

UNIVERSIDAD POMPEU FABRA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS EXPERIMENTALES
Y DE LA SALUD

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA SALUD
Y DE LA VIDA

REPARACION DE MUTACIONES EN EL GEN *CFTR*

COMO ESTRATEGIA DE TERAPIA GENICA

PARA LA FIBROSIS QUISTICA

DAVID DE SEMIR FRAPPART

UNIVERSIDAD POMPEU FABRA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS EXPERIMENTALES
Y DE LA SALUD

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA SALUD
Y DE LA VIDA

REPARACION DE MUTACIONES EN EL GEN *CFTR*

COMO ESTRATEGIA DE TERAPIA GENICA

PARA LA FIBROSIS QUISTICA

Memoria presentada por **David de Semir Frappart**
para optar al título de Doctor por la Universidad Pompeu Fabra.
El trabajo experimental ha sido dirigido por el **Dr. Josep M. Aran** y
realizado en el Laboratorio de Terapia Génica
del Centro de Genética Médica y Molecular
en el Institut de Recerca Oncològica-IDIBELL, Barcelona

TESIS DOCTORAL

Barcelona, Febrero 2005

Dipòsit legal: B.36761-2005
ISBN: 84-689-3461-5

A mis abuelos “Papy” y “Manoune”

A mis abuelos Agustí y “Mutti”

A mis padres Vladi y Joëlle

A mi hermano Jean-Marc

Al resto de la familia

A mis amigos

Me gustaría dar las gracias...

Hola **Tesis**,

por fin he acabado contigo!

Estas páginas serán lo último que escriba pero antes de despedirme me gustaría que supieras cómo te conocí.

Repasemos la historia.....

Cuando me licencié en Biología por la Universidad Autónoma de Barcelona (UAB) en 1998, no sabía muy bien que hacer, supongo que al igual que la mayoría de biólogos que finalizan la licenciatura. Hice un máster de periodismo en Comunicación Científica en el Institut d'Educació Contínua de la Universitat Pompeu Fabra (UPF) durante un año y fue durante este periodo cuando uno de los profesores, el Dr. **Jordi Camí** del Institut Municipal d'Investigacions Mèdiques (IMIM), me comentó que si estaba interesado en realizar un doctorado en biología, él conocía investigadores de la UPF y del IMIM que buscaban becarios. Me sugirió entrevistarme con el Dr. **Josep M. Antó** de la UPF quién me aconsejó a su vez hablar con el Dr. **Francesc X. Real**. Todavía recuerdo las palabras de Paco que venían a decir lo siguiente: "piensa que el doctorado es aprender a caminar en esto de la ciencia" como augurando el principio de una carrera científica y que supiera lo que significaba entrar en el mundillo científico. También me dijo que no me limitara a entrevistarme con personas de una universidad únicamente y que visitara otros centros de investigación como por ejemplo el Institut de Recerca Oncològica (IRO). Sabio consejo dado que es allí donde tu (Tesis) y yo empezamos una relación muy intensa de cinco años. Nos fuimos conociendo poco a poco, empezando por leer "papers" y hacer algún que otro experimento.....pero me fuiste poniendo las cosas difíciles, que acabaron convirtiéndose en mi reto personal para conquistarte, tener resultados!

El primer día que visité el laberíntico IRO, la Dra. **Virginia Nunes** me presentó a los Dres. **Mariona Arbonés** y **Josep M. Aran** quienes me explicaron sus proyectos de investigación. Cuando Josep me planteó trabajar sobre terapia génica de la fibrosis quística, sonó tan bien que enseguida me decanté por su proyecto pero sólo faltaba que él me "fichara" como becario/precario. El 6 de abril de 1999 pisaba por segunda vez el IRO para incorporarme al grupo llamado entonces "Trans-Tg" (Transgénicos y Terapia Génica) a pesar de firmar el contrato de precariedad laboral (becario) al mes siguiente.

Bueno Tesis, ya sabes qué día empezó el amor a primera vista entre tú y yo y conoces un poquito más nuestra historia por si no recordabas lo nuestro. Así que después de escribirte, ha llegado el momento de agradecer a todas las personas que directa o indirectamente me han ayudado a nivel experimental o sencillamente haciéndome la vida más agradable en el laboratorio. En un buen ambiente de trabajo la probabilidad de que salgan los experimentos es superior.

En primer lugar, me gustaría agradecer el apoyo económico recibido por parte de la **Asociación Catalana de Fibrosis Quística** y ese ánimo constante para seguir trabajando. Muchas Gracias.

Me gustaría dar las gracias...

Dr. Josep M. Aran, quisiera darte las gracias por la paciencia que has tenido conmigo y el haber confiado en mí para llevar a buen puerto este proyecto de tesis sobre el que hemos trabajado codo con codo. Te has estrenado como director de tesis y yo como becario predoctoral. Muchas gracias.

Creo sinceramente que no hemos sido “la extraña pareja” sino todo lo contrario, un buen tándem científico. Gracias por enseñarme todo lo que sé.

Al Dr. **Xavier Estivill**, por haberme acogido en el Centro de Genética Médica y Molecular (CGMM) del IRO cuando en abril de 1999 todavía eras el jefe del centro (actualmente en el Centro de Regulación Genómica-CRG). La primera vez que hablé contigo en tu despacho me apuntaste tu negativa a que me incorporara sin beca a pesar de que te ofreciera gratis por un tiempo mis manos inexpertas (era un reciente licenciado) para trabajar en el laboratorio. Siempre te interesaste por nuestro trabajo experimental. He tenido la suerte de conocer al mayor exponente y pionero de la genética en España.

A la Dra. **Virginia Nunes**, por interesarte por nuestro trabajo y por tomar tan bien el relevo en la dirección del CGMM. Creo que siempre estuviste muy preocupada por las inquietudes de los becarios.

A la Dra. **Teresa Casals**, por contestar a todas mis preguntas en relación a la fibrosis quística y por la ayuda de todo tipo prestada a lo largo de los años de tesis.

A la Dra. **Sara Larriba**, por ser mi “mamá científica” en mis inicios de la tesis. Ha sido un gusto trabajar contigo. Me enseñaste muchas cosas entre ellas a hacer bien las PCR y sus truquillos y a planificar bien el trabajo de laboratorio día a día. Es imposible enfadarse con una persona tan dulce como tú.

A la Dra. **Anna Aviñó**, por cederme tu poyata cuando llegué al CGMM y por todos los oligonucleótidos que nos sintetizaste y que fueron utilizados en nuestros experimentos.

Al Dr. **Jordi Pétriz** (IDIBAPS-Hospital Clínic) por tus consejos a la hora de planificar los experimentos con el citómetro de flujo y por su manejo además de tus chistes.

A **Anna Bosch** (Serveis Científico-Tècnics de la UB en el Hospital Clínic) por el manejo del microscopio confocal y por aconsejarnos como mejorar nuestros experimentos.

A la Dra. **Marga Nadal** por tu maestría con el FISH y tus bromitas.

A **Juan Ramón González** (Institut Català d'Oncologia) por tus análisis estadísticos.

A la Dra. **Pamela Zeitlin** (Johns Hopkins University, Baltimore, USA) por habernos cedido las células IB3.1, modelo celular de estudio de la tesis.

Al Dr. **Eric B. Kmiec** (Universidad de Delaware, Newark, USA) por cedernos el plásmido pK^sm4021, utilizado en el ensayo *in vitro* para evaluar la competencia reparadora de las células IB3.1.

Grupo TG inicial.....

Empezando por **Meritxell Carrió** (“Mery”, ahora ya es doctora!) quien me enseñó los trucos del trabajo en cultivos. **Marta Oset** por aconsejarme cómo preparar las soluciones.

Por las copas que nos hemos tomado juntos y por vuestro interés por mis experimentos: **Nuria Andreu** (“Andrews”), **Meritxell Huch** (“Rookie”), **Anna Cascante** (“Rachosa”, “Casqui”) y **Marta Riera** (“la doctora”, por cierto, gracias por acogernos en tu casa postdoc marsellesa!).

Me gustaría dar las gracias...

Y ya que hemos mencionado a **Meritxell Carrió**, hablemos de **Eduard Serra**. Podría decirse que fuiste el alma del IRO cuando yo llegué, preocupado por la situación precaria de los becarios como el que más y organizador de eventos deportivos.

Grupo TG final.....

A **Raquel Pluvinet** ("Reichel") por enseñarme a hacer Westerns y a comentar siempre la jugada sobre los experimentos además de interesarte por mi tesis.

A **Itziar Martínez** ("Atzayar", "Catwoman") por ser cofundadora del grupo IRO-TG-K2 de montañismo junto con Rafa y conmigo. Desde que llegaste al equipo TG siempre me demostraste una preocupación por saber cómo me iba la tesis.

Que los lectores me permitan una mención especial para **Rafa Moreno** ("Pisha", "Copeta", "Harry Potter"), ya que el "Pisha" ha sido más que un amigo, como un hermano "científico" para mí, desde que llegó al grupo TG. Rafa, todavía recuerdo tus palabras al verme por primera vez cuando llegué de mi primer congreso (Sociedad Española de Terapia Génica en noviembre 2001-Valencia) y ya hacía una semana que trabajabas en el grupo: "hombre! tu eres el famoso David!" (parece ser que en mi ausencia te habían ido informando de que un tal David trabajaba en TG). El apretón de manos tan efusivo y amistoso que me diste, ya mostraba tu carácter especial. La conexión fue total. Sin apenas conocerte, ya hacíamos bromas desde el primer momento, salíamos juntos por la noche, cenitas viendo los partidos de fútbol y qué decir de los viajesitos que nos hemos "pegao", algunos de ellos en compañía de otras personas, Marsella, St Tropez, Roma, París, Valle de Nuria, Sant Jaume de Frontanyà. A tí te gustaba mucho (o más bien te choteabas) que dijera que "Rafa dio buen ambiente en el laboratorio". Cuando el equipo TG inicial se trasladó al CRG, la verdad es que Raquel y yo nos quedamos un poco solos pero tu llegada lo revolucionó todo. Gracias por tu amistad y por todos los cuñaaaaaaaaaaaaaaaaaas!

CGMM.....

A **Montse Gómez** ("Moncha"), **Lidia Feliubadaló** ("Nonia"), **Marga Nadal** ("Marguerite") por haber aguantado mi escritura de tesis en la sala de postdocs. De todas maneras cuando Montse y Nonia hablaban no había manera de pararlas. Yo también he tenido que escuchar vuestras recetas de cocina (tiramisú en especial) y los cursos que hacen los centros cívicos de Barcelona. Gracias por vuestros consejos sobre la manera de escribir una tesis. Gracias a vosotras, ahora sé un poco más del EndNote, de Word (de los famosos estilos e índices). Siempre que tenía una duda respecto a la tesis acudía a vosotras porque sabía que vuestra experiencia me la iba a resolver.

A **Xavi Muñoz** ("Xafi", "Onésimo") y **Benja Rodríguez** ("Muppet", "Woody", "Tiñoso", "Carlston", "Benjamitu") (integrantes del "tripartit" Xafi-Benja-Dese) por haberme hecho reír tanto a pesar de que fuera a mi costa pero conmigo presente. Xavi, a quien ya conocía de la UAB, me ayudó a integrarme en el IRO desde el primer día y siempre tenía algún comentario que te hacía sonreír. De hecho fue él quien me presentó a Benja, un tipo muy serio y seco (nunca más lejos de la realidad) pero resultó ser una excelente persona y un buen amigo. Tal era la confianza que una tarde acabé montando muebles del IKEA en su casa en "gallumbos", lo mejor fue cuando nos sorprendió su novia.....

Me gustaría dar las gracias...

A **Mariona Font** ("Marionetaaaaa!"), **Maite Giménez** y **Rafa de Cid** por haberme aguantado durante nuestro primer curso de genética, en Sestri-Levante (Italia), marzo 2000. Casi perdimos a las dos chicas antes de zarpar pero esa anécdota le añadió un toque especial a ese viaje.

A **Benja Rodríguez** y **Mariona Font**, por formar el "tripartit tesis" y compartir consejos y penurias a la hora de escribir la tesis. Es bueno tener a amigos escribiendo las respectivas tesis para que te animen a seguir adelante.

A **Rafa Moreno** y **Mariona Font** por esos kilómetros que hicimos (con el Focus!) hasta Marsella y Saint-Tropez para ir a visitar a Marta Riera. Recordaré con mucho cariño ese viaje. Que bien lo pasamos!

A la unidad de DNA del IRO: **David Otero** y **Anna Puig** (ambos en el CRG actualmente) por vuestra paciencia con las secuenciaciones y sobre todo durante la optimización de la PCR-OLA. A **Rosabel Marrugat**, **Montse Lema**, **Vanesa Cervera** por tomar tan bien el relevo de vuestros predecesores.

A **Vanesa Valero**, **Rafa Moreno**, **Vanesa Cervera** y **Lola Bellido** por ese "peaso" fin de semana pasado en Sant Jaume. Se dieron unas circunstancias excepcionales que no se han repetido con otros amigos. Quedará como un recuerdo imborrable. Sois cojonudos! Gusi!!!!!!!!!!!!!!!

A **Nadia García** por regalarme una sonrisa cada vez que me has visto en el laboratorio y mostrame tu interés por mi tesis.

A **Consol Bancells** (exIRO) por ese interés constante en saber como me iban las cosas y ayudarme con el típico papeleo de secretaría.

Joan Sintes ("Joanitu") y **Pilar Domingo** ("Pili") que formaron parte de la segunda hornada de "secres" del IRO. Gracias por ser tan eficientes. Siempre supísteis resolver mis problemas "burrocráticos".

