, Lemontt JF, Crawley AC (2003). *Replacement therapy in mucopolysaccharidosis type VI: advantages of early onset of therapy*. *Mol Genet Metab*. 78(3):163-74.
- Baehner F, Schmiedeskamp C, Krumm-nauer F, Miebach E, Bajbouj M, Whybra C, Kohlschutter A, Kampmann C, Beck M (2005). *Cumulative incidence rates of the mucopolysaccharidoses in Germany*. *J Inherit Metab Dis*. 28(6):1011-7.
- Baron RW, Neufeld EF (1972). *A distinct biochemical deficit in the Maroteaux-Lamy syndrome (mucopolysaccharidosis VI)*. *J Pediatr*. 80(1):114-6.
- Barton-Davis ER, Cordier L, Shoturma DI, Leland SE, Sweeney HL (1999). *Aminoglycoside antibiotics restore dystrophin function to skeletal muscles of mdx mice*. *J Clin Invest*. 104: 375-81.
- Baum H, Dogson KS, Spencer B (1959). *The assay of arylsulphatases A and B in human urine*. *Clin Chim Acta*. 4:453-455.
- Beck M (2006). *Galsulfase: enzyme-replacement therapy for mucopolysaccharidosis Type VI (Maroteaux-Lamy syndrome)*. *Therapy*. 3(1):9-17.

- Beck M (2007). *New therapeutic options for lysosomal storage disorders: enzyme replacement, small molecules and gene therapy*. Hum Genet. 121(1):1-22.
- Bedwell DM, Kaenjak A, Benos DJ, Bebok Z, Bubien JK, Hong J, Tousson A, Clancy JP, Sorscher EJ (1997). *Suppression of a CFTR premature stop mutation in a bronchial epithelial cell line*. Nat Med. 3:1280-4.
- Beratis NG, Turner BM, Weiss R, Hirschhorn K (1975). *Arylsulfatase B deficiency in Maroteaux-Lamy syndrome: Cellular studies and carrier identification*. Pediatr Res. 9(5):475-80.
- Berry MJ, Banu L, Chen YY, Mandel SJ, Kieffer JD, HRNAey JW, Larsen PR (1991). *Recognition of UGA as a selenocysteine codon in type I deiodinase requires sequences in the 3' untranslated region*. Nature. 353(6341):273-6.
- Bhattacharyya S, Look D, Tobacman JK (2007). *Increased arylsulfatase B activity in cystic fibrosis cells following correction of CFTR*. Clin Chim Acta. 380(1-2):122-7.
- Bidou L, Hatin I, Perez N, Allamand V, Panthier JJ, Rousset JP (2004). *Premature stop codons involved in muscular dystrophies show a broad spectrum of readthrough efficiencies in response to gentamicin treatment*. Gene Ther. 11(7):619-27.
- Bonetti B, Fu L, Moon J, Bedwell DM (1995). *The efficiency of translation termination is determined by a synergistic interplay between upstream and downstream sequences in Saccharomyces cerevisiae*. J Mol Biol. 251(3):334-45.
- Bond CS, Clements PR, Ashby SJ, Collyer CA, Harrop SJ, Hopwood JJ, Guss JM (1997). *Structure of a human lysosomal sulfatase*. Structure. 5, 277-89.
- Bradford TM, Gething MJ, Davey R, Hopwood JJ, Brooks DA (1999). *Processing of normal lysosomal and mutant N-acetylgalactosamine 4-sulphatase: BiP (immunoglobulin heavy-chain binding protein) may interact with critical protein contact sites*. Biochem J. 341, 193-201.
- Bradford TM, Litjens T, Parkinson EJ, Hopwood JJ, Brooks DA (2002). *Mucopolysaccharidosis type VI (Maroteaux-Lamy syndrome): a Y210C mutation causes either altered protein handling or altered protein function of N-acetylgalactosamine 4-sulfatase at multiple points in the vacuolar network*. Biochemistry. 41, 4962-71.
- Brooks DA, Gibson GJ, Hopwood JJ (1994). *Immunochemical characterization of feline and human N-acetylgalactosamine 4-sulfatase*. Biochem Med Metab Biol. 53, 58-66.
- Brooks DA, Gibson GJ, Karageorgos L, Hein LK, Robertson EF, Hopwood JJ (2005). *An index case for the attenuated end of the mucopolysaccharidosis type VI clinical spectrum*. Mol Genet Metab. 85(3):236-8.
- Brooks DA, King BM, Crawley AC, Byers S, Hopwood JJ (1997). *Enzyme replacement therapy in Mucopolysaccharidosis VI: evidence for immune responses and altered efficacy of treatment in animal models*. Biochem Biophys Acta. 1361, 203-16.
- Brooks DA, McCourt PA, Gibson GJ, Ashton LJ, Shutter M, Hopwood JJ (1991). *Analysis of N-acetylgalactosamine-4-sulfatase protein and kinetics in mucopolysaccharidosis type VI patients*. Am J Hum Genet. 48, 710-9.
- Brooks DA, Robertson DA, Bindloss C, Litjens T, Anson DS, Peters C, Morris CP, Hopwood JJ (1995). *Two site-directed mutations abrogate enzyme activity but have different effects on the conformation and cellular content of the N-acetylgalactosamine 4-sulphatase protein*. Biochem J. 307, 457-63.
- Brooks DA, Muller VJ, Hopwood JJ (2006). *Stop-codon read-through for patients*

- affected by a lysosomal storage disorder. *Trends Mol Med.* 12(8):367-73.
- Bross P, Corydon TJ, Andresen BS, Jorgensen MM, Bolund L, Gregersen N (1999). *Protein misfolding and degradation in genetic diseases.* *Hum Mutat.* 4(3):186-98.
- Buchanan JH, Stevens A, Sidhu J (1987). *Aminoglycoside antibiotic treatment of human fibroblasts: intracellular accumulation, molecular changes and the loss of ribosomal accuracy.* *Eur J Cell Biol.* 43(1):141-7.
- Burke JF, Mogg AE (1985). *Suppression of a nonsense mutation in mammalian cells in vivo by the aminoglycoside antibiotics G-418 and paromomycin.* *Nucleic Acids Res.* 13(17):6265-72.
- Byers S, Crawley AC, Brumfield LK, Nuttall JD, Hopwood JJ (2000). *Enzyme replacement therapy in a feline model of MPS VI: modification of enzyme structure and dose frequency.* *Pediatr Res.* 47(6): 743-9.
- Byers S, Rothe M, Koldej R, Lalic J, Sandberg J, Anson DS (2006). *Lentiviral mediated correction of MPS VI cells and gene transfer to skeletal tissues.* 9<sup>th</sup> International Symposium on Mucopolysaccharidosis and Related Disorders, Venecia, Italia.
- Byers S, Rozaklis T, Brumfield LK, Ranieri E, Hopwood JJ (1998). *Glycosaminoglycan accumulation and excretion in the mucopolysaccharidoses: characterization and basis of a diagnostic test for MPS.* *Mol Genet Metab.* 65(4):282-90.
- Cabral CM, Liu Y, Sifers RN (2001). *Dissecting glycoprotein quality control in the secretory pathway.* *Trends Biochem Sci.* 26(10):619-24.
- Caceres JF, Kornblihtt AR (2002). *Alternative splicing: multiple control mechanisms and involvement in human disease.* *Trends Genet.* 18(4):186-93.
- Cartegni L, Chew SL, Krainer AR (2002). *Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing.* *Nat Rev Genet.* 3, 285-98.
- Chabás A, Coll MJ (2006). *Distribution of Mucopolysaccharidosis and related diseases in Spain. The experience of Institut de Bioquímica Clínica.* 9<sup>th</sup> International Symposium on Mucopolysaccharidosis and Related Disorders, Venecia, Italia.
- Chang JC, Temple GF, Trecartin RF, Kan YW (1979). *Suppression of the nonsense mutation in homozygous beta 0 thalassaemia.* *Nature.* 281(5732):602-3.
- Chaudhuri TK, Paul S (2006). *Protein-misfolding diseases and chaperone-based therapeutic approaches.* *FEBS J.* 273(7):1331-49.
- Chen JW, Chen GL, D'Souza MP, Murphy TL, August JT (1986). *Lysosomal membrane glycoproteins: properties of LAMP-1 and LAMP-2.* *Biochem Soc Symp.* 51:97-112.
- Cheng SH, Smith AE (2003). *Gene therapy progress and prospects: gene therapy of lysosomal storage disorders.* *Gene Ther.* 10(16):1275-81.
- Chittum HS, Lane WS, Carlson BA, Roller PP, Lung FD, Lee BJ, Hatfield DL (1998). *Rabbit beta-globin is extended beyond its UGA stop codon by multiple suppressions and translational reading gaps.* *Biochemistry.* 37(31):10866-70.
- Ciechanover A (2005). *Proteolysis: from the lysosome to ubiquitin and the proteasome.* *Nat Rev Mol Cell Biol.* 6(1):79-87.
- Clancy JP, Bebok Z, Ruiz F, King C, Jones J, Walker L, Greer H, Hong J, Wing L, Macaluso M, Lyrene R, Sorscher EJ, Bedwell DM (2001). *Evidence that systemic gentamicin suppresses premature stop mutations in patients with cystic fibrosis.* *Am J Respir Crit Care Med.* 163(7):1683-92.