A los "hackers" **Joan Sintes**, **Benja Rodríguez** y **Rafa Moreno** por haberme llenado el ordenador portátil (comprado especialmente para la escritura de la tesis) de programas necesarios para su correcto funcionamiento. Gracias por la música y las películas que siguen llenando mi disco duro.

A **Paco Rico** ("El Gato", "Paquito", "Crilin"), **Joan Sintes**, **Rafa Moreno**, **Benja Rodríguez** y **Xavi Muñoz** por formar el equipo de fútbol "CGMM all stars". Había que hacer deporte después de los experimentos por aquello de "Mens sana in corpore sano".

A **Anna Aubareda**, por compartir conmigo tus 10 min de incubación y charlar un rato sobre cualquier tema. Gracias por tus consejos sobre los Western-blot. Siempre recordaré tus abrazos "teletubbie" y cariño y tu predisposición a las risas. Gracias por haberme escuchado cuando no he estado bien y he necesitado tu punto de vista.

A **Mariona Font**, por haber confiado en mí para explicarme todos tus problemas. Yo hice lo mismo contigo. Fuiste una excelente compañera de viaje hacia Marsella junto con Rafa.

A **Gemma González** ("Flippy"), fue bonito mientras duró pero la próxima vez tómale el pelo a otro. A pesar de todo supongo que guardaré un buen recuerdo de nuestro viaje al congreso de fibrosis quística en Tomar (Portugal).

Me gustaría dar las gracias...

A **Jaume Condal, Alberto Martín y Toni Martín** por ser unos dignos contrincantes de fútbol sala. Por cierto, lo pasamos muy bien en el concierto de Mara Dierssen en Luz de Gas. Jaume, gracias por dejarte ganar al ping-pong!

A **Antonia Gaona**, por compartir y sufrir la responsabilidad del “speed-vac” y la “boooooooooomba”. Gracias por resolver los problemas relacionados con los pedidos.

Al equipo informático del IRO: **Mariano** (exIRO), **Domènec Farré** (exIRO), **Fran** por responder a mis dudas acerca del funcionamiento de unas máquinas con muchas teclas llamadas ordenadores.

A **Carles Pucharcós y Lluís Armengol** (actualmente en el CRG), por resolver problemas informáticos asociados a la presentación de seminarios o pósters.

A los técnicos del IRO: **Loli Ramos** (“Lolista”), **Javier Giménez** (“Javi”), **Helena Kruyer, Carolina Gómez** (“Carol”), **Isabel Banchs** (“Isa”), **Jordi Corral** (“Georges”), **Pere Fábregas** (“L’avi”), por contestar a todas mis preguntas de carácter científico y resolver problemillas técnicas de laboratorio.

A **Eva Pros, Bego Hurtado, Mari Mulero y Nerea Abasolo** por esos bailoteos que nos hemos pegado juntos (el mejor en la sala Bikini) y cenitas varias. Gracias por la camiseta que me regalásteis para mi cumple. Cada vez que me la pongo os recuerdo con cariño.

A los Dres. **Conxi Lázaro y Miguel Angel Pujana** por tener el mismo interés por OT que yo y compartir impresiones al respecto.

A **Loli Ramos** (“Lolista”) y **Javier Giménez** por los consejos técnicos recibidos y por vuestras colaboraciones en los experimentos como la puesta a punto de la PCR-OLA.

A **Loli Ramos** por ser una excelente acompañante en el congreso de Nacional de FQ en Oviedo. No volví a ser el mismo después de ese viaje juntos.....sabía que te reirías al leer este comentario.

A **Enric Domènec**, por permitirme utilizar el escáner del laboratorio Z siempre que lo he necesitado para preparar seminarios a pesar de que estuvieras trabajando, y por la grabación de algunos CD de música.

Doctorandos de la UPF e IMIM.....

A **Raúl Méndez** por ser “miembro fundador” junto conmigo de la Comisión de fiestas y festejos de nuestra promoción de doctorado y organizar las salidas nocturnas que hacíamos al inicio de los cursos de doctorado. A **Sergi Castellano** por compartir esos momentos de palomitas en el cine y organizar cenitas en su casa que siempre sirvieron para mejorar la relación entre becarios. A **Anna Castañé**, quien por cierto fue la primera persona que conocí de nuestra promoción, por tener tanta paciencia a la hora de preparar las presentaciones en powerpoint exigidas por los profesores de doctorado y compartir esos “buenos momentos” de miniseminarios en las clases. De hecho, en algunas de ellas también participaron **María Isabel Bahamonde** y **Susanna Aguilar** con las que también disfruté mucho haciendo las presentaciones. Esta última resultó ser la capitana del equipo de voleyplaya IMIM-UPF-IRO, creo que ganamos pocos partidos pero nos lo pasamos muy bien en verano jugando delante del Hospital del Mar. A **Nuria Ribas** por tu preocupación constante en intentar mejorar la situación precaria de los becarios y por demostrarme tu simpatía.

Me gustaría dar las gracias...

¡¡¡Viva Chile!!!.....

A mis amigos chilenos de Barcelona que me han conseguido que sienta algo muy especial por ese país maravilloso llamado Chile. Gracias por “chilenizarme”. **Eduardo Ghigliotto** (“Negro”), **Raimundo Roberts** (“Rai”), **María Isabel Bahamonde** (“Flaquita”), **Yaniré Andrade**, por las múltiples “chelas” y Piscos ingeridos y los “carretes” a lo largo de estos años. Siempre me preguntastéis cómo me iba la tesis. Al “**Negro**” por haberte casado con **Vanesa Jarque** (“La Flaca”) y por haber hecho de Barcelona vuestro lugar de residencia. Fue un honor ser vuestro padrino de boda. Me hizo muy feliz saber que te quedarías a vivir en Barcelona, supe que de esta manera ganaba un amigo para toda la vida. A **Raimundo Roberts**, por ser un excelente compañero de piso. El hecho de que te vinieras a vivir conmigo afianzó todavía más nuestra amistad. A **María Isabel Bahamonde**, por ser la primera persona con la que conecté de verdad en el doctorado. Gracias por ser tan divertida y sincera conmigo. A **Yaniré Andrade** por ser tan cariñosa siempre conmigo y regalarme constantemente tu divertida sonrisa.

Aunque al otro lado del Atlántico, quisiera dar las gracias a Giorgio Montalbetti por acogerme siempre tan bien en su casa de Santiago de Chile. ¡Gracias amigo!

A **Fernando Castellarnau** por tu curiosidad en los temas científicos y pedirme explicaciones y aclaraciones al respecto y por interesarte por mi trabajo. Gracias amigo de toda la vida.

A **Marta Asensio** y **David Botello** por aguantar mis rollos sobre los experimentos de la tesis y sobre la fibrosis quística. Ya lo debéis saber todo acerca de esta enfermedad después de las charlitas que os he dado. **Marta**, creo que eres una persona excepcional y me arrepiento del daño que te he podido causar pero desgraciadamente los sentimientos incontrolados juegan malas pasadas a veces. **David**, somos amigos desde que te conocí el primer día de clase en la facultad de biología de la UAB. Gracias por interesarte por mi tesis.

A **Lola Bellido** (“Lolilla”) por enseñarme a bailar sevillanas y siempre recibirme con una sonrisa de oreja a oreja al verme. Tengo un muy buen recuerdo del concierto de David de María en Luz de Gas y el bailoteo posterior en el Mirablau pero no se lo cuentes a Rafa.....

A **Francesca Di Nunzio** (“Francy”), por haberme dado la energía y ánimo necesarios para el último tramo de la escritura de la tesis. Gracias por ser mi “professoressa d’italiano”.

A la **Fundación Sira Carrasco de ayuda para la fibrosis quística** por el apoyo económico.

A los **Bomberos de la Generalitat** por haberme rescatado en el Pedraforca (octubre 2004) junto al equipo IRO-TG-K2 y permitir que pueda acabar de escribir la tesis.

Espero que los no aludidos no me lo echen en cara, quizás sea debido a mi falta de memoria el que no aparezcan en estas páginas. No es fácil recordar tantos buenos momentos durante cinco años de su vida rodeado de tanta gente agradable.

Gracias a todos los que habéis aguantado y escuchado mis anécdotas sobre la tomatina, la vaquilla, el autoestopista y el rescate de bomberos en la montaña.

Me gustaría dar las gracias...

Finalmente, quisiera dar las gracias a mi familia, en especial a mis abuelos **Papy** (Gilbert Frappart, fallecido en el mes de noviembre 2004) y **Manoune** (Elise Pujade), **Agustí** (Agustí de Semir) y **Mutti** (Maya Maiska), a mis padres **Vladimir de Semir** y **Joëlle Frappart**, a mi hermano **Jean-Marc de Semir** por interesarse por mi trabajo y animarme a tirar adelante un proyecto importante en la vida como es una tesis doctoral. ¡Muchas gracias, merci beaucoup!

INTRODUCCION	3
1. DESCRIPCION HISTORICA DE LA FIBROSIS QUISTICA	4
2. ASPECTOS CLINICOS DE LA FIBROSIS QUISTICA	6
2.1. Patología respiratoria	6
2.2. Patología digestiva	8
2.3. Aparato reproductor, infertilidad y embarazo	9
2.4. Patología nutricional.....	10
3. INCIDENCIA DE LA FIBROSIS QUISTICA	11
4. IDENTIFICACION DEL GEN DE LA FIBROSIS QUISTICA	12
5. ESTRUCTURA DEL GEN <i>CFTR</i>	12
6. ESPECTRO MUTACIONAL Y CLASES DE MUTACIONES	13
6.1. Espectro mutacional en el gen <i>CFTR</i>	13
6.2. Clases de mutaciones en el gen <i>CFTR</i>	15
7. CORRELACION GENOTIPO-FENOTIPO	15
7.1. La fibrosis quística clásica y genes modificadores.....	15
7.2. Fenotipos leves de fibrosis quística.....	17
8. DIAGNOSTICO MOLECULAR	18
8.1. Detección de portadores	19
8.2. Diagnóstico prenatal.....	19
9. TRATAMIENTOS CLASICOS DE LA FIBROSIS QUISTICA	19
9.1. Tratamiento de la afectación respiratoria	20
9.1.1. Tratamiento de la obstrucción bronquial.....	20
9.1.2. Tratamiento de la infección pulmonar	21
9.1.3. Tratamiento de la inflamación	21
9.1.4. Trasplante pulmonar	23
9.2. Tratamiento de la afectación digestiva	24
9.3. Tratamiento de la infertilidad y embarazo	25
9.4. Tratamiento nutricional y dietético.....	26
10. NUEVAS ESTRATEGIAS TERAPEUTICAS	27

Índice

10.1. Terapias farmacológicas dirigidas a la proteína CFTR.....	27
10.1.1. Plegamiento y conductancia de la proteína CFTR.....	27
10.1.1.1. Plegamiento de la proteína CFTR	27
10.1.1.2. Conductancia del canal CFTR.....	29
10.1.2. Antibioterapia y proteína CFTR.....	31
10.2. Trasplante de células madre	32
10.3. Vacunas anti-Pseudomonas aeruginosa	34
10.4. Terapia génica: estrategias de adición o reemplazo	35
10.4.1. Terapia génica no viral.....	35
10.4.2. Terapia génica viral.....	36
10.4.3. Terapia génica <i>in utero</i> en modelos animales.....	38
10.4.4. Ensayos clínicos de terapia génica para la fibrosis quística	42
10.4.4.1. Ensayos clínicos: vectores virales	42
10.4.4.2. Ensayos clínicos: vectores no virales	45
10.5. Terapia génica: estrategias de reparación génica dirigida	46
10.5.1. Reparación génica a nivel de DNA	46
10.5.1.1. Quimeroplastia	46
10.5.1.1.1. Quimeroplastia en células bacterianas y eucariotas.....	48
10.5.1.1.2. Quimeroplastia en plantas	54
10.5.1.2. Small Fragment Homologous Replacement (SFHR).....	57
10.5.1.3. Oligonucleótidos	61
10.5.1.4. Triplex Forming Oligonucleotides (TFO).....	65
10.5.1.5. Virus adenoasociados (AAV).....	68
10.5.1.6. Recombinación homóloga	70
10.5.2. Reparación génica a nivel de RNA	72
10.5.2.1. Spliceosome-mediated RNA trans-splicing (SMaRT).....	72
10.5.2.2. Oligonucleótidos antisentido y “splicing”.....	75
10.5.2.3. Ribozimas	77
OBJETIVOS	83
METODOLOGIA.....	87

Indice

11. GENERACION DE LAS MOLECULAS CORRECTORAS.....	87
11.1. Síntesis y purificación de los quimeroplastos.....	87
11.2. Generación y extracción de fragmentos SFHR.....	88
12. EXTRACCION DE DNA DE PELLET CELULAR (SIN FENOL:CLOROFORMO).....	89
13. PCR-OLA.....	90
14. ENSAYO <i>IN VITRO</i> PARA EVALUAR LA COMPETENCIA REPARADORA DE LAS CELULAS IB3.1 Y OTRAS LINEAS CELULARES	93
RESULTADOS	99
DISCUSION.....	105
15. VENTAJAS DE LA CORRECCION GENICA <i>VERSUS</i> LA TERAPIA GENICA DE REEMPLAZO.....	105
16. ELECCION DEL MODELO CELULAR Y MODIFICACIONES EN VECTORES DE TRANSFECCION, OLIGONUCLEOTIDOS CORRECTORES Y SFHR.....	106
17. ENSAYOS PARA VALIDAR Y CUANTIFICAR LA CORRECCION GENICA	114
17.1. Ensayos en <i>E. coli</i>	114
17.2. Ensayos en <i>S. cerevisiae</i>	115
17.3. Ensayos en células de mamífero	116
17.4. Ensayos en animales	118
18. COMPARACION DE LAS TECNICAS DE CORRECCION GENICA (QUIMERAPLASTIA VS OLIGONUCLEOTIDOS VS SFHR)	118
18.1. Quimeroplastia vs oligonucleótidos	118
18.2. Quimeroplastia y oligonucleótidos vs SFHR	120
19. INCONSISTENCIAS EN LOS ESTUDIOS DE CORRECCION GENICA.....	122
20. ¿COMO SE EXPLICAN LAS DIFERENTES FRECUENCIAS DE CORRECCION GENICA OBTENIDAS?.....	128
21. IMPORTANCIA DEL SISTEMA DE REPARACION MMR Y DEL CICLO CELULAR	132
22. PAPEL DE LA FAMILIA DE PROTEINAS RAD EN LA CORRECCION GENICA... 	133
CONCLUSIONES.....	139
BIBLIOGRAFIA.....	143

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCION

La fibrosis quística (FQ) es la enfermedad hereditaria autosómica recesiva grave más frecuente en la población Caucasoide, con una incidencia de aproximadamente 1 de cada 2500 nacimientos, lo que indica una frecuencia de portadores de 1 en 25. Esta enfermedad que se caracteriza por presentar una patología respiratoria obstructiva con sobreinfección crónica y recurrente por distintos patógenos, insuficiencia pancreática, problemas nutricionales, infertilidad en los varones y niveles elevados de iones cloruro y sodio en el sudor, es la causa más frecuente de enfermedad pulmonar crónica en la infancia. El diagnóstico de la FQ se basa en la detección de niveles elevados de cloruro en el sudor (test del sudor), y en la detección de mutaciones en el gen *CFTR* (siglas de "Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator"). El gen *CFTR* responsable de la fibrosis quística se aisló en 1989 (JR Riordan, 1989) por clonaje posicional, se localizó en el cromosoma 7 (7q31) y contiene 27 exones que cubren una región de 250 kilobases (kb) que codifica para un RNA mensajero (mRNA) de 6.5kb. La proteína CFTR está formada por 1480 aminoácidos, tiene un peso molecular de 168 kiloDaltons (kDa) y pertenece a la familia de proteínas de transporte dependientes de ATP (adenosina trifosfato). La proteína CFTR es un canal de cloruro regulado por AMP cíclico (cAMP) mediante fosforilación de su dominio regulador (SH Cheng, 1991), (MP Anderson, 1991a), (MP Anderson, 1991b). Además, contiene dos dominios transmembrana y dos dominios de unión a ATP. Las células epiteliales de los pacientes con FQ tienen alterado este transporte de cloruro.

La principal mutación en el gen *CFTR* es la deleción de la fenilalanina en posición 508 (F508del), que se ha detectado en cerca del 70% de los cromosomas FQ de la población mundial (The Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium, 1990). Se han identificado más de 1300 mutaciones que causan FQ (ver "Cystic Fibrosis Mutation Database" en la página web: www.genet.sickkids.on.ca/cftr) aunque la mayoría se detectan en poblaciones determinadas.

La caracterización de las mutaciones en el gen *CFTR* permite el diagnóstico molecular de la enfermedad, la detección de portadores y el diagnóstico prenatal.

La elevada heterogeneidad molecular de la fibrosis quística queda reflejada en el amplio espectro fenotípico de la enfermedad. El efecto de las distintas mutaciones sobre la función de la proteína y el nivel de expresión de CFTR en cada tejido contribuyen a la variabilidad clínica que se observa en los pacientes con FQ.

La evolución clínica del paciente con FQ guarda una relación directa con el diagnóstico y tratamiento tempranos. Esta idea ha favorecido la implantación de programas de detección precoz de FQ en varios países. Por lo general, los protocolos de cribaje incluyen las pruebas bioquímicas (determinación de tripsina inmunoreactiva) y moleculares (análisis del gen

CFTR) con lo que se consigue optimizar la especificidad y la sensibilidad. Los avances en el tratamiento se han traducido en una mejora de la calidad y esperanza de vida de los pacientes que en los países desarrollados llegan a la edad adulta (E Kerem, 1992). JS. Elborn y colaboradores han cifrado la esperanza de vida de un niño con FQ nacido en los años 90 en 40 años (JS Elborn, 1991). Los principales factores que han contribuido a la supervivencia de los pacientes en los últimos años son el tratamiento antibiótico, la fisioterapia respiratoria, el trasplante pulmonar y la organización de la atención médica en centros especializados.

1. DESCRIPCION HISTORICA DE LA FIBROSIS QUISTICA

“El conocimiento de la historia de una enfermedad indica el camino para reducirla o erradicarla” Marvin J Allison.

Es difícil establecer el punto inicial de la historia clínica de la fibrosis quística ya que al tratarse de una enfermedad genética es posible que haya estado siempre presente desde que el hombre existe. X. Estivill y colaboradores estiman que la FQ pudo aparecer hace unos 52000 años (N Morral, 1994). Sin embargo, la primera referencia clínica de la FQ aparece en el folclore del Norte de Europa que relacionaba el sudor salado del bebé con su muerte prematura. La excesiva cantidad de sal en el sudor se identificaba con una alteración que solía conducir a la muerte del niño. La conocida relación de lo salado con la FQ se recoge en un manuscrito del siglo XV alemán, “pobre niño aquél que al besarle su frente sabe a sal, un embrujo pesa sobre él y no tardará en morir”. Esta sentencia decía que los niños con sabor salado estaban embrujados y que no vivirían ni siquiera un año. Existen referencias posteriores al sabor salado y al encantamiento de los niños en la literatura del siglo XVII como la de Juan Alonso y de los Ruyzes de Fontecha (1606), profesor de Medicina de la Universidad de Alcalá, en su libro “Diez privilegios para mujeres preñadas”, “...que conoce a la gente embrujada, si al rascarles en la frente, uno después nota un sabor salado en los dedos”. La primera descripción histopatológica de la FQ se debe a Pieter Paaw (Leiden-Holanda) quien en 1595 realizó la autopsia a una niña de 11 años que se suponía estaba hechizada y concluyó que la causa de la muerte fue el páncreas. Una de las primeras historias clínicas es la realizada por Georg Seger en 1673 (Polonia) a una niña de 3 años cuya autopsia reveló un páncreas endurecido y cirroso tras haber observado síntomas de fiebre, vómitos, diarrea, dificultades para ganar peso e inanición prolongada. En 1677, Gerardus Blasius (Holanda) comunica la observación de un páncreas cirroso en un niño fallecido a los nueve años. En el siglo XVIII el pediatra sueco Nils Rosen von Rosenstein (1706-1773, Uppsala) describe una enfermedad que debía ser FQ pero que él denominó “fluxus coeliacus” que cursaba con diarrea, distrofia, debilidad y páncreas

endurecido. En 1838, el vienés Carl von Rokitansky (Austria), tras una autopsia fetal descubrió lo que debía ser un íleo meconial (obstrucción intestinal total o parcial de la luz del tracto gastrointestinal). Alois Bednar también en Viena describe en 1850 un caso similar en un recién nacido vivo que murió al sexto día de vida. Más o menos coincidentes en el tiempo se publican cuadros semejantes en Inglaterra y en Austria. Guido Fanconi (Suiza) en 1936 relacionó la afectación pancreática y bronquiectasias como elementos característicos de la FQ (Fanconi G, 1936) pero el término fibrosis quística (del páncreas) no aparece hasta 1938 cuando la patóloga Dorothy H. Anderson (Universidad de Columbia) en autopsias de lactantes y niños da una descripción comprensible de síntomas FQ y daño en órganos que siempre incluían la destrucción del páncreas y lesión e infección en el pulmón (Anderson D, 1938). En 1943, Farber se refiere a los sistemas ductales de los órganos afectados de FQ que generalmente acaban siendo ocluidos por secreciones inusualmente espesas y con alta probabilidad de ser colonizables, especialmente la vía aérea y el páncreas, dando lugar a infecciones recurrentes, destrucción tisular y fracaso respiratorio. Farber fue el primero en afirmar que esta enfermedad era generalizada y afectaba a las glándulas secretoras de moco y sugirió la denominación de "mucoviscidosis" (Farber D, 1944). En 1946, Anderson y Hodges deducen la naturaleza genética de la FQ (Anderson DH y Hodges RG, 1946). Tras una ola de calor en Nueva York en 1953, Paul A. Di Sant'Agnese (Universidad de Columbia) observó la excesiva pérdida de sal en el sudor en los pacientes con FQ (PA Di Sant'Agnese, 1953). Esta observación clínica sirvió para desarrollar un test clásico en el diagnóstico de la FQ, la medición del contenido de cloruro en el sudor (LE Gibson y RE Cooke, 1959).

El patrón de herencia autosómico recesivo de la FQ fue indicado por FH. Allen en 1956 (FH Allen, Jr., 1956) y confirmado por PM. Conneally en 1973 (PM Conneally, 1973).

En la década de los 80 los científicos descubrieron que el mal funcionamiento de los tejidos epiteliales era un defecto común a todos los órganos afectados por la FQ. En particular se reveló que los epitelios de los pacientes eran impermeables al ión cloruro (M Knowles, 1981), (PM Quinton, 1983). PM. Quinton (Universidad de California) explica en 1983 el porqué del sudor salado en los pacientes con FQ. La incapacidad del tejido epitelial de absorber cloruro y la consiguiente imposibilidad de absorción del sodio desde la luz del conducto causa la excesiva retención de estos iones en el sudor y lo convierte en anormalmente salado (PM Quinton y J Bijman, 1983). En 1985 se localizó el gen en el cromosoma 7 (LC Tsui, 1985) y a finales de esta misma década quedó patente que la FQ se debía al mal funcionamiento de un canal de cloruro dependiente de cAMP, hecho que se confirmó con la identificación del gen *CFTR* en 1989 mediante clonaje posicional por parte de Lap-Chee Tsui y John Riordan (Toronto) junto con Francis S Collins (Michigan) y colaboradores (JR Riordan, 1989), (JM Rommens, 1989), (B Kerem, 1989).

En 1991, se demostró que la proteína CFTR forma un canal de cloruro (MP Anderson, 1991b) y que éste necesita la hidrólisis de ATP para abrirse (MP Anderson, 1991a). Desde la identificación del gen *CFTR*, se han abierto nuevas vías de investigación que incluyen la obtención de ratones transgénicos en 1992 (JN Snouwaert, 1992), (LL Clarke, 1992), (R Ratcliff, 1992), (JR Dorin, 1992), y 1993 (R Ratcliff, 1993), y 1995 (P Hasty, 1995) estudios mutacionales y análisis funcionales de la proteína CFTR en células epiteliales. Cabe destacar que los distintos modelos de FQ murinos tienen patología intestinal pero no desarrollan alteraciones respiratorias. Sin embargo, existen dos cepas de ratones que sí presentan patología respiratoria. En 1997, G. Kent y colaboradores describieron el fenotipo de una cepa de ratones “knock-out” congénicos por retrocruzamiento que desarrollan patología pulmonar espontánea y progresiva de aparición temprana (G Kent, 1997) con características de fibrosis e inflamación y problemas en el transporte mucociliar. Muy recientemente, se ha generado un ratón que sobreexpresa específicamente el canal de sodio ENaC en el epitelio respiratorio para demostrar que el transporte de sodio *per se* puede causar patología pulmonar muy semejante a la fibrosis quística (M Mall, 2004). El incremento en la absorción de sodio en estos ratones conllevó un aumento de la concentración de moco y una disminución del volumen del líquido de la superficie de las vías respiratorias. El transporte defectuoso de moco causó una patología pulmonar severa y espontánea comparable a la FQ, con inflamación por neutrófilos, obstrucción por moco y poca eliminación bacteriana por lo que estos ratones constituyen un mejor modelo para el estudio de la afectación pulmonar en la FQ.

La afectación pancreática en los ratones transgénicos CFTR también es limitada por lo que es necesario el desarrollo y obtención de nuevos modelos animales que reproduzcan la patología respiratoria y pancreática observada en los pacientes, como son la oveja y el hurón (A Harris, 1997), (Z Li y JF Engelhardt, 2003).

2. ASPECTOS CLINICOS DE LA FIBROSIS QUISTICA

2.1. Patología respiratoria

La principal alteración en la fibrosis quística es la obstrucción de las vías respiratorias por acumulación anormal de moco que es colonizado por bacterias oportunistas. Los pulmones de los recién nacidos con FQ son histológicamente normales. Antes del primer año de vida ya se observa la presencia de bacterias que son los microorganismos que juegan un papel más importante en la progresión de la enfermedad pulmonar. Una característica de los pacientes con FQ es una infección bacteriana oportunista por *Haemophilus influenzae* y/o *Staphylococcus aureus* y que rápidamente adquiere un carácter crónico por la aparición de *Pseudomonas aeruginosa*, muy difícil de erradicar a pesar de los tratamientos antibióticos

agresivos. Una vez que el organismo ha adquirido la *Pseudomonas aeruginosa*, ésta rara vez es eliminada. No se conoce el modo de adquisición de esta bacteria pero ciertos autores indican la posibilidad de contagio entre pacientes (NM Kelly, 1982). Los pacientes padecen infecciones respiratorias de larga duración. La infección pulmonar por estas bacterias origina una importante respuesta inflamatoria con infiltración masiva de neutrófilos. El reclutamiento de estos neutrófilos en el lugar de la infección provoca la liberación de radicales libres y de enzimas proteolíticos como las proteasas. De entre estas últimas destaca la elastasa que digiere la elastina y otras proteínas estructurales conllevando el daño tisular pulmonar. Muy recientemente, se ha descrito un mecanismo hasta ahora desconocido mediante el cual los neutrófilos matan a las bacterias como *Staphylococcus aureus* en el lugar de la infección (V Brinkmann, 2004). Originan unas “trampas” compuestas de cromatina y proteínas llamadas NETs (*Neutrophil Extracellular Traps*) que se unen a bacterias Gram positivas y Gram negativas evitando su diseminación previamente a la liberación de proteínas antimicrobianas.