- Coelho JC, Wajner M, Burin MG, Vargas CR, Giugliani R (1997). *Selective screening of 10,000 high-risk Brazilian patients for the detection of inborn errors of metabolism*. Eur J Pediatr. 156(8):650-4.
- Cooper DN, Krawczak M, Antonarakis SE (2001). *The nature and mechanisms of human gene mutation*. En: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (Eds.) *The metabolic and molecular basis of inherited disease*. New York: McGraw Hill. 8ª edición, pp. 259-291.
- Correa-Cerro LS, Wassif CA, Waye JS, Krakowiak PA, Cozma D, Dobson NR, Levin SW, Anadiotis G, Steiner RD, Krajewska-Walasek M, Nowaczyk MJ, Porter FD (2005). *DHCR7 nonsense mutations and characterisation of mRNA nonsense mediated decay in Smith-Lemli-Opitz syndrome*. J Med Genet. 42(4):350-7.
- Crawley AC, Brooks DA, Muller VJ, Petersen BA, Isaac EL, Bielicki J, King BM, Boulter CD, Moore AJ, Fazzalari NL, Anson DS, Byers S, Hopwood JJ (1996). *Enzyme replacement therapy in a feline model of Maroteaux-Lamy syndrome*. J Clin Invest. 97, 1864-73.
- Crawley AC, Yogalingam G, Muller VJ, Hopwood JJ (1998). *Two mutations within a feline mucopolysaccharidosis type VI colony cause three different clinical phenotypes*. J Clin Invest. 101, 109-19.
- Dean RT (1979). *Lisomas*. Cuadernos de biología. Barcelona. Ed. Omega.
- Deininger, PL, Batzer, MA (1999). *Alu repeats and human disease*. Mol Gen Metab. 67, 183-193.
- Desnick J (2006). *Pharmacologic chaperone therapy for lysosomal diseases*. 9<sup>th</sup> International Symposium on Mucopolysaccharidosis and Related Disorders, Venecia, Italia.
- Desnick RJ (2004). *Enzyme replacement and enhancement therapies for lysosomal diseases*. J Inher Metab Dis. 27(3):385-410.
- Dionisi-Vici C, Rizzo C, Burlina AB, Caruso U, Sabetta G, Uziel G, Abeni D (2002). *Inborn errors of metabolism in the Italian pediatric population: a national retrospective survey*. J Pediatr. 140(3):321-7.
- Dou W, Gu X, Peng C, Zheng J, Chen J, Zhang W, Huang S, Sheng HZ (2006). *Two novel mutations of the arylsulfatase B gene in a Chinese MPS VI child undergoing bone marrow transplantation therapy*. Clin Chim Acta. 374, 171-2.
- Du M, Jones JR, Lanier J, Keeling KM, Lindsey JR, Tousson A, Bebok Z, Whitsett JA, Dey CR, Colledge WH, Evans MJ, Sorscher EJ, Bedwell DM (2002). *Aminoglycoside suppression of a premature stop mutation in a Cftr<sup>-/-</sup> mouse carrying a human CFTR-G542X transgene*. J Mol Med. 80(9):595-604.
- Du M, Keeling KM, Fan L, Liu X, Kovacs T, Sorscher E, Bedwell DM (2006). *Clinical doses of amikacin provide more effective suppression of the human CFTR-G542X stop mutation than gentamicin in a transgenic CF mouse model*. J Mol Med. 84(7):573-82.
- Dunant P, Walter MC, Karpati G, Lochmuller H (2003). *Gentamicin fails to increase dystrophin expression in dystrophin-deficient muscle*. Muscle Nerve. 27(5):624-7.
- Dykxhoorn DM, Lieberman J (2006). *Knocking down disease with siRNAs*. Cell. 126(2):231-5.
- Ellgaard L, Helenius A (2003). *Quality control in the endoplasmic reticulum*. Nat Rev Mol Cell Biol. 4(3):181-91.
- Eriksson KK, Vago R, Calanca V, Galli C, Paganetti P, Molinari M (2004). *EDEM contributes to maintenance of protein folding efficiency and secretory capacity*. J Biol Chem. 279(43):44600-5.

- Esposito S, Balzano N, Daniele A, Villani GR, Perkins K, Weber B, Hopwood JJ, Di Natale P (2000). *Heparan N-sulfatase gene: two novel mutations and transient expression of 15 defects*. *Biochim Biophys Acta*. 1501, 1-11.
- Evers M, Saftig P, Schmidt P, Hafner A, McLoughlin DB, Schmahl W, Hess B, von Figura K, Peters C (1996). *Targeted disruption of the arylsulfatase B gene results in mice resembling the phenotype of mucopolysaccharidosis VI*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93, 8214-9.
- Fidzianska E, Abramowicz T, Czartoryska B, Glogowska I, Gorska D, Rodo M (1984). *Assignment of the gene for human arylsulfatase B, ARSB, to chromosome region 5p11-5qter*. *Cytogenet Cell Genet*. 38(2):150-1.
- Fillat C, Simonaro CM, Yeyati PL, Abkowitz JL, Haskins ME, Schuchman EH (1996). *Arylsulfatase B activities and glycosaminoglycan levels in retrovirally transduced mucopolysaccharidosis type VI cells. Prospects for gene therapy*. *J Clin Invest*. 98, 497-502.
- Fluharty AL, Stevens RL, Fung D, Peak S, Kihara H (1975). *Uridine diphospho-N-acetylgalactosamine-4-sulfate sulfohydrolase activity of human arylsulfatase B and its deficiency in the Maroteaux-Lamy syndrome*. *Biochem Biophys Res Commun*. 64(3):955-62.
- Fraldi A, Biffi A, Lombardi A, Visigalli I, Pepe S, Settembre C, Nusco E, Auricchio A, Naldini L, Ballabio A, Cosma MP (2007). *SUMF1 enhances sulfatase activities in vivo in five sulfatase deficiencies*. *Biochem J*. 403(2):305-12.
- Frischmeyer PA, van Hoof A, O'Donnell K, Guerrerio AL, Parker R, Dietz HC (2002). *An mRNA surveillance mechanism that eliminates transcripts lacking termination codons*. *Science*. 295(5563): 2258-61.
- Fuller M (2006). *New tools for the diagnosis of lysosomal storage disorders*. 9<sup>th</sup> International Symposium on Mucopolysaccharidosis and Related Disorders, Venecia, Italia.
- Fuller M, Hopwood JJ, Anson DS (1998). *Receptor mediated binding of two glycosylation forms of N-acetylgalactosamine-4-sulphatase*. *Biochim Biophys Acta*. 1406, 283-90.
- Futerman AH, van Meer G (2004). *The cell biology of lysosomal storage disorders*. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 5(7):554-65.
- G**alsulfase: arylsulfatase B, BM 102, recombinant human arylsulfatase B, recombinant human N-acetylgalactosamine-4-sulfatase, rhASB (2005). *Drugs R D*. 6(5):312-5.
- Ghosh D (2007). *Human sulfatases: a structural perspective to catalysis*. *Cell Mol Life Sci*. 64(15):2013-22
- Ghosh D (2005). *Three-dimensional structures of sulfatases*. *Methods Enzymol*. 400:273-93.
- Gibson GJ, Saccone GT, Brooks DA, Clements PR, Hopwood JJ (1987). *Human N-acetylgalactosamine-4-sulphate sulphatase. Purification, monoclonal antibody production and native and subunit Mr values*. *Biochem J*. 248(3):755-64.
- Giugliani R, Harmatz P, Wraith JE (2007). *Management guidelines for mucopolysaccharidosis VI*. *Pediatrics*. 120(2):405-18.
- Grayson C, Chapple JP, Willison KR, Webster AR, Hardcastle AJ, Cheetham ME (2002). *In vitro analysis of aminoglycoside therapy for the Arg120stop nonsense mutation in RP2 patients*. *J Med Genet*. 39(1):62-7.
- Gupta P (2006). *Therapeutic potential of stem cells*. 9<sup>th</sup> International Symposium on

Mucopolysaccharidosis and Related Disorders, Venecia, Italia.