La oxidación de las antiproteasas por los radicales libres disminuye su acción inhibitoria sobre la elastasa y por consiguiente se produce una mayor destrucción del pulmón (RK Brown y FJ Kelly, 1994). Además, la descomposición de los neutrófilos libera DNA y actina en el lugar de la infección lo que incrementa la viscosidad del moco, hecho que contribuye a dificultar su expulsión.

Otros microorganismos pueden colonizar las vías respiratorias de estos pacientes como los hongos y las micobacterias. Un 50% de los pacientes con FQ tienen hongos en su esputo y los que se encuentran con mayor frecuencia son *Candida albicans* y *Aspergillus fumigatus*. Este último es responsable de patologías respiratorias que suelen acompañar a los pacientes con FQ como son la aspergilosis broncopulmonar alérgica y el asma fúngica. A pesar de la alta incidencia de aislamientos de *C. albicans* en el esputo de los pacientes con FQ, no se conoce el papel patogénico de esta levadura en la afectación pulmonar. La candidiasis pulmonar invasiva es muy rara en la FQ.

Las micobacterias no tuberculosas (MNTs) aparecen en algunos pacientes. La forma más habitual de presentación de la infección pulmonar por MNTs se asemeja a la tuberculosis pulmonar producida por el *Mycobacterium tuberculosis*. La infección micobacteriana de los pulmones suele cursar con tos productiva, hemoptisis y malestar general.

Todas las infecciones crónicas que se presentan en la FQ son de difícil erradicación por lo que los pacientes acaban desarrollando un cuadro de bronquitis crónica. La función respiratoria está disminuida. Los pacientes con FQ padecen complicaciones respiratorias como neumonía, aspergilosis, hemoptisis, insuficiencia respiratoria y *cor pulmonale* (hipertrofia del ventrículo derecho del corazón debido a hipertensión pulmonar). La patología

respiratoria es la causa de muerte en un 90% de los pacientes que presenta un cuadro de enfermedad respiratoria terminal con hipertensión pulmonar y *cor pulmonale*.

2.2. Patología digestiva

Históricamente, la malabsorción y las lesiones pancreáticas fueron los primeros indicios conocidos de la FQ. Hasta que se descubrieron las anomalías de los electrolitos en el sudor, los síntomas gastrointestinales y la demostración de la insuficiencia pancreática junto con la afectación pulmonar constituían la base del diagnóstico de la FQ. La relevancia de la afectación pancreática queda patente por la primera descripción de Anderson quien la denominó "fibrosis quística del páncreas" (Anderson D, 1938). Entre el 10-15% de los recién nacidos con FQ presenta íleo meconial que es diagnóstico de la enfermedad (JM Littlewood, 1992). En la adolescencia, el íleo meconial se conoce como síndrome de obstrucción intestinal distal. En el tubo digestivo de los pacientes con FQ se puede apreciar una hiperplasia epitelial y acúmulo de moco en las criptas intestinales que es resultado de la digestión deteriorada de los alimentos por falta de enzimas pancreáticos. El 85% de pacientes con FQ presenta insuficiencia pancreática y la gran mayoría de ellos la desarrollan en el primer año de vida y un 5-10% en los primeros 10 años (DL Waters, 1990). El páncreas de pacientes con insuficiencia pancreática muestra obstrucción de los conductos secretores con formación de quistes y destrucción del tejido. En estudios *postmortem*, el páncreas de estos pacientes muestra unas alteraciones características que consisten en una atrofia acinar, fibrosis, reemplazamiento por grasa y obstrucción de los conductos proximales. Con la edad el páncreas aparece desorganizado con obstrucción total de los conductos y desaparición de los acini debido a la liberación de proteasas. El resultado final es que el tejido pancreático es reemplazado por grasa con una pérdida funcional pancreática cuya gravedad es progresiva. Parece ser que el defecto de la proteína CFTR en el conducto proximal del páncreas promovería la formación de tapones proteicos y contribuiría a la obstrucción ductal y a la insuficiencia pancreática progresiva. Algunos pacientes que no padecen insuficiencia pancreática en la infancia pueden sufrir pancreatitis más adelante. Finalmente, el 15% de los pacientes con FQ no desarrolla insuficiencia pancreática o ésta se presenta en edades más avanzadas (Welsh MJ, Ramsey BW, Accurso F, Cutting GR, 2001). Los resultados obtenidos de los análisis del gen *CFTR* en pacientes FQ permiten postular la contribución de cierto tipo de alelos a la insuficiencia pancreática como F508del, G542X, W1282X, G551D y otros que van asociados a la suficiencia pancreática como por ejemplo R117H, R334W y R347P, R1070Q (DN Sheppard, 1993), (JY Choi, 2001). Un índice de enfermedad de la afectación pancreática viene dado por la determinación de tripsina inmunoreactiva. En los primeros meses de vida, la obstrucción de los conductos del páncreas produce un reflujo de la tripsina en sangre (hipertripsinemia).

En lo que concierne la afectación hepática, la lesión del hígado se ha relacionado con la obstrucción por una secreción biliar espesa de los conductos biliares (cirrosis biliar). Aún no han sido aclaradas las razones por las cuales ciertos pacientes con FQ desarrollan enfermedad hepática y otros no aunque se conoce que existen factores de riesgo para el desarrollo de la misma. En la mayoría de pacientes la afectación hepática está ligada a la insuficiencia pancreática aunque se ha descrito afectación hepatobiliar en 3 pacientes con suficiencia pancreática (DL Waters, 1995). Un 2% aproximadamente de los pacientes FQ fallece como consecuencia de una hepatopatía.

2.3. Aparato reproductor, infertilidad y embarazo

La infertilidad debida a la malformación de estructuras derivadas de los conductos de Wolff afecta cerca del 98% de los varones con FQ (M Wilschanski, 1996). Los pacientes son infértiles por ausencia de espermatozoides (azoospermia) a causa de agenesia o atrofia de los conductos deferentes o del epidídimo. La primera comunicación de infertilidad masculina en FQ fue en 1968 (E Kaplan, 1968) cuando se describe la ausencia bilateral de los conductos deferentes y el desarrollo incompleto del epidídimo en un hombre de 31 años; además de anomalías en la espermatogénesis (CR Denning, 1968). En un estudio de 1995 sobre la ausencia bilateral congénita de los conductos deferentes (CBAVD) como causa más frecuente de esterilidad masculina se observó que algunos de los pacientes eran portadores de mutaciones en el gen *CFTR* (B Mercier, 1995). En algunos pacientes con formas moderadas de la enfermedad la agenesia congénita de conductos deferentes constituye la manifestación clínica principal. Sin embargo, un grupo de mutaciones en el gen *CFTR* que se encuentran en pacientes CBAVD no están presentes en pacientes FQ. Por ejemplo, la mutación R117H suele ir acompañada del alelo 5T en el intrón 8 provocando el “skipping” del exón 9 (pérdida del exón 9) del gen *CFTR* en pacientes FQ mientras que los pacientes CBAVD tienen el alelo 7T (CS Chu, 1993), (S Kiesewetter, 1993). La atrofia o ausencia de los conductos deferentes representa el 2% de todos los casos de infertilidad masculina y puede ocurrir en ausencia de FQ (P Patrizio, 1993), (W Lissens, 1996). De todas maneras, la diferencia en el *estatus* de fertilidad se explica por variantes genéticas en el intrón 8 del gen *CFTR* (H Cuppens, 1998).

En el caso de las mujeres con FQ no se observan anomalías en el tracto reproductivo pero su fertilidad es muy reducida por anovulación (ausencia de ovulación) asociada a problemas respiratorios y nutricionales. Además, el moco cervical de estas mujeres es escaso y espeso por disminución del contenido en agua lo que dificulta la migración de los espermatozoides (LE Kopito, 1973), (RM Kotloff, 1992). Un estudio reciente realizado en ratones sugiere que la infertilidad no está causada únicamente por la incapacidad del espermatozoide de penetrar en el mucus cervical sino la imposibilidad de que el esperma prosiga la

capacitación. En este proceso de capacitación intervendría el bicarbonato secretado por el canal CFTR (XF Wang, 2003). A pesar de que no existen trabajos acerca del contenido en bicarbonato en el tracto genital femenino con FQ, es de esperar una disminución del bicarbonato por ausencia de canal CFTR en el oviducto y el útero de estas mujeres. Esta hipótesis queda reforzada por el hecho de que dos mujeres con FQ no quedaron embarazadas incluso después de 4 ciclos de inseminación artificial intrauterina (proceso que evita los problemas asociados al mucus cervical) pero sí después de fecundación *in vitro* (S Epelboin, 2001).

Una mujer con FQ que contemple la posibilidad de tener un hijo debe recibir información acerca de los riesgos que su embarazo le puede ocasionar a ella y al niño. Se ha estudiado el efecto del embarazo en mujeres con FQ al comparar la supervivencia durante 10 años de un grupo de mujeres con FQ que quedaron embarazadas y otro grupo sin embarazos (grupo control) (CH Goss, 2003). Las conclusiones del seguimiento fueron que el embarazo no implicó un aumento del riesgo de muerte y fue bien tolerado. De hecho, las mujeres que habían quedado embarazadas tuvieron unos índices de supervivencia superiores al grupo control.

Es necesario el asesoramiento genético para explicar a los padres que su hijo será portador del gen de la fibrosis quística o eventualmente aconsejar sobre las técnicas de reproducción asistida.

2.4. Patología nutricional

La malnutrición es una complicación frecuente en la evolución de los niños con FQ. La malabsorción de nutrientes se debe a la deficiencia de enzimas pancreáticos que provoca la mala digestión de proteínas y grasas conllevando un déficit vitamínico, especialmente de A, D, E y K (Welsh MJ, Ramsey BW, Accurso F, Cutting GR, 2001) y (DC Wilson y PB Pencharz, 1998) y un retraso en el crecimiento y desarrollo. De hecho, los niños y niñas con FQ tienen un peso medio al nacer inferior al normal para ambos sexos. En estos pacientes se ha descrito un patrón anormal de ácidos grasos en sangre y en algunos tejidos por un déficit de ácidos grasos esenciales. Otra circunstancia que ocasiona pérdida de nutrientes es la presencia de diabetes *mellitus* por deficiencia de insulina que puede padecer el 5% de estos pacientes, lo que condiciona una glucosuria además de una deficiente utilización metabólica de los nutrientes. La sudoración aumentada de estos pacientes conlleva la pérdida de cloruro, oligoelementos y vitaminas. Por estos motivos son necesarios una monitorización y seguimiento del *estatus* nutricional y de los requerimientos dietéticos de los pacientes con FQ.

3. INCIDENCIA DE LA FIBROSIS QUISTICA

La FQ es la enfermedad genética recesiva grave más frecuente en la población de origen europeo con una incidencia de 1 en 2000-4000 nacimientos dependiendo de la región y/o etnia de origen (Welsh MJ, Ramsey BW, Accurso F, Cutting GR, 2001). Los datos disponibles proceden de estudios epidemiológicos y de programas de detección precoz; sin embargo en algunos países los movimientos demográficos de los últimos años dificultan una estimación real. Las incidencias más altas se encuentran en Europa Central (Suiza 1/2000, República Checa 1/2800, (M Hergersberg, 1997) y (Macek M Jr, 2001) y el Reino Unido (Irlanda 1/1460, Inglaterra 1/2500) (SM Cashman, 1995), (MJ Schwarz, 1995). En el sur de Europa, se estima una incidencia de 1 en 4000-5000 (Francia 1/4000, Italia 1/4700) (M Claustres, 2000), (A Bossi, 1999). En España, los datos sobre la incidencia de la FQ proceden del Programa de Detección Precoz en Cataluña desde 1999. La estimación de la incidencia es de 1/5532 (S Gartner, 2003). De los países europeos, Finlandia es el que presenta menor incidencia, 1/25000 (J Kere, 1994). La incidencia más elevada se da en Albania con 1/450 (F Festini, 2003) mientras que en Irán es de 1/39000 (E Kerem, 1995). En las poblaciones nativas de Africa, América y Asia existe poca documentación sobre la incidencia de la enfermedad, aunque se cree que es mucho menor, del orden de 1/10000-1/17000 (M Devoto, 1991), (IM Bowler, 1993).

Se ha propuesto que el mecanismo más probable para explicar la elevada incidencia de la enfermedad sea la combinación de un efecto fundador con una ventaja selectiva para los individuos portadores (RS Meindl, 1987), (LB Jorde y GM Lathrop, 1988). Esta ventaja selectiva estaría relacionada con una mayor resistencia frente a las bacterias que producen infecciones como el cólera o la tuberculosis (WE Regelman, 1991). Sin embargo, se han propuesto otras hipótesis como la deriva genética, una mayor fertilidad entre los portadores o un elevado índice de mutación en el gen *CFTR* (G Romeo, 1989). Por otra parte, se ha demostrado que la proteína Sta (una enterotoxina termoestable de *E. coli*) induce secreción de cloruro en las células con la proteína CFTR normal pero no en las células con CFTR anómala, sugiriendo una ventaja para los heterocigotos FQ frente a la diarrea producida por *E. coli* (AC Chao, 1994). Un estudio con células en cultivo demuestra que la proteína CFTR es utilizada como receptor por la bacteria *Salmonella typhi* para entrar en las células del epitelio intestinal y que la ausencia de CFTR limita su entrada (GB Pier, 1998). También se ha visto que los ratones heterocigotos para el gen *cfr* tienen una mayor resistencia al cólera, enfermedad producida por infecciones de *Vibrio cholerae* (SE Gabriel, 1994).