**H**andy DE, Hang G, Scolaro J, Metes N, Razaq N, Yang Y, Loscalzo J (2006). *Aminoglycosides decrease glutathione peroxidase-1 activity by interfering with selenocysteine incorporation.* J Biol Chem. 281(6):3382-8.

Hanson SR, Best MD, Wong CH (2004). *Sulfatases: structure, mechanism, biological activity, inhibition, and synthetic utility.* Angew Chem Int Ed Engl. 43(43):5736-63.

Harmatz P, Giugliani R, Schwartz I, Guffon N, Teles EL, Miranda MC, Wraith JE, Beck M, Arash L, Scarpa M, Yu ZF, Wittes J, Berger KI, Newman MS, Lowe AM, Kakkis E, Swiedler SJ (2006). *Enzyme replacement therapy for mucopolysaccharidosis VI: a phase 3, randomized, double-blind, placebo-controlled, multinational study of recombinant human N-acetylgalactosamine 4-sulfatase (recombinant human arylsulfatase B or rhASB) and follow-on, open-label extension study.* J Pediatr. 148(4):533-539.

Harmatz P, Whitley CB, Waber L, Pais R, Steiner R, Plecko B, Kaplan P, Simon J, Butensky E, Hopwood JJ (2004). *Enzyme replacement therapy in mucopolysaccharidosis VI (Maroteaux-Lamy syndrome).* J Pediatr. 144(5):574-80.

Harmatz P, Ketteridge D, Giugliani R, Guffon N, Teles EL, Miranda MC, Yu ZF, Swiedler SJ, Hopwood JJ (2005a). *Direct comparison of measures of endurance, mobility, and joint function during enzyme-replacement therapy of mucopolysaccharidosis VI (Maroteaux-Lamy syndrome): results after 48 weeks in a phase 2 open-label clinical study of recombinant human N-acetylgalactosamine 4-sulfatase.* Pediatrics. 115(6): 681-9.

Harmatz P, Kramer WG, Hopwood JJ, Simon J, Butensky E, Swiedler SJ (2005b). *Pharmacokinetic profile of recombinant human N-acetylgalactosamine 4-sulfatase enzyme replacement therapy in patients with*

*mucopolysaccharidosis VI (Maroteaux-Lamy syndrome): a phase I/II study.* Acta Paediatr Suppl. 94(447):61-8.

Harrell L, Melcher U, Atkins JF (2002). *Predominance of six different hexa-nucleotide recoding signals 3' of read-through stop codons.* Nucleic Acids Res. 30(9):2011-7.

Haskins M (2006). *Animal models for lysosomal storage disorders.* 9<sup>th</sup> International Symposium on Mucopolysaccharidosis and Related Disorders, Venecia, Italia.

Haskins ME, Aguirre GD, Jezyk PF, Patterson DF (1980). *The pathology of the feline model of mucopolysaccharidosis VI.* Am J Pathol. 101(3):657-74.

Hein LK, Bawden M, Muller VJ, Sillence D, Hopwood JJ, Brooks DA (2004). *alpha-L-iduronidase premature stop codons and potential read-through in mucopolysaccharidosis type I patients.* J Mol Biol. 338(3):453-62.

Hein LK, Meikle PJ, Dean CJ, Bockmann MR, Auclair D, Hopwood JJ, Brooks DA (2005). *Development of an assay for the detection of mucopolysaccharidosis type VI patients using dried blood-spots.* Clin Chim Acta. 353(1-2):67-74.

Helenius A, Aebi M (2001). *Intracellular functions of N-linked glycans.* Science. 291(5512):2364-9.

Helenius A, Aebi M (2004). *Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum.* Annu Rev Biochem. 73:1019-49.

Helip-Wooley A, Park MA, Lemons RM, Thoene JG (2002). *Expression of CTNS alleles: subcellular localization and aminoglycoside correction in vitro.* Mol Genet Metab. 75(2):128-33.

Herskhovitz E, Young E, Rainer J, Hall CM, Lidchi V, Chong K, Vellodi A (1999). *Bone marrow transplantation for Maroteaux-*

- Lamy syndrome (MPS VI): long-term follow-up.* J Inher Metab Dis. 22(1):50-62.
- Heron D, Baumann C, Benichou JJ, Harpey JP, Le Merrer M (2004). *Early diagnosis of Maroteaux-Lamy syndrome in two patients with accelerated growth and advanced bone maturation.* Eur J Pediatr. 163(6):323-6.
- Hille-Rehfeld A (1995). *Mannose 6-phosphate receptors in sorting and transport of lysosomal enzymes.* Biochim Biophys Acta. 1241(2):177-94.
- Hirawat S, Welch EM, Elfring GL, Northcutt VJ, Paushkin S, Hwang S, Leonard EM, Almstead NG, Ju W, Peltz SW, Miller LL (2007). *Safety, tolerability, and pharmacokinetics of PTC124, a nonaminoglycoside nonsense mutation suppressor, following single- and multiple-dose administration to healthy male and female adult volunteers.* J Clin Pharmacol. 47(4):430-44.
- Ho TT, Maguire AM, Aguirre GD, Surace EM, Anand V, Zeng Y, Salvetti A, Hopwood JJ, Haskins ME, Bennett J (2002). *Phenotypic rescue after adeno-associated virus-mediated delivery of 4-sulfatase to the retinal pigment epithelium of feline mucopolysaccharidosis VI.* J Gene Med. 4(6):613-21.
- Holbrook JA, Neu-Yilik G, Hentze MW, Kulozik AE (2004). *Nonsense-mediated decay approaches the clinic.* Nat Genet. 36(8):801-8.
- Hopwood JJ (2006). *Epidemiology of the mucopolysaccharidoses and related disorders.* 9<sup>th</sup> International Symposium on Mucopolysaccharidosis and Related Disorders, Venecia, Italia.
- Hopwood JJ, Ballabio A (2001). *Multiple sulfatase deficiency and the nature of the sulfatase family.* En: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (Eds.) *The metabolic and molecular basis of inherited disease.* Nueva York: McGraw Hill. 8<sup>a</sup> edición, pp. 3725-3732.
- Hopwood JJ, Bate G, Kirkpatrick P (2006). *Galsulfase.* Nat Rev Drug Discov. 5(2):101-2.
- Howard MT, Anderson CB, Fass U, Khatri S, Gesteland RF, Atkins JF, Flanigan KM (2004). *Readthrough of dystrophin stop codon mutations induced by aminoglycosides.* Ann Neurol. 55(3):422-6.
- Howard MT, Frizzell RA, Bedwell DM (1996). *Aminoglycoside antibiotics restore CFTR function by overcoming premature stop mutations.* Nat Med. 2: 467-9.
- Howard MT, Malik N, Anderson CB, Voskuil JL, Atkins JF, Gibbons RJ (2004). *Attenuation of an amino-terminal premature stop codon mutation in the ATRX gene by an alternative mode of translational initiation.* J Med Genet. 41(12):951-6.
- Howard MT, Shirts BH, Petros LM, Flanigan KM, Gesteland RF, Atkins JF (2000). *Sequence specificity of aminoglycoside-induced stop codon readthrough: potential implications for treatment of Duchenne muscular dystrophy.* Ann Neurol. 48(2):164-9.
- Humbel R (1976). *Rapid method for measuring arylsulfatase A and B in leucocytes as a diagnosis for sulfatidosis, mucosulfatidosis and mucopolysaccharidosis VI.* Clin Chim Acta. 68(3):339-41.
- Hwu WL, Wang TR (1991). *Quantification of arylsulfatase B activity and diagnosis of Maroteaux-Lamy syndrome.* Zhonghua Min Guo Xiao Er Ke Yi Xue Hui Za Zhi. 32(5):280-5.
- Isbrandt D, Arlt G, Brooks DA, Hopwood JJ, von Figura K, Peters C (1994). *Mucopolysaccharidosis VI (Maroteaux-Lamy syndrome): six unique arylsulfatase B gene alleles causing variable*

disease phenotypes. *Am J Hum Genet.* 54, 454-63.

Isbrandt D, Hopwood JJ, von Figura K, Peters C (1996). *Two novel frameshift mutations causing premature stop codons in a patient with the severe form of Maroteaux-Lamy syndrome.* *Hum Mutat.* 7, 361-3.

Jackson CE, Yuhki N, Desnick RJ, Haskins ME, O'Brien SJ, Schuchman EH (1992). *Feline arylsulfatase B (ARSB): isolation and expression of the cDNA, comparison with human ARSB, and gene localization to feline chromosome A1.* *Genomics.* 14, 403-11.

James PD, Raut S, Rivard GE, Poon MC, WRNAer M, McKenna S, Leggo J, Lillicrap D (2005). *Aminoglycoside suppression of nonsense mutations in severe hemophilia.* *Blood.* 106: 3043-8.

Jezyk PF, Haskins ME, Patterson DF, Mellman WJ, Greenstein M (1977). *Mucopolysaccharidosis in a cat with arylsulfatase B deficiency: a model of Maroteaux-Lamy syndrome.* *Science.* 198, 834-6.

Jin WD, Jackson CE, Desnick RJ, Schuchman EH (1992). *Mucopolysaccharidosis type VI: identification of three mutations in the arylsulfatase B gene of patients with the severe and mild phenotypes provides molecular evidence for genetic heterogeneity.* *Am J Hum Genet.* 50, 795-800.

Karageorgos L, Harmatz P, Simon J, Pollard A, Clements PR, Brooks DA, Hopwood JJ (2004). *Mutational analysis of mucopolysaccharidosis type VI patients undergoing a trial of enzyme replacement therapy.* *Hum Mutat.* 23(3):229-33.

Karageorgos L, Brooks DA, Harmatz P, Ketteridge D, Pollard A, Melville EL, Parkinson-Lawrence E, Clements PR, Hopwood JJ (2007a). *Mutational analysis of*

*mucopolysaccharidosis type VI patients undergoing a phase II trial of enzyme replacement therapy.* *Mol Genet Metab.* 90, 164-70

Karageorgos L, Brooks DA, Pollard A, Melville EL, Hein LK, Clements PR, Ketteridge D, Swiedler SJ, Beck M, Giugliani R, Harmatz P, Wraith JE, Guffon N, Leao Teles E, Sa Miranda MC, Hopwood JJ (2007b). *Mutational analysis of 105 mucopolysaccharidosis type VI patients.* *Hum Mutat.* 28(9):897-903.

Karpati G, Lochmuller H (2001). *When running a stop sign may be a good thing.* *Ann Neurol.* 49(6):693-4.

Keeling KM, Bedwell DM (2002). *Clinically relevant aminoglycosides can suppress disease-associated premature stop mutations in the IDUA and P53 cDNAs in a mammalian translation system.* *J Mol Med.* 80(6):367-76.

Keeling KM, Brooks DA, Hopwood JJ, Li P, Thompson JN, Bedwell DM (2001). *Gentamicin-mediated suppression of Hurler syndrome stop mutations restores a low level of alpha-L-iduronidase activity and reduces lysosomal glycosaminoglycan accumulation.* *Hum Mol Genet.* 10: 291-9.

Kellermayer R (2006). *Translational read-through induction of pathogenic nonsense mutations.* *Eur J Med Genet.* 49(6):445-50.

Kellermayer R, Szigeti R, Keeling KM, Bedekovics T, Bedwell DM (2006). *Aminoglycosides as potential pharmacogenetic agents in the treatment of Hailey-Hailey disease.* *J Invest Dermatol.* 126(1):229-31.

Kerem E (2005). *Pharmacological induction of CFTR function in patients with cystic fibrosis: mutation-specific therapy.* *Pediatr Pulmonol.* 40(3):183-96.

Khajavi M, Inoue K, Lupski JR (2006). *Nonsense-mediated mRNA decay modulates*

- clinical outcome of genetic disease*. Eur J Hum Genet. 14(10):1074-81.
- Kim DH, Rossi JJ (2007). *Strategies for silencing human disease using RNA interference*. Nat Rev Genet. 8(3):173-84
- Kimura S, Ito K, Miyagi T, Hiranuma T, Yoshioka K, Ozasa S, Matsukura M, Ikezawa M, Matsuo M, Takeshima Y, Miike T (2005). *A novel approach to identify Duchenne muscular dystrophy patients for aminoglycoside antibiotics therapy*. Brain Dev. 27(6):400-5.
- Kishore BK, Ibrahim S, Lambrecht P, Laurent G, Maldague P, Tulkens PM (1992). *Comparative assessment of poly-L-aspartic and poly-L-glutamic acids as protectants against gentamicin-induced renal lysosomal phospholipidosis, phospholipiduria and cell proliferation in rats*. J Pharmacol Exp Ther. 262(1):424-32.
- Klein U, von Figura K (1980). *Characterization of dermatan sulfate in mucopolysaccharidosis VI. Evidence for the absence of hyaluronidase-like enzymes in human skin fibroblasts*. Biochim Biophys Acta. 630(1):10-4.
- Kobayashi T, Honke K, Jin T, Gasa S, Miyazaki T, Makita A (1992). *Components and proteolytic processing sites of arylsulfatase B from human placenta*. Biochim Biophys Acta. 1159(3):243-7.
- Kolodny EH, Mumford RA (1976). *Arylsulfatases A and B in metachromatic leukodystrophy and Maroteaux-Lamy syndrome: studies with 4-methylumbelliferyl sulfate*. Adv Exp Med Biol. 68:239-51.
- Kopelowitz J, Hampe C, Goldman R, Reches M, Engelberg-Kulka H (1992). *Influence of codon context on UGA suppression and readthrough*. J Mol Biol. 225(2):261-9.
- Kornfeld S, Mellman I (1989). *The biogenesis of lysosomes*. Annu Rev Cell Biol. 5:483-525.
- Kostova Z, Wolf DH (2003). *For whom the bell tolls: protein quality control of the endoplasmic reticulum and the ubiquitin-proteasome connection*. EMBO J. 22(10):2309-17.
- Kozak M (1986). *Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes*. Cell. 44(2):283-92.
- Krawczak M, Thomas NS, Hundrieser B, Mort M, Wittig M, Hampe J, Cooper DN (2007). *Single base-pair substitutions in exon-intron junctions of human genes: nature, distribution, and consequences for mRNA splicing*. Hum Mutat. 28(2):150-8.
- Kulyte A, Dryselius R, Karlsson J, Good L (2005). *Gene selective suppression of nonsense termination using antisense agents*. Biochim Biophys Acta. 1730(3):165-72.
- Kunieda T, Simonaro CM, Yoshida M, Ikadai H, Levan G, Desnick RJ, Schuchman EH (1995). *Mucopolysaccharidosis type VI in rats: isolation of cDNAs encoding arylsulfatase B, chromosomal localization of the gene, and identification of the mutation*. Genomics. 29, 582-7.
- Kuzmiak HA, Maquat LE (2006). *Applying nonsense-mediated mRNA decay research to the clinic: progress and challenges*. Trends Mol Med. 12(7):306-16.
- Lai CH, Chun HH, Nahas SA, Mitui M, Gamo KM, Du L, Gatti RA (2004). *Correction of ATM gene function by aminoglycoside-induced readthrough of premature termination codons*. Proc Natl Acad Sci USA. 101: 15676-81.
- Lam CW, Chan AO, Lai CK, Chan WH, Chan YW, Shek CC, Tong SF (2004). *A novel mutation, Y255X, of the ARSB gene in*