Todos estos estudios sugieren una ventaja selectiva del heterocigoto FQ frente a distintos tipos de diarreas. Ninguna de las teorías propuestas ha sido demostrada, por lo que todavía se desconoce la causa de la alta incidencia de FQ.

4. IDENTIFICACION DEL GEN DE LA FIBROSIS QUISTICA

El gen de la fibrosis quística fue uno de los primeros genes identificados como responsables de una enfermedad hereditaria. Los dos factores fundamentales en la identificación del gen de la FQ fueron su elevada prevalencia que facilitó la obtención de suficientes familias para estudios de ligamiento genético y el desarrollo de la metodología de clonaje posicional, basada en el análisis de marcadores polimórficos distribuidos por el genoma. La primera indicación de marcadores que mostraban ligamiento para la FQ se obtuvo en 1985 (LC Tsui, 1985). Tras la identificación de los primeros marcadores del cromosoma 7 que presentaban ligamiento genético para la FQ se determinó su posición en la región 7q31 (BJ Wainwright, 1985). Acotada esta región del cromosoma 7, en 1989 se consiguió identificar el gen *CFTR* (JR Riordan, 1989), (JM Rommens, 1989) y la mutación F508del responsable mayoritaria de la enfermedad (B Kerem, 1989) (ver Figura 1).

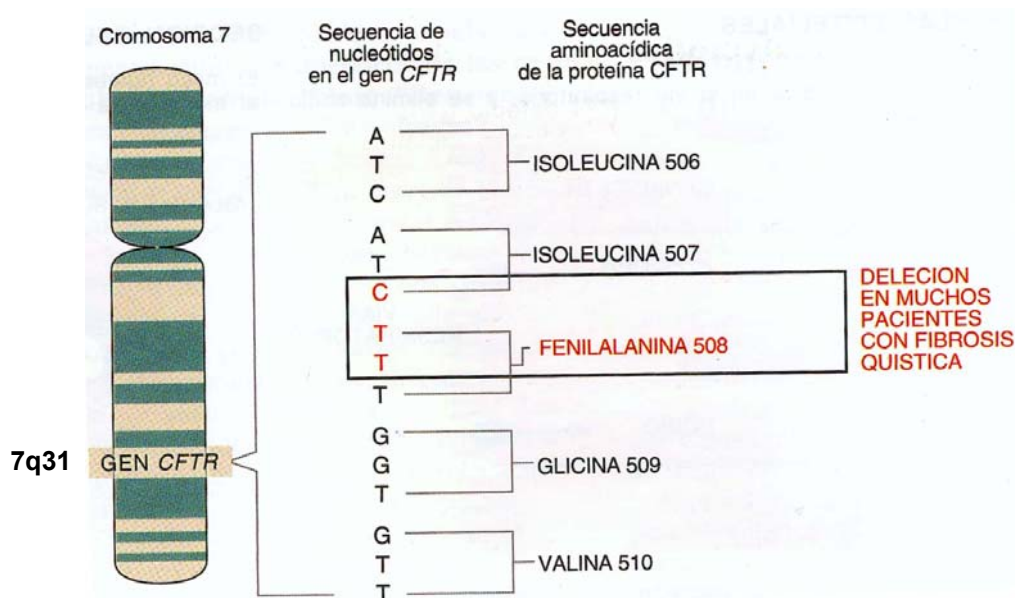


Figura 1. Localización del gen *CFTR* y mutación F508del
Esquema adaptado de "Investigación y Ciencia" (Febrero 1996)

5. ESTRUCTURA DEL GEN *CFTR*

El gen *CFTR* está localizado en la región cromosómica 7q31 y cubre una región genómica de 250kb organizada en 27 exones (J Zielenski, 1991b). El cDNA de *CFTR* da lugar a un transcrito de 6.5kb que se traduce en la proteína CFTR de 1480 aminoácidos con un peso molecular de 168kDa (JR Riordan, 1989). La región promotora de *CFTR* se ha determinado entre las posiciones -228 y +48 (JL Chou, 1991). Algunos intrones contienen secuencias polimórficas (microsatélites) que son de utilidad por su elevada capacidad informativa en los

estudios de ligamiento, los más empleados son IVS8CA en el intrón 8 y IVS17bTA y IVS17bCA en el intrón 17b (J Zielenski, 1991b), (N Morral, 1991).

La proteína CFTR es un canal de iones cloruro regulado por AMP cíclico el cual activa la proteína quinasa A (PKA) que a su vez fosforila el dominio regulador (R) y produce la apertura del canal (SH Cheng, 1991). Por su estructura, esta proteína se incluye en la familia de transportadores “ATP-binding cassette (ABC transporters)” (SC Hyde, 1990). La proteína CFTR tiene dos dominios que atraviesan la membrana celular (MSD1 y MSD2) seis veces cada uno, una región citoplasmática con dos dominios de unión a ATP (NBD1 y NBD2) y un dominio regulador (R) que contiene varios lugares de fosforilación para PKA. Los extremos amino- y carboxiterminal son también intracelulares (ver Figura 2)

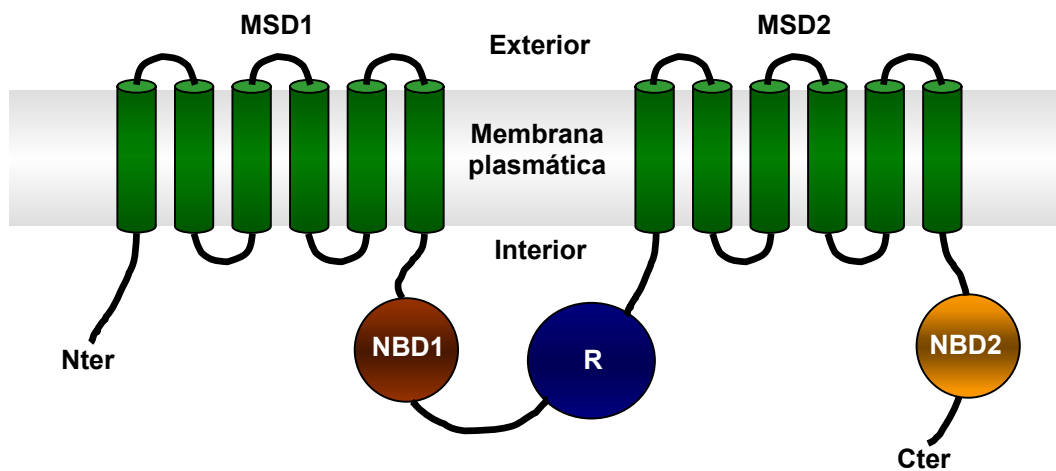


Figura 2. Estructura de la proteína CFTR

Leyenda: Nter: dominio aminoterminal, R: dominio regulador, NBD1 y NBD2: dominios de unión a ATP, Cter: dominio carboxi terminal, MSD1 y MSD2: 12 dominios transmembrana (“Membrane Spanning Domain”)

6. ESPECTRO MUTACIONAL Y CLASES DE MUTACIONES

6.1. Espectro mutacional en el gen *CFTR*

Desde la identificación del gen *CFTR* se han descrito más de 1300 mutaciones (www.genet.sickkids.on.ca/cftr). La principal mutación en el gen *CFTR* es la delección del triplete CTT que determina la pérdida del aminoácido fenilalanina (B Kerem, 1989), (E Kerem, 1990) en el codón 508. Esta mutación denominada F508del impide la localización de la proteína CFTR en la membrana celular (SH Cheng, 1990), quedando retenida en el retículo endoplásmico celular. En Europa se han descrito frecuencias de la mutación F508del que oscilan entre 30% hasta 90% de los cromosomas FQ (The Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium, 1990). En el norte de Europa se encuentran frecuencias entre 70% y 88% mientras que en la región mediterránea las frecuencias varían entre 30% y 60%.

Los datos de la mutación F508del indican una gran heterogeneidad alélica principalmente en el sur de Europa.

Se han analizado varios miles de cromosomas FQ para caracterizar las mutaciones y determinar su frecuencia y distribución. Además de la F508del, únicamente cuatro mutaciones G542X, G551D, W1282X y N1303K tienen una frecuencia superior al 1% (1,2-2,4%) en la población mundial y se encuentran prácticamente en todas las poblaciones (The Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium, 1994). Otras mutaciones tienen una frecuencia relativamente alta en poblaciones determinadas. Sin embargo, la mayoría de las mutaciones son raras o están restringidas a una región geográfica concreta (The Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium, 1994). El nivel de heterogeneidad molecular en el gen *CFTR* varía en función de la región geográfica y/o grupo étnico de origen. Por ejemplo, en la región mediterránea se han identificado más de 200 mutaciones (X Estivill, 1997), de las cuales unas 170 se han detectado en la población española. En la población judía Ashkenazi, 5 mutaciones identifican el 97% de los cromosomas (D Abeliovich, 1992).

Las mutaciones en el gen *CFTR* son mayoritariamente cambios puntuales que afectan a uno o pocos nucleótidos aunque también se han detectado deleciones que causan la pérdida de la mayor parte del gen *CFTR*. Las distintas mutaciones se denominan siguiendo el criterio consensuado (SE Antonarakis, 1998) y se distribuyen de la siguiente manera:

- cambio de aminoácido (“missense”): el cambio de nucleótido determina la sustitución de un aminoácido. Este tipo de mutaciones representa un 45% de todas las mutaciones.
- cambio de pauta de lectura (“frameshift”): la inserción o deleción de un nucleótido produce una alteración en la pauta de lectura. Este tipo de mutaciones representa un 20% de todas las mutaciones.
- modificaciones en el corte y empalme del gen *CFTR* (“splicing”): se ha detectado “splicing” alternativo implicando la pérdida de los exones 9 y 12 (CS Chu, 1993), (R Slomski, 1992). Este tipo de mutaciones representa un 16% de todas las mutaciones.
- mutaciones sin sentido (“nonsense”): la mutación origina un codón de terminación. Este tipo de mutaciones representa un 14% de todas las mutaciones.
- inserción o deleción de varios aminoácidos o parte del gen *CFTR*. Este tipo de mutaciones representa un 5% de todas las mutaciones.

Debido a la frecuencia y distribución de las mutaciones F508del, G542X y N1303K se cree que estas tres mutaciones fueron las primeras en originarse y expandirse. Los haplotipos con tres microsatélites intragénicos, IVS8CA, IVS17bTA y IVS17bCA datan el origen de las mutaciones en unos 35000 años (N Morral, 1993). Morral y colaboradores han datado la mutación F508del en 52000 años (N Morral, 1994).

6.2. Clases de mutaciones en el gen *CFTR*

Se han descrito 5 clases de mutaciones que explican los distintos mecanismos moleculares que producen la disfunción del canal *CFTR* (MJ Welsh y AE Smith, 1993) y se clasifican como se detalla a continuación:

- clase I: incluye aquellas mutaciones que dan lugar a ausencia de proteína debido a mutaciones “nonsense”, “frameshift” o de “splicing”. La mayoría de las mutaciones en el gen *CFTR* (52%) pertenece a esta clase.
- clase II: son cambios que impiden que la proteína llegue a la membrana celular. Este es el caso de la mutación F508del que implica la retención de la proteína *CFTR* en el retículo endoplásmico.
- clase III: estas mutaciones alteran la regulación del canal *CFTR*. Es el caso de las mutaciones “missense” que afectan a la unión a ATP.
- clase IV: estas mutaciones causan una conducción anómala del flujo de iones cloruro. Estas mutaciones son del tipo “missense” y están localizadas en los dominios transmembrana.
- clase V: incluye aquellas mutaciones que causan una disminución de la síntesis de la proteína *CFTR*.

Mientras que las mutaciones de clase I y II se asocian a FQ con insuficiencia pancreática (IP), las mutaciones de clase III y IV y V están asociadas a una amplia variabilidad clínica.

7. CORRELACION GENOTIPO-FENOTIPO

El diagnóstico de la FQ se realiza en los primeros meses/años de vida y se ha constatado una gran variedad de manifestaciones clínicas que definen la gravedad y la evolución de la enfermedad. La mayoría de los pacientes (85%) presentan insuficiencia pancreática (IP) y precisan el tratamiento con enzimas pancreáticas, sin embargo un 15% de los pacientes tiene la función pancreática conservada (M Corey, 1989). Para la enfermedad pulmonar también se han observado grandes diferencias en el inicio y evolución clínica (CFconsortium, 1993) que se atribuyen en parte a las distintas mutaciones en el gen *CFTR*. El estudio molecular de las mutaciones en un paciente junto con la evaluación de las manifestaciones clínicas que presenta permiten establecer la correlación entre el genotipo y el fenotipo. La mayor dificultad para desarrollar los estudios de correlación radica en reunir un número suficiente de pacientes con una mutación en común y evaluarlos bajo los mismos criterios clínicos que permitan definir el fenotipo asociado a dicha mutación.