- a Chinese family with mucopolysaccharidosis type VI. *Chin Med J.* 117(12):1850-2.
- Leznicki AJ, Bialkowski K (1997). Improved high-performance liquid chromatographic method for N-acetylgalactosamine-4-sulfate sulfatase (arylsulfatase B) activity determination using uridine diphospho-N-acetylgalactosamine-4-sulfate. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 696(2):193-202.
- Li K, Zhang J, Buvoli M, Yan XD, Leinwand L, He H (2000). Ochre suppressor transfer RNA restored dystrophin expression in mdx mice. *Life Sci.* 66(5).
- Linde L, Boelz S, Neu-Yilik G, Kulozik AE, Kerem B (2007). The efficiency of nonsense-mediated mRNA decay is an inherent character and varies among different cells. *Eur J Hum Genet.* 15(11):1156-62.
- Linde L, Boelz S, Nissim-Rafinia M, Oren YS, Wilschanski M, Yaacov Y, Virgilis D, Neu-Yilik G, Kulozik AE, Kerem E, Kerem B (2007). Nonsense-mediated mRNA decay affects nonsense transcript levels and governs response of cystic fibrosis patients to gentamicin. *J Clin Invest.* 117(3):683-92.
- Linhardt RJ, Hileman RE (1995). Dermatan sulfate as a potential therapeutic agent. *Gen Pharmacol.* 26(3):443-51.
- Lippincott-Schwartz J, Bonifacino JS, Yuan LC, Klausner RD (1988). Degradation from the endoplasmic reticulum: disposing of newly synthesized proteins. *Cell.* 54(2):209-20.
- Litjens T, Baker EG, Beckmann KR, Morris CP, Hopwood JJ, Callen DF (1989). Chromosomal localization of ARSB, the gene for human N-acetylgalactosamine-4-sulfatase. *Hum Genet.* 82:67-8.
- Litjens T, Brooks DA, Peters C, Gibson GJ, Hopwood JJ (1996). Identification, expression, and biochemical characterization of N-acetylgalactosamine-4-sulfatase mutations and relationship with clinical phenotype in MPS-VI patients. *Am J Hum Genet.* 58, 1127-34.
- Litjens T, Hopwood JJ (2001). Mucopolysaccharidosis type VI: Structural and clinical implications of mutations in N-acetylgalactosamine-4-sulfatase. *Hum Mutat.* 18, 282-95.
- Litjens T, Morris CP, Robertson EF, Peters C, von Figura K, Hopwood JJ (1992). An N-acetylgalactosamine-4-sulfatase mutation ( $\Delta$ G238) results in a severe Maroteaux-Lamy phenotype. *Hum Mutat.* 1, 397-402.
- Loufrani L, Dubroca C, You D, Li Z, Levy B, Paulin D, Henrion D (2004). Absence of dystrophin in mice reduces NO-dependent vascular function and vascular density: total recovery after a treatment with the aminoglycoside gentamicin. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 24(4):671-6.
- Lowry RB, Applegarth DA, Toone JR, MacDonald E, Thunem NY (1990). An update on the frequency of mucopolysaccharide syndromes in British Columbia. *Hum Genet.* 85, 389-90.
- Lukacs GL, Durie PR (2003). Pharmacologic approaches to correcting the basic defect in cystic fibrosis. *N Engl J Med.* 349(15):1401-4.
- Lukatela G, Krauss N, Theis K, Selmer T, Gieselmann V, von Figura K, Saenger W (1998). Crystal structure of human arylsulfatase A: the aldehyde function and the metal ion at the active site suggest a novel mechanism for sulfate ester hydrolysis. *Biochemistry.* 37(11):3654-64.
- Mabe P, Valiente A, Soto V, Cabello F, Cornejo V, Cortés F, Raimann E (2003). Lysosomal storage diseases: the experience of a Chilean reference laboratory. 14<sup>th</sup> ESGLD Workshop, Poděbrady, República Checa.
- Mancini R, Aebi M, Helenius A (2003). Multiple endoplasmic reticulum-associated pathways degrade mutant yeast carboxy-

- peptidasa Y in mammalian cells. *J Biol Chem.* 278(47):46895-905.
- Manuvakhova M, Keeling K, Bedwell DM (2000). *Aminoglycoside antibiotics mediate context-dependent suppression of termination codons in a mammalian translation system.* *RNA.* 6: 1044-55.
- Maroteaux P (1995). *Toulouse-Lautrec's diagnosis.* *Nat Genet.* 11(4):362-3.
- Maroteaux P, Leveque B, Marie J, Lamy M (1963). *A new dysostosis with urinary elimination of chondroitin sulfate B.* *Presse Med.* 71:1849-52.
- Matalon R, Arbogast B, Dorfman A (1974). *Deficiency of chondroitin sulfate N-acetyl-galactosamine 4-sulfate sulfatase in Maroteaux-Lamy syndrome.* *Biochem Biophys Res Commun.* 23;61(4):1450-7.
- McCaughan KK, Brown CM, Dalphin ME, Berry MJ, Tate WP (1995). *Translational termination efficiency in mammals is influenced by the base following the stop codon.* *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92(12):5431-5.
- McCracken AA, Brodsky JL (2003). *Evolving questions and paradigm shifts in endoplasmic-reticulum-associated degradation (ERAD).* *Bioessays.* 25(9):868-77.
- McGovern MM, Vine DT, Haskins ME, Desnick RJ (1982). *Purification and properties of feline and human arylsulfatase B isozymes. Evidence for feline homodimeric and human monomeric structures.* *J Biol Chem.* 257(21):12605-10.
- McGuffin LJ, Bryson K, Jones DT (2000). *The PSIPRED protein structure prediction server.* *Bioinformatics* 16: 404-405.
- Meikle PJ, Ranieri E, Ravenscroft EM, Hua CT, Brooks DA, Hopwood JJ (1999). *Newborn screening for lysosomal storage disorders.* *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 30 (2):104-10.
- Mengel E, Arash L, Amraoui Y, Beck M (2006). *Hematological response to rh-ASB in MPS VI.* 9<sup>th</sup> International Symposium on Mucopolysaccharidosis and Related Disorders, Venecia, Italia.
- Mercelis R, Van Elsen AF, Leroy JG (1979). *Arylsulphatases A and B in human diploid fibroblasts: differential assay with 4-methylumbelliferylsulphate and AgNO<sub>3</sub>.* *Clin Chim Acta.* 93(1):85-92.
- Modaressi S, Rupp K, von Figura K, Peters C (1993). *Structure of the human arylsulfatase B gene.* *Biol Chem Hoppe Seyler.* 374, 327-35.
- Molinari M, Calanca V, Galli C, Lucca P, Paganetti P (2003). *Role of EDEM in the release of misfolded glycoproteins from the calnexin cycle.* *Science.* 299(5611): 1397-400.
- Montfort M, Garrido E, Hopwood JJ, Grinberg D, Chabas A, Vilageliu L (2004). *Expression and functional characterization of human mutant sulfamidase in insect cells.* *Mol Genet Metab.* 83(3):246-51.
- Mut M, Cila A, Varli K, Akalan N (2005). *Multilevel myelopathy in Maroteaux-Lamy syndrome and review of the literature.* *Clin Neurol Neurosurg.* 107(3):230-5.
- Nagy E, Maquat LE (1998). *A rule for termination-codon position within intron-containing genes: when nonsense affects RNA abundance.* *Trends Biochem Sci.* 23(6):198-9
- Namy O, Hatin I, Rousset JP (2001). *Impact of the six nucleotides downstream of the stop codon on translation termination.* *EMBO Rep.* 2(9):787-93.
- Neer TM, Dial SM, Pechman R, Wang P, Oliver JL, Giger U (1995). *Clinical vignette. Mucopolysaccharidosis VI in a miniature pinscher.* *J Vet Intern Med.* 9: 429-33.

- Nelson J (1997). *Incidence of the mucopolysaccharidoses in Northern Ireland*. Hum Genet. 101, 355-8.
- Nelson J, Crowhurst J, Carey B, Greed L (2003). *Incidence of the mucopolysaccharidoses in Western Australia*. Am J Med Genet A. 123(3):310-3.
- Neufeld, EF, Muenzer J (2001). *The Mucopolysaccharidoses*, incluido en: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (Eds.) *The metabolic and molecular basis of inherited disease*, 8ª edición, pp. 2465-2494.
- Ni X, Canuel M, Morales CR (2006). *The sorting and trafficking of lysosomal proteins*. Histol Histopathol. 21(8):899-913.
- Nilsson M, Ryden-Aulin M (2003). *Glutamine is incorporated at the nonsense codons UAG and UAA in a suppressor-free Escherichia coli strain*. Biochim Biophys Acta. 1627(1):1-6.
- O**lson TM, Alekseev AE, Liu XK, Park S, Zingman LV, Bienengraeber M, Sattiraju S, Ballew JD, Jahangir A, Terzic A (2006). *Kv1.5 channelopathy due to KCNA5 loss-of-function mutation causes human atrial fibrillation*. Hum Mol Genet. 15(14):2185-91.
- P**aterson DE, Rad G, Harper G, Weston HJ, Mattingly J (1982). *Maroteaux-Lamy syndrome, mild form: MPS VI b*. Br J Radiol. 55 : 805-12
- Perrin-Vidoz L, Sinilnikova OM, Stoppa-Lyonnet D, Lenoir GM, Mazoyer S (2002). *The nonsense-mediated mRNA decay pathway triggers degradation of most BRCA1 mRNAs bearing premature termination codons*. Hum Mol Genet. 11(23):2805-14.
- Peters C, Rommerskirch W, Modaressi S, von Figura K (1991). *Restoration of arylsulphatase B activity in human mucopolysaccharidosis-type-VI fibroblasts by retroviral-vector-mediated gene transfer*. Biochem J. 276 :499-504.
- Peters C, Schmidt B, Rommerskirch W, Rupp K, Zuhlsdorf M, Vingron M, Meyer HE, Pohlmann R, von Figura K (1990). *Phylogenetic conservation of arylsulphatases. cDNA cloning and expression of human arylsulphatase B*. J Biol Chem. 265, 3374-81.
- Petry MF, Dieter T, Burin M, Giugliani R, Leistner S (2003). *Identification of a novel mutation in the ARSB gene that is frequent among Brazilian MPS VI patients*. Genet Test. 7(4):347-9.
- Petry MF, Nonemacher K, Sebben JC, Schwartz IV, Azevedo AC, Burin MG, de Rezende AR, Kim CA, Giugliani R, Leistner-Segal S (2005). *Mucopolysaccharidosis type VI: Identification of novel mutations on the arylsulphatase B gene in South American patients*. J Inherit Metab Dis. 28(6):1027-34.
- Pilz H, von Figura K, Goebel HH (1979). *Deficiency of arylsulphatase B in 2 brothers aged 40 and 38 years (Maroteaux-Lamy syndrome, type B)*. Ann Neurol. 6(4):315-25.
- Pinotti M, Rizzotto L, Pinton P, Ferraresi P, Chuansumrit A, Charoenkwan P, Marchetti G, Rizzuto R, Mariani G, Bernardi F (2006). *Intracellular readthrough of nonsense mutations by aminoglycosides in coagulation factor VII*. J Thromb Haemost. 6:1308-14.
- Pinto R, Caseiro C, Lemos M, Lopes L, Fontes A, Ribeiro H, Pinto E, Silva E, Rocha S, Marcao A, Ribeiro I, Lacerda L, Ribeiro G, Amaral O, Sa Miranda MC (2004). *Prevalence of lysosomal storage diseases in Portugal*. Eur J Hum Genet. 12(2):87-92.
- Piotrowska E, Jakobkiewicz-Banecka J, Baranska S, Tylki-Szymanska A, Czartoryska B, Wegrzyn A, Wegrzyn G (2006). *Genistein-mediated inhibition of*

- glycosaminoglycan synthesis as a basis for gene expression-targeted isoflavone therapy for mucopolysaccharidoses. *Eur J Hum Genet.* 14(7):846-52.
- Pohlmann R, Boeker MW, von Figura K (1995). *The two mannose 6-phosphate receptors transport distinct complements of lysosomal proteins.* *J Biol Chem.* 270, 27311-8.
- Poole ES, Brimacombe R, Tate WP (1997). *Decoding the translational termination signal: the polypeptide chain release factor in Escherichia coli crosslinks to the base following the stop codon.* *RNA.* 3(9):974-82.
- Poole ES, Brown CM, Tate WP (1995). *The identity of the base following the stop codon determines the efficiency of in vivo translational termination in Escherichia coli.* *EMBO J.* 14(1):151-8.
- Poorthuis BJ, Wevers RA, Kleijer WJ, Groener JE, de Jong JG, van Weely S, Niezen-Koning KE, van Diggelen OP (1999). *The frequency of lysosomal storage diseases in The Netherlands.* *Hum Genet.* 105(1-2):151-6.
- Politano L, Nigro G, Nigro V, Piluso G, Papparella S, Paciello O, Comi LI (2003). *Gentamicin administration in Duchenne patients with premature stop codon. Preliminary results.* *Acta Myol.* 22(1):15-21.
- Poupětová H (2003). *Incidence of lysosomal storage disorders in the Czech and Slovak Republics.* 14<sup>th</sup> ESGLD Workshop, Poděbrady, República Checa.
- Ricci V, Reis S, Di DUca M, and Filocamo, M (2003). *An Alu-mediated rearrangement as cause of exon skipping in Hunter disease.* *Human genetics,* 419-425.
- Salas-Marco J, Bedwell DM (2005). *Discrimination between defects in elongation fidelity and termination efficiency provides mechanistic insights into translational readthrough.* *J Mol Biol.* 348(4):801-15.
- Sangkuhl K, Schulz A, Rompler H, Yun J, Wess J, Schoneberg T (2004). *Amino-glycoside-mediated rescue of a disease-causing nonsense mutation in the V2 vasopressin receptor gene in vitro and in vivo.* *Hum Mol Genet.* 13: 893-903.
- Sardiello M, Annunziata I, Roma G, Ballabio A (2005). *Sulfatases and sulfatase modifying factors: an exclusive and promiscuous relationship.* *Hum Mol Genet.* 14(21):3203-17..
- Sawkar AR, D'Haese W, Kelly JW (2006). *Therapeutic strategies to ameliorate lysosomal storage disorders--a focus on Gaucher disease.* *Cell Mol Life Sci.* 63(10):1179-92.
- Schmidt B, Selmer T, Ingendoh A, von Figura K (1995). *A novel amino acid modification in sulfatases that is defective in multiple sulfatase deficiency.* *Cell.* 82(2):271-8.
- Schroeder F, Goetz I, Roberts E (1984). *Age-related alterations in cultured human fibroblast membrane structure and function.* *Mech Ageing Dev.* 25(3):365-89.
- Schroeder F, Goetz I, Roberts E (1984). *Sex and age alter plasma membranes of cultured fibroblasts.* *Eur J Biochem.* 142(1):183-91.
- Schroeder R, Waldsich C, Wank H (2000). *Modulation of RNA function by amino-glycoside antibiotics.* *EMBO J.* 19(1):1-9.
- Schroers A, Kley RA, Stachon A, Horvath R, Lochmuller H, Zange J, Vorgerd M (2006). *Gentamicin treatment in McArdle disease: failure to correct myophosphorylase deficiency.* *Neurology.* 66(2):285-6
- Schuchman EH, Jackson CE, Desnick RJ (1990). *Human arylsulfatase B: MOPAC cloning, nucleotide sequence of a full-length cDNA, and regions of amino acid identity*