7.1. La fibrosis quística clásica y genes modificadores

El genotipo *CFTR* más frecuente en los pacientes con FQ es la homocigosis para la mutación F508del (The CF Consortium, 1994). Este genotipo se asocia a un cuadro clínico

grave de FQ, con inicio temprano de las manifestaciones clínicas características, enfermedad pulmonar crónica, insuficiencia pancreática y niveles altos de electrolitos en el sudor (E Kerem, 1990). Los estudios de otras mutaciones distintas a la F508del como N1303K, G551D y R1066C entre otras indican que un genotipo con dos mutaciones graves determina un fenotipo grave (L Osborne, 1992), (A Hamosh, 1992), (T Casals, 1997) similar al de los homocigotos para la mutación F508del.

Las mutaciones “missense” constituyen el grupo más numeroso de alteraciones en el gen *CFTR*. Los cambios de aminoácido proporcionan una información interesante sobre la función de los distintos dominios de la proteína CFTR y sobre la variabilidad genética de la enfermedad. Los estudios de correlación revelan que la gravedad de las mutaciones depende de su posición en la proteína y de la sustitución de aminoácido que produce. Un caso interesante es la mutación R334W para la que el análisis de un amplio número de pacientes ha permitido definir claramente su asociación a IP de inicio tardío con gran variabilidad inter e intrafamiliar (X Estivill, 1995).

La mayoría de mutaciones que alteran el “splicing” del gen *CFTR* dan lugar a la ausencia de proteína CFTR o producen una proteína anómala. El fenotipo de los pacientes que tienen una mutación de “splice” en las secuencias consenso AG/GT y mutaciones F508del, “nonsense o frameshift” en el otro cromosoma es el de una FQ grave (P Kristidis, 1992). Los estudios de correlación han mostrado que existen ciertas discrepancias clínicas entre los pacientes con un mismo genotipo. Este hallazgo sugiere la acción de genes moduladores o la presencia de mutaciones adicionales en el gen *CFTR*, que modificarían la gravedad de la enfermedad. En la experimentación con modelos animales se han obtenido ratones transgénicos que presentan sintomatología de FQ. Las diferencias entre los ratones de una misma camada, algunos de los cuales presentaban una supervivencia superior a la esperada (R Rozmahel, 1996), permitió identificar una región subcentromérica del cromosoma 7 murino responsable del fenotipo con mayor supervivencia. Esta región es sinténica con la región 19q13 del cromosoma 19 humano y el análisis de secuencias homólogas condujo a la identificación de una región candidata en este cromosoma (19q13.2-q13.4). Aunque todavía no se ha obtenido un gen que regule al gen *CFTR*, el análisis de marcadores en esta región del cromosoma 19 en parejas de hermanos con presencia o ausencia de íleo meconial ha permitido definir una región menor a 3Mb que debería contener un gen modificador para esta patología (J Zielenski, 1999). RR. Parmley y colaboradores han encontrado que ratones FQ que carecen de la expresión del gen *muc1* (mucina1) no presentan la obstrucción intestinal característica de estos ratones (RR Parmley y SJ Gendler, 1998). Los autores han sugerido que este gen debe tener un papel importante en la obstrucción gastrointestinal debida al moco.

Se conoce que la patología pulmonar en la FQ se debe a mutaciones en el gen *CFTR* pero éstas no bastan para explicar la sorprendente variabilidad clínica de la enfermedad. Pacientes con genotipo FQ idéntico pueden tener funciones pulmonares distintas (E Kerem, 1990). Sin duda, el medio ambiente desempeña un papel en la variabilidad clínica pero también es probable la participación de otros genes modificadores del fenotipo de la FQ. Se ha descrito la posible implicación de genes moduladores en la FQ (CA Merlo y MP Boyle, 2003), (F Salvatore, 2002) como el $TNF\alpha$ (tumor necrosis factor), el receptor β 2-adrenérgico, glutatión-S-transferasa (J Hull y AH Thomson, 1998), el TGF- β (tumor growth factor) (PD Arkwright, 2000), α 1-antitripsina (DD Frangolias, 2003), y también moléculas como la lectina de unión a manosa (P Garred, 1999), β -defensinas 1 y 2 (ML Drumm, 2001). Polimorfismos en estos genes modifican presumiblemente la defensa innata del huésped y/o inflamación en la FQ. H. Grasemann y colaboradores han postulado que un mayor número de repeticiones polimórficas en el gen *NOS1* (óxido nítrico sintasa) estaría asociado a una mayor colonización por *Pseudomonas aeruginosa* (H Grasemann, 2000). Estudios posteriores del mismo grupo sugieren que variaciones polimórficas en el gen de la óxido nítrico sintasa endotelial tendría también influencia sobre esta colonización (H Grasemann, 2003). En una investigación muy reciente, J. Texereau y colaboradores han reportado que el declive de la función pulmonar en pacientes FQ guarda relación con una repetición polimórfica en el gen *NOS1* de nuevo. Así, los pacientes con el haplotipo de producción elevada de óxido nítrico tuvieron un menor declive de la función pulmonar durante el periodo de estudio de 5 años (J Texereau, 2004).

Recientemente, PD. Arkwright y colaboradores han descrito un polimorfismo en el gen *ACE* (convertasa de la angiotensina) que se asocia a la patología hepática en la FQ y que podría modificar el desarrollo de la afectación pulmonar (PD Arkwright, 2003).

La identificación de genes modificadores de la fibrosis quística conllevará a un mejor conocimiento de la patofisiología de la misma y quizás abrir la posibilidad de nuevas intervenciones terapéuticas.

7.2. Fenotipos leves de fibrosis quística

Los genotipos con al menos una mutación leve se asocian a manifestaciones clínicas claramente diferenciadas del fenotipo grave. Destacan un diagnóstico en edad avanzada, la concentración de electrolitos en el límite o en valores intermedios y un mejor estado nutricional. El diagnóstico de estos pacientes debe cumplir los criterios establecidos (BJ Rosenstein y GR Cutting, 1998) en el Consenso de la Cystic Fibrosis Foundation de 1998. Algunas mutaciones de "splicing" producen una cantidad reducida de mRNA normal junto con el mRNA mutado dando lugar a situaciones clínicas distintas que van desde un fenotipo FQ-IP a un fenotipo normal. Este es el caso por ejemplo de la mutación IVS8-6(5T), una

secuencia de 5 timinas comúnmente denominada alelo 5T, en la secuencia de polipirimidinas del intrón 8, que determina la pérdida del exón 9 en el mRNA de *CFTR* (CS Chu, 1993). Los pacientes homocigotos para el alelo 5T tienen el 90% de proteína no funcional (CS Chu, 1991). La mutación IVS8-6(5T) es el defecto molecular más frecuente en el gen *CFTR* de los pacientes con azoospermia obstructiva por agenesia de conductos deferentes (CAVC) (M Chillon, 1995) aunque también se ha identificado en otros fenotipos como el enfisema pulmonar (C Bombieri, 1998) o la pancreatitis (JA Cohn, 1998).

8. DIAGNOSTICO MOLECULAR

La estrategia para realizar un diagnóstico molecular se elabora en función de la heterogeneidad alélica de cada población. En general, esta estrategia se inicia con el análisis de las mutaciones más frecuentes (The CF consortium 1994). Si una o ambas mutaciones no se identifican es necesario realizar un rastreo del gen *CFTR*, mediante técnicas que permitan detectar cualquier cambio existente en la secuencia del DNA de la muestra. Las técnicas más comúnmente utilizadas en el análisis del gen *CFTR* son la electroforesis en geles de gradiente desnaturizante (DGGE) (B Costes, 1993) y el análisis de la conformación de la cadena sencilla (SCCA) (M Orita, 1989). Las dos técnicas han mostrado una alta sensibilidad (>98%) para la detección de fragmentos anómalos. La caracterización de una mutación se realiza mediante la secuenciación del fragmento de DNA. Cuando el análisis directo de mutaciones no es factible o resulta no concluyente, los marcadores polimórficos dentro o próximos al gen pueden aportar la información necesaria para el análisis de ligamiento. Los más útiles en la construcción del haplotipo (J Zielenski, 1991a), (N Morral, 1991) son los microsatélites IVS8CA, IVS17bTA y IVS17bCA. En las poblaciones con una alta heterogeneidad, el haplotipo con marcadores puede facilitar la identificación de la mutación.

El diagnóstico molecular está indicado en todos los pacientes con una sospecha clínica de la enfermedad, ya que permite la confirmación del diagnóstico y es extensible a los miembros de la familia que puedan requerir diagnóstico prenatal y detección de portadores. También es importante el diagnóstico molecular en las enfermedades asociadas a una alta frecuencia de mutaciones en el gen *CFTR*, este grupo incluye la infertilidad por agenesia de conductos deferentes (T Casals, 2000), las enfermedades respiratorias relacionadas con la FQ (aspergilosis broncopulmonar alérgica, bronquiectasias) (C Bombieri, 1998), (PW Miller, 1996) y la pancreatitis crónica de etiología desconocida (JA Cohn, 1998), (JA Cohn, 2002). En la población general los programas de detección precoz incluyen el diagnóstico molecular de las muestras con hipertripsinemia (E Ranieri, 1994).

8.1. Detección de portadores

La detección de portadores se aconseja a los individuos adultos con historia familiar de FQ la cual determina un riesgo superior al de la población general. La capacidad diagnóstica en la detección de portadores depende de la información genética disponible. Por consiguiente, siempre que sea factible, el paso previo es la caracterización molecular del paciente. Si ésta no es posible, se recomienda el análisis de las mutaciones frecuentes en el consultante, aunque el resultado negativo conduce a una estimación de riesgo y no descarta el *estatus* de portador (E Dequeker, 2000). No se aconseja la detección de portadores a nivel de la población general, ya que plantea varios problemas. En primer lugar, para ser efectivo debería garantizar un nivel de detección alto en un tiempo razonable, lo que es difícilmente asumible en poblaciones muy heterogéneas. Además hay que considerar los aspectos éticos, psicológicos y económicos que comporta. Sin embargo, es muy probable que los nuevos métodos moleculares basados en tecnología de chips de DNA permitan la detección del estado de portador para la FQ y otros procesos con un bajo coste y una elevada rapidez de determinación

8.2. Diagnóstico prenatal

La FQ es una enfermedad autosómica recesiva, por consiguiente, los padres de un paciente FQ son portadores obligados de la enfermedad y el riesgo de tener un hijo con FQ es del 25% en cada embarazo. El diagnóstico prenatal está indicado en las parejas con riesgo elevado de tener un hijo que presente la enfermedad. Esto incluye dos tipos de parejas, aquellas en que ambos son portadores de una mutación y por consiguiente, el riesgo del feto es de $\frac{1}{4}$ y un segundo grupo de menor riesgo, en las que un miembro de la pareja es portador y el otro pertenece a la población general (riesgo de portador, 1 en 25) en este caso el riesgo del feto es de $\frac{1}{100}$. En las parejas de menor riesgo que solicitan el diagnóstico prenatal, se aconseja complementar el diagnóstico molecular con la determinación de enzimas intestinales (peptidasas, glicosidasas y fosfatasas) en una muestra de líquido amniótico a las 17-18 semanas de gestación (NJ Carbarns, 1983). También está indicado el análisis del gen *CFTR* cuando en la ecografía de un feto sin historia de FQ se observa hiperrefringencia intestinal. Aunque este hallazgo no es específico, aproximadamente un 3% de los casos se deben a FQ (F Muller, 1998).

9. TRATAMIENTOS CLASICOS DE LA FIBROSIS QUISTICA

Los principales factores que han contribuido a la mejora de la calidad de vida y a la supervivencia de los pacientes con FQ son los tratamientos antibióticos, la fisioterapia respiratoria y la organización y centralización de la atención médica de estos pacientes en centros especiales. Es necesario un control periódico de los pacientes en centros

especializados en FQ con el fin de detectar y tratar precozmente la enfermedad previniendo así la progresión de la misma. De todas maneras, a pesar de conocer el mecanismo molecular que subyace en la FQ por el momento se carece de un tratamiento curativo.

9.1. Tratamiento de la afectación respiratoria

Una manera de controlar la infección respiratoria pasa por aconsejar al paciente que evite el contacto con portadores de la infección del tracto respiratorio. Cabe la posibilidad de infección cruzada entre pacientes colonizados por bacterias multiresistentes y pacientes no colonizados (K Cheng, 1996). Es recomendable tomar precauciones en las posibles relaciones sociales de los pacientes evitando toda estigmatización del paciente portador por los aspectos psicosociales que comporta. En la mayoría de unidades de FQ de los hospitales no se contemplan medidas especiales de aislamiento de los pacientes colonizados por *P.aeruginosa*.

9.1.1. Tratamiento de la obstrucción bronquial

Es necesario eliminar el moco de las vías respiratorias mediante fisioterapia respiratoria sobre la caja torácica. La fisioterapia respiratoria constituye una parte esencial en el tratamiento de los pacientes afectados de FQ ya que los ejercicios físicos respiratorios intervienen en la mejora de la calidad de vida de los pacientes. La fisioterapia debe iniciarse en el mismo momento del diagnóstico siendo fundamental en el pronóstico del paciente enfermo de FQ. Su finalidad es mantener abiertas las vías respiratorias pero sus objetivos son los siguientes: movilizar y drenar las secreciones para su mejor eliminación; despejar las vías bronquiales; prevenir las posibles infecciones respiratorias; mejorar la función respiratoria potenciando la capacidad muscular torácica; enseñar al paciente y a sus familiares los ejercicios físicos básicos para conseguir su propia autonomía y disminuir así su dependencia del centro hospitalario y por último y en definitiva mejorar la calidad de vida de los pacientes. La práctica de algún deporte adecuado a las capacidades físicas del paciente junto con la fisioterapia constituyen el mejor modo de aliviar la obstrucción pulmonar provocada por las espesas secreciones bronquiales. El ejercicio es importante en la vida del paciente con FQ ya que sin sustituir a la fisioterapia le ayudará a movilizar y evacuar secreciones y a mejorar su función respiratoria.

La fisioterapia debe ir acompañada de terapia de inhalación para desbloquear las vías respiratorias. Los broncodilatadores inhalados y mucolíticos constituyen los fármacos comunes para controlar la patología respiratoria. En 1990, científicos de la empresa Genentech desarrollaron la DNAsal recombinante humana y demostraron que reducía la viscosidad del esputo de pacientes con FQ (S Shak, 1990) y por lo tanto se podía utilizar en pacientes para fluidificar las secreciones respiratorias. En la década de los 90 se realizaron

protocolos clínicos con DNAsa que confirmaron la seguridad de este enzima además de mejorar la función pulmonar (ML Aitken, 1992), (RC Hubbard, 1992). En 1993, la FDA (Food and Drug Administration) aprobó la comercialización de DNAsa recombinante bajo el nombre de Pulmozyme. En 1994, se llevó a cabo un ensayo clínico de fase III en el que participaron 968 pacientes con FQ para investigar la eficacia y seguridad de un tratamiento a largo plazo (24 semanas) con DNAsa (HJ Fuchs, 1994). Algunos de los pacientes mostraron mejorías de la función pulmonar.

9.1.2. Tratamiento de la infección pulmonar

La antibioterapia es determinante en el pronóstico de la FQ. Es esencial la correcta identificación de todos los patógenos aislados en un esputo con el fin de administrar la combinación de antibióticos más eficaz.

Los antibióticos son esenciales para controlar y eliminar la colonización crónica bacteriana y fúngica de los patógenos más habituales (*S. aureus*, *P. aeruginosa*, y *A. fumigatus*). Se pueden administrar por vía intravenosa, inhalados o por vía oral (DJ Touw, 1995). Se suele empezar la antibioterapia con un tratamiento intensivo de antibióticos continuado por una terapia crónica de mantenimiento con la esperanza de evitar la progresión de la obstrucción pulmonar. La tercera etapa consta de tratamiento preventivo para evitar la colonización de las vías respiratorias inferiores por parte del patógeno más común, *Pseudomonas aeruginosa*.

El uso de antibióticos aerosolizados se documentó por primera vez en un protocolo clínico por ME. Hodson y colaboradores (ME Hodson, 1981) donde el objetivo fue tratar las infecciones de *P. aeruginosa*. Los resultados del protocolo demostraron una mejora en la función pulmonar de los pacientes tratados con respecto al grupo control que recibió placebo.

El único antibiótico aprobado por la FDA (en 1997) para un tratamiento de mantenimiento de la colonización bacteriana es la Tobramicina. Este aminoglicósido ha mostrado su efectividad en el control de la proliferación de *P.aeruginosa* además de no presentar efectos adversos como ototoxicidad o nefrotoxicidad. Los distintos protocolos clínicos de fase III han probado una mejora en la FEV₁ (volumen expiratorio en un segundo) de los pacientes tratados y una reducción de *P. aeruginosa* en el esputo (SM Cheer, 2003).

9.1.3. Tratamiento de la inflamación

La inflamación juega un papel igual de importante que la infección y la obstrucción bronquial por lo que es necesario tratarla. A diferencia del tratamiento antibiótico que sigue unas pautas y ciclos terapéuticos, no existen recomendaciones generales acerca de cuando y con qué empezar el tratamiento antiinflamatorio en los pacientes. Se han propuesto distintas

estrategias para limitar las consecuencias adversas de la respuesta inflamatoria del tracto respiratorio sin impedir la actuación del sistema inmunitario para controlar la infección. Se utilizan dos tipos de compuestos: los corticoesteroides o las sustancias no esteroideas y antiproteasas o antioxidantes. Los corticoesteroides están especialmente indicados en la aspergilosis broncopulmonar alérgica y el asma. El Ibuprofeno es el fármaco no esteroideo más utilizado en FQ dada su habilidad para inhibir la migración de los neutrófilos (MW Konstan, 1998). Sin embargo, se deben tener en cuenta los efectos secundarios de su administración a largo plazo (MW Konstan, 1995). A pesar de sus efectos beneficiosos en el retraso de la progresión de la enfermedad pulmonar, debido a su toxicidad se están buscando alternativas antiinflamatorias como el uso de citoquinas e interleucinas (MW Konstan y PB Davis, 2002).

Con el objetivo de prevenir la destrucción del tejido pulmonar por parte de las proteasas como la elastasa se ha propuesto la administración de antiproteasas, de las cuales la mejor estudiada es la alfa 1-antitripsina (P Birrer, 1995). En individuos sanos, el daño producido por la actividad de la proteasa es inhibido por las antiproteasas, pero en pacientes con FQ, las antiproteasas están menos representadas que las proteasas por lo que su efecto protector es inefectivo. La terapia con antiproteasas está siendo investigada a nivel clínico.

Para controlar el efecto de radicales libres, el organismo ha desarrollado un sistema de defensa antioxidante en el que la vitamina E tiene una importante relevancia. Debido a la afectación digestiva se produce una malabsorción de nutrientes que conlleva a un déficit vitamínico. Es por este motivo que se prescriben a los pacientes, alfa tocoferol (vitamina E) y ácido ascórbico (vitamina C) como suplementos nutricionales.

Un estudio muy reciente a cargo de M. Srivastava y colaboradores (M Srivastava, 2004) ha demostrado la potente capacidad antiinflamatoria de la digitoxina en las células IB3.1 de epitelio bronquial al disminuir considerablemente la expresión de interleuquina 8 (IL-8) a través de la inhibición del factor de transcripción $\text{NF-}\kappa\text{B}$ (Nuclear Factor kappa B). La IL-8 se encuentra sobreexpresada en el pulmón de pacientes con FQ. La digitoxina que ya se ha utilizado en humanos para enfermedades cardíacas, tuvo el mismo efecto en la expresión de genes que células transfectadas con un AAV-CFTR. El experimento de farmacogenómica que comparaba células IB3.1 tratadas con digitoxina y células transfectadas con un virus adenoasociado-CFTR reveló que de los 58 genes cuya expresión se veía afectada por la transfección, 36 genes fueron afectados de la misma manera por la digitoxina con lo que los autores concluyen que esta molécula mimetiza el efecto de la terapia génica con el gen *CFTR* y que deberían considerarse futuras aplicaciones terapéuticas para la fibrosis quística.

9.1.4. Trasplante pulmonar

El primer trasplante pulmonar se realizó en 1963 en EEUU. En España, los primeros trasplantes de corazón y pulmón comenzaron a efectuarse en el 1990 y en 1994 se describen los primeros trasplantes bilaterales de pulmón (J Astudillo Pombo, 1994). Sin embargo, los pacientes trasplantados pueden presentar complicaciones como la neumonía (MT Lazaro-Carrasco, 1999).

Los trasplantes de pulmón son técnicamente complejos además de presentar una alta morbi-mortalidad. Otro problema añadido es la escasez de donantes. De hecho, algunos pacientes mueren en lista de espera. El trasplante pulmonar es la última alternativa a tener en cuenta cuando el médico ha prescrito todos los tratamientos disponibles y el paciente los ha cumplido.

En Europa ya se han realizado con éxito trasplantes de corazón y pulmón (MR de Leval, 1991). El curso postoperatorio de los pacientes con FQ que han recibido un pulmón es semejante a los pacientes no FQ (JR Yankaskas y GB Mallory, Jr., 1998). Las complicaciones más comunes son el rechazo tanto agudo como crónico y las infecciones. La supervivencia de los pacientes trasplantados FQ es comparable a la de los no FQ, con un 80-90% de los pacientes que viven más de 1 año y 60-70% hasta 5 años (A Haloun y P Despains, 2003). La falta de donantes hace que en EEUU por ejemplo el tiempo medio de espera para un trasplante de pulmón sea de 2 años. En Cataluña, en diciembre 2003 habían 243 personas en lista de espera para un trasplante de pulmón y durante todo el año 2003 se realizaron 24 trasplantes en el Hospital Vall d'Hebrón, único hospital que los practica en Cataluña. Se sabe que un 10% de los pacientes muere en lista de espera que suele ser de 230 días en este hospital. Este hospital celebró en abril del 2004, 20 años de trasplantes y ha realizado más de 4500 trasplantes de los cuales 218 fueron de pulmón. La coordinación de los trasplantes ha hecho posible que Cataluña tenga el número de donantes por habitante más alto del mundo. Sin embargo, en un artículo publicado en el 2003 se constataron más de 1200 trasplantes de pulmón en pediatría en todo el mundo (SC Sweet, 2003). Una alternativa a la falta de órganos y a la creciente necesidad de donantes es el trasplante de lóbulos pulmonares de donantes vivos. Este procedimiento que se describió por primera vez en 1994 (RG Cohen, 1994) involucra a tres personas, dos de ellas son donantes del lóbulo derecho e izquierdo respectivamente y la tercera es la que será trasplantada. Un estudio estadounidense de 2002 que revisaba la supervivencia durante 10 años de 123 pacientes provenientes de trasplante bilateral o de lóbulos pulmonares de donantes vivos constató que el trasplante de lóbulos pulmonares tuvo menor supervivencia (38% hasta 5 años) mientras que los trasplantes bilaterales presentaban una supervivencia del 38% hasta 10 años (TM Egan, 2002). En un artículo reciente publicado casi 10 años después de que se describiera el trasplante de lóbulos pulmonares, ME. Bowdish y

colaboradores (ME Bowdish, 2003) concluyeron que este tipo de trasplante fue un procedimiento seguro y fisiológicamente tolerado por los donantes. A pesar de no haber habido ninguna muerte en la cohorte donante, los autores estimaron un riesgo de muerte del 0.5-1% para los donantes vivos.

Muy recientemente, cirujanos norteamericanos han apuntado a que la supervivencia de pacientes sometidos a trasplante de lóbulos pulmonares es del 45% hasta los 5 años post-trasplante y que esta supervivencia no varía tanto si los receptores son adultos como niños (VA Starnes, 2004).

El pulmón es un tejido que se regenera muy poco por lo que este tipo de trasplante es de alto riesgo para los donantes, de ahí que surjan problemas éticos pero sigue siendo la opción terapéutica para aquellos pacientes que sufren un deterioro pulmonar rápido y que no tienen la oportunidad de recibir un pulmón de donante muerto a tiempo.

9.2. Tratamiento de la afectación digestiva

El tratamiento de la insuficiencia pancreática en la FQ se basa en la administración oral de preparados que contengan enzimas pancreáticos y en aconsejar una dieta correcta. El momento de la administración de los enzimas pancreáticos es el inicio de la comida ya que se alteran menos las relaciones sociales, es más fácil acordarse y hay evidencias de mayor efectividad (MS Brady, 1992). Los objetivos del tratamiento con enzimas pancreáticos son los siguientes: controlar la sintomatología, normalizar las deposiciones y conseguir una nutrición adecuada. Los preparados comerciales que se utilizan provienen de dos tipos de sustancias: la pancreatina (Creon) y la pancreolipasa (Pancrease). Los pacientes con FQ presentan problemas en el metabolismo de la glucosa (A Moran, 1998). En aproximadamente 5% de los pacientes que presentan diabetes *mellitus* el tratamiento consiste en la administración de insulina, consejo nutricional y monitorización diaria de la glucosa.

Los enfermos de FQ tienen tendencia a padecer obstrucciones intestinales en cualquier etapa de su vida. El acúmulo en la luz intestinal de una mezcla viscosa de alimentos no digeridos, materia fecal y secreciones mucosas causan la obstrucción intestinal. Para evitar y prevenir estas complicaciones intestinales es esencial una dieta apropiada, rica en fibra y mucha hidratación además de la dosis de enzimas pancreáticos. En los recién nacidos, los avances en cirugía pediátrica y cuidados intensivos resultan en un incremento de la supervivencia en el tratamiento del íleo meconial (JR Fuchs y JC Langer, 1998).

En lo que concierne la cirrosis biliar, en el tratamiento de la afectación hepática se dispone del ácido ursodeoxicólico. Se han constatado mejoras clínicas tras la administración de este ácido biliar en 70 pacientes con FQ. Se ha demostrado que la función pancreática se mantiene y que se evita la progresión y por tanto el empeoramiento de la cirrosis biliar

(S Nousia-Arvanitakis, 2001). El ácido ursodeoxicólico que se administra por vía oral sirve para mejorar la secreción biliar, fluidificar la bilis y evitar la progresión a cirrosis.

Desde el inicio de la década de los ochenta con la aparición de nuevos inmunosupresores, el trasplante hepático se ha consolidado como una opción terapéutica válida en las insuficiencias hepáticas terminales.

9.3. Tratamiento de la infertilidad y embarazo

Los avances en medicina de la reproducción han hecho posible un tratamiento de la infertilidad. Hoy en día se pueden obtener espermatozoides mediante una biopsia testicular o por aspiración de espermatozoides del epidídimo de los pacientes estériles gracias a la microcirugía para fecundaciones o inseminaciones *in vitro*. Se han descrito casos de mujeres con FQ que no quedaron embarazadas incluso después de ciclos de inseminación artificial intrauterina (proceso que evita los problemas asociados al mucus cervical) pero sí después de fecundación *in vitro* (S Epelboin, 2001).

La inyección intracitoplasmática del espermatozoide (ICSI) también llamada microinyección espermática en el óvulo tiene mejores resultados que la fecundación *in vitro* estándar (SJ Silber, 1994).