- with arylsulfatases A and C. *Genomics*. 6, 149-58.
- Schulz A, Sangkuhl K, Lennert T, Wigger M, Price DA, Nuuja A, Gruters A, Schultz G, Schoneberg T (2002). *Aminoglycoside pretreatment partially restores the function of truncated V(2) vasopressin receptors found in patients with nephrogenic diabetes insipidus*. *J Clin Endocrinol Metab*. 87(11):5247-57.
- Scriver CR, Beaudet LA, Sly WS, Valle D (editores, 2001) *The metabolic & molecular basis of inherited disease*. 8ª edición, Volumen III, McGraw Hill.
- Shapira E, DeGregorio RR, Matalon R, Nadler HL (1975). *Reduced arylsulfatase B activity of the mutant enzyme protein in Maroteaux-Lamy syndrome*. *Biochem Biophys Res Commun*. 62(2):448-55.
- Simonaro CM, D'Angelo M, Haskins ME, Schuchman EH (2005). *Joint and bone disease in mucopolysaccharidoses VI and VII: identification of new therapeutic targets and biomarkers using animal models*. *Pediatr Res*. 57 (5 Pt 1):701-7.
- Simonaro CM, Haskins ME, Kunieda T, Evans SM, Visser JW, Schuchman EH (1997). *Bone marrow transplantation in newborn rats with mucopolysaccharidosis type VI: biochemical, pathological, and clinical findings*. *Transplantation*. 63(10):1386-93.
- Simonaro CM, Schuchman EH (1995). *N-acetylgalactosamine-4-sulfatase: identification of four new mutations within the conserved sulfatase region causing mucopolysaccharidosis type VI*. *Biochim Biophys Acta*. 1272, 129-32.
- Sleat DE, Sohar I, Gin RM, Lobel P (2001). *Aminoglycoside-mediated suppression of nonsense mutations in late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis*. *Eur J Paediatr Neurol*. 5 Suppl A:57-62.
- Smith KS, Hallett KB, Hall RK, Wardrop RW, Firth N (1995). *Mucopolysaccharidosis: MPS VI and associated delayed tooth eruption*. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 24(2):176-80.
- Steckel F, Hasilik A, von Figura K (1983). *Biosynthesis and maturation of arylsulfatase B in normal and mutant cultured human fibroblasts*. *J Biol Chem*. 258(23):14322-6.
- Stumpf DA, Austin JH, Crocker AC, LaFrance M (1973). *Mucopolysaccharidosis type VI (Maroteaux-Lamy syndrome). I. Sulfatase B deficiency in tissues*. *Am J Dis Child*. 126(6):747-55.
- Swiedler SJ, Beck M, Bajbouj M, Giugliani R, Schwartz I, Harmatz P, Wraith JE, Roberts J, Ketteridge D, Hopwood JJ, Guffon N, Sa Miranda MC, Teles EL, Berger KI, Piscia-Nichols C (2005). *Threshold effect of urinary glycosaminoglycans and the walk test as indicators of disease progression in a survey of subjects with Mucopolysaccharidosis VI (Maroteaux-Lamy syndrome)*. *Am J Med Genet A*. 134(2):144-50.
- Taylor HR, Hollows FC, Hopwood JJ, Robertson EF (1978). *Report of a mucopolysaccharidosis occurring in Australian aborigines*. *J Med Genet*. 15(6):455-61.
- Taylor JA, Gibson GJ, Brooks DA, Hopwood JJ (1990). *Human N-acetylgalactosamine-4-sulphatase biosynthesis and maturation in normal, Maroteaux-Lamy and multiple-sulphatase-deficient fibroblasts*. *Biochem J*. 268, 379-86.
- Turner CT, Hopwood JJ, Bond CS, Brooks DA (1999). *Immune response to enzyme replacement therapy: 4-sulfatase epitope reactivity of plasma antibodies from MPS VI cats*. *Mol Genet Metab*. 67(3):194-205.
- Vestermark S, Tonnesen T, Andersen MS, Guttler F (1987). *Mental retardation in*

- a patient with Maroteaux-Lamy. *Clin Genet.* 31(2):114-7.
- Villani GR, Balzano N, Di Natale P (1998). *Two novel mutations of the arylsulfatase B gene in two Italian patients with severe form of mucopolysaccharidosis.* Mutations in brief n°. 127. *Hum Mutat.* 11, 410.
- Villani GR, Balzano N, Vitale D, Saviano M, Pavone V, Di Natale P (1999). *Maroteaux-lamy syndrome: five novel mutations and their structural localization.* *Biochim Biophys Acta.* 1453, 185-92.
- Vine DT, McGovern MM, Schuchman EH, Haskins ME, Desnick RJ (1982). *Enhancement of residual arylsulfatase B activity in feline mucopolysaccharidosis VI by thiol-induced subunit association.* *J Clin Invest.* 69(2):294-302.
- von Figura K, Hasilik A (1986). *Lysosomal enzymes and their receptors.* *Annu Rev Biochem.* 55:167-93.
- Voskoboeva E, Isbrandt D, von Figura K, Krasnopolskaya X, Peters C (1994). *Four novel mutant alleles of the arylsulfatase B gene in two patients with intermediate form of mucopolysaccharidosis VI (Maroteaux-Lamy syndrome).* *Hum Genet.* 93, 259-64.
- Voskoboeva E, Krasnopol'skaia KD, Peters K, von Figura K (2000). *Identification of mutations in the arylsulfatase B gene in Russian mucopolysaccharidosis type VI patients.* *Genetika.* 36, 837-43 (en ruso).
- W**agner KR, Hamed S, Hadley DW, Gropman AL, Burstein AH, Escolar DM, Hoffman EP, Fischbeck KH (2001). *Gentamicin treatment of Duchenne and Becker muscular dystrophy due to nonsense mutations.* *Ann Neurol.* 49(6):706-11.
- Waldow A, Schmidt B, Dierks T, von Bulow R, von Figura K (1999). *Amino acid residues forming the active site of arylsulfatase A. Role in catalytic activity and substrate binding.* *J Biol Chem.* 274(18):12284-8.
- Walkley SU, Thrall MA, Haskins ME, Mitchell TW, Wenger DA, Brown DE, Dial S, Seim H (2005). *Abnormal neuronal metabolism and storage in mucopolysaccharidosis type VI (Maroteaux-Lamy) disease.* *Neuropathol Appl Neurobiol.* 31(5):536-44.
- Welch EM, Barton ER, Zhuo J, Tomizawa Y, Friesen WJ, Trifillis P, Paushkin S, Patel M, Trotta CR, Hwang S, Wilde RG, Karp G, Takasugi J, Chen G, Jones S, Ren H, Moon YC, Corson D, Turpoff AA, Campbell JA, Conn MM, Khan A, Almstead NG, Hedrick J, Mollin A, Risher N, Weetall M, Yeh S, Branstrom AA, Colacino JM, Babiak J, Ju WD, Hirawat S, Northcutt VJ, Miller LL, Spatrack P, He F, Kawana M, Feng H, Jacobson A, Peltz SW, Sweeney HL (2007). *PTC124 targets genetic disorders caused by nonsense mutations.* *Nature.* 447(7140):87-91.
- Wicker G, Prill V, Brooks D, Gibson G, Hopwood J, von Figura K, Peters C (1991). *Mucopolysaccharidosis VI (Maroteaux-Lamy syndrome). An intermediate clinical phenotype caused by substitution of valine for glycine at position 137 of arylsulfatase B.* *J Biol Chem.* 266, 21386-91.
- Wilschanski M, Famini C, Blau H, Rivlin J, Augarten A, Avital A, Kerem B, Kerem E (2000). *A pilot study of the effect of gentamicin on nasal potential difference measurements in cystic fibrosis patients carrying stop mutations.* *Am J Respir Crit Care Med.* 161(3 Pt 1):860-5.
- Wilschanski M, Yahav H, Yaacov Y, Blau H, Bentur L, Rivlin J, Aviram M, Bdolah-Abram T, Bebok Z, Shushi L, Kerem B, Kerem E (2003). *Gentamicin-induced correction of CFTR function in patients with cystic fibrosis and CFTR stop mutations.* *N Engl J Med.* 349:1433-41.

Wojczyk B (1986). *Lysosomal arylsulfatases A and B from horse blood leukocytes: purification and physico-chemical properties.* Biol Cell. 57(2):147-52.

Wu JY, Yang CF, Lee CC, Chang JG, Tsai FJ (2000). *A novel mutation (Q239R) identified in a Taiwan Chinese patient with type VI mucopolysaccharidosis (Maroteaux-Lamy syn-drome).* Hum Mutat. 15(4):389-90.

Yamashita K, Hara-Kuge S, Ohkura T (1999). *Intracellular lectins associated with N-linked glycoprotein traffic.* Biochim Biophys Acta. 1473(1):147-60.

Yang CF, Wu JY, Lin SP, Tsai FJ (2001). *Mucopolysaccharidosis type VI: Report of two Taiwanese patients and identification of one novel mutation.* J Formos Med Assoc. 100, 820-3.

Yogalingam G, Bielicki J, Hopwood JJ, Anson DS (1997). *Feline mucopolysaccharidosis type VI: correction of glycosaminoglycan storage in myoblasts by retrovirus-mediated transfer of the feline N-acetylgalactosamine 4-sulfatase gene.* DNA Cell Biol. 16, 1189-94.

Yogalingam G, Crawley A, Hopwood JJ, Anson DS (1999). *Evaluation of fibroblast-mediated gene therapy in a feline model of mucopolysaccharidosis type VI.* Biochim Biophys Acta. 1453, 284-96.

Yogalingam G, Hopwood JJ, Crawley A, Anson DS (1998). *Mild feline mucopolysaccharidosis type VI. Identification of an N-acetylgalactosamine-4-sulfatase mutation causing instability and increased specific activity.* J Biol Chem. 273, 13421-9.

Yogalingam G, Litjens T, Bielicki J, Crawley AC, Muller V, Anson DS, Hopwood JJ (1996). *Feline mucopolysaccharidosis type VI. Characterization of recombinant N-acetylgalactosamine 4-sulfa-*

*tase and identification of a mutation causing the disease.* J Biol Chem. 271, 27259-65.

Yogalingam G, Muller V, Hopwood JJ, Anson DS (1999). *Regulation of N-acetylgalactosamine 4-sulfatase expression in retrovirus-transduced feline mucopolysaccharidosis type VI muscle cells.* DNA Cell Biol. 18, 187-95.

Yoshida M, Ikadai H, Maekawa A, Takahashi M, Nagase S (1993). *Pathological characteristics of mucopolysaccharidosis VI in the rat.* J Comp Pathol. 109, 141-53.

Yoshizawa S, Fourmy D, Puglisi JD (1998). *Structural origins of gentamicin antibiotic action.* EMBO J. 17(22):6437-48.

Zingman LV, Park S, Olson TM, Alekseev AE, Terzic A (2007). *Aminoglycoside-induced translational read-through in disease: overcoming nonsense mutations by pharmacogenetic therapy.* Clin Pharmacol Ther. 81(1):99-103.

## Enlaces de internet

Biomarin Pharmaceutical Inc :  
[www.biomarinpharm.com](http://www.biomarinpharm.com)

ClustalW:  
[www.ebi.ac.uk/clustalw](http://www.ebi.ac.uk/clustalw)

dCAPS Finder 2.0:  
[helix.wustl.edu/dcaps/dcaps.html](http://helix.wustl.edu/dcaps/dcaps.html)

Gene Cards:  
[www.genecards.org](http://www.genecards.org)

Global MPS VI Registry:  
[www.mpsvi.org/Registry/links.cfm](http://www.mpsvi.org/Registry/links.cfm)

Human Gene Mutation Database:  
[www.hgmd.org](http://www.hgmd.org)

Human Genome Variation Society  
(nomenclatura):  
[www.hgvs.org/mutnomen](http://www.hgvs.org/mutnomen)

**Inborn Errors in Metabolism:**

*www.med.unibs.it/%7Emarchesi/  
inborn.html*

**MPS España:**

*www.mpsesp.org*

**NetGene:**

*www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2*

**NNPredict:**

*alexander.compbio.ucsf.edu/~nomi/nnpredict.html*

**PeptideMass:**

*www.expasy.ch/tools/peptide-mass.html*

**Primer 3:**

*frodo.wi.mit.edu/primer3/input.htm*

**Protein Data Bank:**

*www.rcsb.org/pdb/Welcome.do*

**Protein Mass Calculator:**

*csc-fserve.hh.med.ic.ac.uk/cgi-bin/masscalc*

**Protein Structure Prediction Server :**

*bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/psiform.html*

**PTC Pharmaceuticals Inc:**

*www.ptcbio.com/big/indexhome.html*

**RepeatMasker:**

*www.repeatmasker.org/cgi-  
bin/WEBRepeatMasker*

**The Canadian Society for  
Mucopolysaccharide and Related Diseases  
Inc:**

*www.mpsociety.ca*

**The European Study Group on  
Lysosomal Storage Diseases (ESGLD):**

*www.esgld.org*

**The Global Organisation for Lysosomal  
Diseases:**

*www.interactivhealth.com/gold*

**The Hapmap Project:**

*www.hapmap.org/index.html.en*

**The Mendelian Inheritance in Man:**

*www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim*

**UCSC Genome Browser:**

*genome.ucsc.edu*



# *Agradecimientos*



## AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mis impagables «jefes» Daniel Grinberg, Bru Cormand y Lluïsa Vilageliu el haberme dado la oportunidad de ser doctora y apoyarme todos estos años.

A la doctora Amparo Chabás y a su grupo del Institut de Bioquímica Clínica, es especial a Josep Jarque, sin cuya colaboración este trabajo no hubiera sido posible.

A la familia Falip, con mi gratitud, porque sin conocerme se tomaron la molestia de proporcionarme material para mis guarreridas genéticas.

A todos los «moleculares», «epis» y «evos» que me han ayudado con las innumerables dudas metódicas, problemas técnicos y préstamos biológicos a lo largo de estos años, y en especial a los que han contribuido en mayor o menor medida con la parte experimental: Franciscos Lázaro, Nieves Hernández, Raquel García, Mónica Cozar, Gessamí Sánchez y Laura Rodríguez; sin olvidarse de Magda Montfort, que me enseñó los principios básicos del trabajo de laboratorio (¡al fin y al cabo sobreviví!).

Pero por encima de todo quiero agradecer el cariño y confianza de la gente que me ha ayudado a soportar con entereza regular y relativo equilibrio mental todos estos años de sangre, sudor y lágrimas (literalmente). Me faltan palabras para agradecer toda la amistad, comprensión, ánimo y apoyo incondicional de Toni y Álex (es una suerte poder hablar con un informático de PCRs y que más o menos sepa a lo

que te refieres). Extiendo las gracias a los demás amigos *fibers* y *no-fibers*, que mantuvieron mi mente alejada de las células y los ácidos nucleicos en las horas de asueto.

A toda la gente de Cal Rafa, con mi más sentido reconocimiento y promesa de devoción eterna, por las muchas horas de música, evasión, entretenimiento, cotilleos, relajación, confesiones íntimas, frikadas, debates, discusiones, simpatía, descubrimientos, juergas apoteósicas, bailoteos, conciertos, fotos, tonterías, afán cultural, carcajadas, risas y pérdida de productividad en general.

A mi peña *facultera* y *perifacultera*, por tantos momentos memorables.

A Salva y los «Llifex», por tener fe en mí y pensar que merecía pertenecer a la «Liga» (esto me ha *llegao*), y contar conmigo para nuevos proyectos.

A Jaume, Ricard, Marta, Chari y a los usuarios de citometría, por su calidez y por hacerme recordar que existe vida más allá del departamento.

A Lena y a las chicas de la compañía *Hila, hila, hila!* y *Malak*, por las horas de baile.

A mis padres, que espero que disfruten intentando desentrañar esta tesis.

Y por encima de todo a Tyrson, por los años de amor. Por haberme esperado y no haber dudado jamás de mí. Porque mereces una recompensa y porque quiero que sigas ahí, acompañándome en todo lo que vivamos.