El diagnóstico preimplantacional es una técnica de reproducción asistida que permite analizar una célula del embrión (blastómero) para detectar una anomalía cromosómica o genética en los embriones procedentes de la fecundación *in vitro*, antes de que éstos se implanten en el útero de la mujer con lo que se asegura un embarazo sano al menos para la enfermedad que no se quiere que sea transmitida por los padres a sus descendientes (JC Harper, 2002). De hecho, desde 1992 ya se ha conseguido que nazcan niños sanos cuyos padres eran portadores de la mutación F508del, después de aplicar el diagnóstico genético preimplantacional (AH Handyside, 1992), (A Ao, 1996a), (A Ao, 1996b), (C Moutou, 2001). También se ha puesto a punto la detección de otras mutaciones (además de la F508del) en el embrión como la mutación W1282X (R Avner, 1994).

Los embarazos de mujeres con FQ son de alto riesgo debido a la patología pulmonar y problemas nutricionales de la madre. Por estos motivos estas mujeres precisan un seguimiento especial. Las embarazadas pueden padecer un empeoramiento de la función pulmonar y diabetes gestacional. El uso de antibióticos inhalados o intravenosos no parecen ser teratogénicos siempre y cuando sus niveles estén monitorizados. El embarazo no parece afectar a la supervivencia de la mujer con FQ. Un estudio reciente del 2003 donde se comparaba la supervivencia de mujeres con FQ 10 años después de haber estado preñadas respecto de las que no lo estuvieron concluyó que no se vio reducida la supervivencia de las mujeres embarazadas (CH Goss, 2003).

9.4. Tratamiento nutricional y dietético

Las recomendaciones nutricionales en FQ comprenden una dieta rica en energía, en proteínas y en carbohidratos (BW Ramsey, 1992). Una mala nutrición está asociada a un mal desarrollo del pulmón en los pacientes FQ (MA Thomson, 1995).

Un estudio de 1997 en Wisconsin (EEUU) ha demostrado diferencias en el peso y altura en un seguimiento de 10 años entre un grupo de pacientes diagnosticados en un programa de "screening" (cribaje) con una media de edad de 7 semanas comparado con un grupo de pacientes diagnosticados según las manifestaciones clínicas con una media de edad de 23 semanas (PM Farrell, 1997). Estos datos refuerzan la idea de un diagnóstico temprano y muestran la importancia de una intervención nutricional intensa durante la infancia en niños con FQ.

Al nacer, la mayoría de niños FQ tiene un peso y altura normales. Sin embargo, cuando han sido diagnosticados durante las primeras semanas de vida tanto la altura como el peso son significativamente menores comparados con niños sanos (MC Reardon, 1984). Una complicación típica de niños FQ sin tratamiento nutricional es la aparición de hipoproteinemia severa y a menudo anemia (JE Bines y EJ Israel, 1991). Todos estos pacientes tienen un déficit de vitamina E. Por estas razones, son esenciales suplementos de vitamina E, hierro y una dieta rica en grasas y proteínas. Además, la administración de ácidos grasos omega3 puede tener efectos beneficiosos fundamentalmente a nivel pulmonar por su acción antiinflamatoria (U Keicher, 1995). Los pacientes con diabetes precisan una administración cuidadosa de carbohidratos acoplándola a las necesidades calóricas y ajustando la insulina en última instancia .

La alimentación del pecho de la madre no está contraindicada en los niños FQ. La leche materna tiene multitud de ventajas tanto para niños sanos como afectados de FQ, como son una composición de nutrientes óptima (aminoácidos, ácidos grasos), factores que promueven la digestión (amilasa, lipasa), hormona de crecimiento, y factores protectores (inmunoglobulinas, citoquinas). De hecho, la hormona de crecimiento (GH) ha mostrado su eficacia para el tratamiento del retraso en el crecimiento de los adolescentes prepúbereles con FQ (DS Hardin, 2001). Una inyección diaria de GH durante un año mejoró el peso y la altura del grupo de niños tratados respecto al grupo control.

La leche humana acelera la maduración de las funciones intestinales, protege frente a diarrea e infecciones gastrointestinales y potencia la respuesta del sistema inmunitario. A pesar de que el contenido en proteínas es bastante bajo en la leche materna, estudios de crecimiento muestran que no hay diferencias durante los dos primeros años de vida entre niños FQ alimentados con leche materna o con otro tipo de leches. De hecho, los niños nutridos por el pecho materno tienden a ser un poco más pesados que los niños que no han seguido esta alimentación (KE Holliday, 1991).

Es necesaria la ingesta de sal para hacer frente a las pérdidas por sudor sobre todo en épocas de calor, episodios de fiebre o diarrea. La administración de vitaminas es obligada en aquellos pacientes que presentan insuficiencia pancreática además de tomar enzimas pancreáticos. Un estudio muy reciente de H. Fischer y colaboradores ha demostrado que la vitamina C regula el canal CFTR (H Fischer, 2004). La instilación de vitamina C en el epitelio nasal de pacientes activó el transporte de cloruros en este epitelio. La vitamina C se presenta entonces como un posible tratamiento nutricional complementario de las secreciones viscosas al incrementar la secreción de fluido en el epitelio respiratorio. Finalmente, la educación nutricional de la familia y del niño con FQ es un aspecto fundamental en el cuidado de los pacientes. Es bien conocida la influencia que ejercen los factores psicosociales y ambientales sobre la alimentación de los niños.

10. NUEVAS ESTRATEGIAS TERAPEUTICAS

10.1. Terapias farmacológicas dirigidas a la proteína CFTR

10.1.1. Plegamiento y conductancia de la proteína CFTR

La principal mutación responsable de la fibrosis quística en la población mundial es la deleción de la fenilalanina en el codón 508 (F508del) que representa el 70% de los cromosomas (The Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium, 1990). La proteína con esta mutación queda retenida en el retículo endoplásmico de la célula (EA Pasyk y JK Foskett, 1995) y 99% de la misma es degradada en las estructuras pre-Golgi por el proteasoma (CL Ward, 1995), (CL Ward y RR Kopito, 1994). Sin embargo, se ha demostrado que cierta cantidad de proteína con la mutación F508del llega a la membrana plasmática *in vivo* y que el canal que forma es funcional (N Kalin, 1999), (W Dalemans, 1991). Por este motivo se están desarrollando distintas estrategias para mejorar el plegamiento y la conductancia del canal CFTR.

10.1.1.1. Plegamiento de la proteína CFTR

En 1992, GM. Denning y colaboradores observaron un incremento del procesamiento de la proteína CFTR mutada F508del hacia la forma madura completamente glicosilada cuando se disminuía la temperatura de incubación de un cultivo de fibroblastos FQ de 37°C a 30°C (GM Denning, 1992). Aunque esta observación carece de aplicación clínica, sí ha puesto de manifiesto que se pueden manipular el plegamiento y el tránsito de la proteína CFTR.

Estudios *in vitro* con chaperonas químicas como el glicerol han mostrado que se puede estabilizar la estructura proteica de CFTR. De hecho, una concentración del 10% de glicerol (muy permeable a través de la membrana plasmática) es capaz de promover el tránsito de la

proteína mutada hacia la membrana plasmática en células HEK293 (células embrionarias de riñón humano) dando lugar a corrientes de cloruros (S Sato, 1996).

Durante el plegamiento tridimensional de las proteínas intervienen chaperonas moleculares en el retículo endoplásmico que estabilizan la estructura proteica. Entre las chaperonas moleculares mejor estudiadas se encuentran las proteínas HSP70 y HSC70. Esta última se une al dominio NBD1 de CFTR estabilizándola y evita la agregación proteica (E Strickland, 1997). La unión de HSC70 con la chaperona CHIP promueve la degradación de la proteína CFTR mutada (GC Meacham, 2001).

El butirato es un regulador de la transcripción y su forma de administración oral es el 4-fenilbutirato de sodio o 4-PBA (Buphenyl). RC. Rubenstein y colaboradores han demostrado que el Buphenyl promueve el tránsito de CFTR F508del al reducir la estabilidad del mRNA de *HSC70* en las células de epitelio bronquial IB3.1 (F508del/W1282X) (RC Rubenstein y PL Zeitlin, 2000), (RC Rubenstein y BM Lyons, 2001). De esta manera CFTR podría escapar de la asociación con HSC70.

Se ha observado una asociación entre HSP70 y la proteína mutada F508del que promueve la ubiquitinización y degradación de CFTR (Y Yang, 1993). Sin embargo, cuando se indujo la producción de HSP70 por el Buphenyl en las células IB3.1 se constató un aumento en el tránsito y maduración de la proteína CFTR mutada F508del (LR Choo-Kang y PL Zeitlin, 2001).

JM. Wright y colaboradores estudiaron el perfil de expresión génica en células IB3.1 tras el tratamiento de las mismas con 4-PBA (JM Wright, 2003). Para ello pusieron a punto el análisis de "microarrays" y compararon la expresión de RNA mensajeros en células tratadas respecto a células controles con el fin de elucidar el mecanismo de acción del fenilbutirato. Los genes que disminuían su expresión estaban relacionados con el control de la expresión génica (ciclo celular, diferenciación, crecimiento y factores de transcripción). El cambio más notable fue el aumento de expresión de proteínas de la familia de las chaperonas "heat-shock" tanto de 70kDa como de 110kDa. Los autores del trabajo no detectaron cambios significativos en los niveles de mRNA de *HSC70* pero sí un incremento de los niveles de *HSP70*. Esta observación concuerda con estudios previos (LR Choo-Kang y PL Zeitlin, 2001).

El análisis del perfil genético de modelos celulares tratados con fármacos utilizados en el tratamiento de la FQ mediante la técnica de "microarrays" podría servir para elucidar la fisiopatología de la enfermedad.

El 4-PBA se ha utilizado en ensayos clínicos de fase I con 18 pacientes homocigotos F508del y se ha evidenciado que el potencial nasal del grupo tratado es superior al no tratado (RC Rubenstein y PL Zeitlin, 1998). En otro ensayo más reciente en fase I/II con 19 pacientes homocigotos F508del se confirma una relación dosis-dependiente de 4-PBA y

transporte de cloruros en el epitelio nasal de estos pacientes (PL Zeitlin, 2002). En consecuencia, la utilización de 4-PBA constituye una opción válida para el tratamiento de los pacientes FQ.

En un estudio muy reciente, ME. Egan y colaboradores administraron durante tres días curcumina (inhibidor de la bomba de calcio del retículo endoplásmico) por vía oral a ratones homocigotos F508del en dosis comparables a las toleradas por los humanos (ME Egan, 2004). El resultado fue una mejora del potencial nasal y una mayor supervivencia respecto a los ratones no tratados. La curcumina no tuvo ningún efecto en ratones "knockout" FQ.

El tratamiento de células de riñón de Hamster (BHK) transfectadas con F508del produjo la expresión de la proteína CFTR en la superficie apical de estas células que además resultó ser funcional evidenciado por experimentos de conducción de yoduro.

Los resultados de esta investigación ponen de manifiesto que la curcumina podría ser utilizada en la clínica para el tratamiento de pacientes homocigotos F508del.

10.1.1.2. Conductancia del canal CFTR

Las estrategias anteriormente mencionadas actúan a nivel del plegamiento de la proteína CFTR. Sin embargo, aunque la proteína CFTR mutada F508del se localice en la membrana plasmática de las células ésta tiene una conductancia reducida. Por lo tanto, terapias cuyo objetivo sea mejorar o aumentar esta conductancia pueden actuar sinérgicamente con las terapias anteriormente descritas. Existen distintos fármacos que están siendo estudiados con esta finalidad como las xantinas, inhibidores de las fosfodiesterasas e isoflavonas.

Xantinas: Se ha estudiado el efecto del IBMX (3-isobutil-1-metilxantina, inhibidor inespecífico de fosfodiesterasas de cAMP) en oocitos de *Xenopus laevis* que expresan la proteína CFTR mutada F508del y se ha demostrado que incrementa las corrientes de cloruros (ML Drumm, 1991). Su efecto se podría deber a que mantiene abierto más tiempo el canal CFTR al prolongar el estado fosforilado del dominio R (BD Schultz, 1999). No obstante, el IBMX no ha demostrado su efectividad *in vivo*. En pacientes homocigotos F508del no se observó corrientes de cloruros en el epitelio nasal de pacientes tratados (B Grubb, 1993).

En 1992, O. Eidelman y colaboradores demostraron que el CPX (8-ciclopentil-1,3-dipropilxantina) estimulaba el flujo de cloruro radiactivo $^{36}\text{Cl}^-$ a través de CFTR en la línea celular de adenocarcinoma de páncreas CFPAC-1 homocigota F508del. Además se constató que el CPX fue muy selectivo ya que no tuvo ningún efecto en células salvajes ni en CFPAC-1 transfectadas con *CFTR* salvaje (O Eidelman, 1992). El CPX tampoco tuvo efecto en células Fisher de tiroides de rata transfectadas con *CFTR-G551D* (O Zegarra-Moran, 2002), por lo que el CPX parece actuar únicamente sobre F508del. En otro estudio, el CPX tuvo el mismo efecto en las células IB3.1 y en fibroblastos de ratón NIH3T3. En las

células IB3.1 (F508del/W1282X) y en las NIH3T3 transfectadas con *CFTR-F508del*, el CPX estimuló el flujo de $^{36}\text{Cl}^-$ pero no en las IB3.1 transfectadas con *CFTR* salvaje ni en las NIH3T3 sin transfectar (C Guay-Broder, 1995). Además, los autores describieron que el efecto del CPX sobre F508del fue dosis-dependiente.

El mecanismo de acción del CPX parece ser a través de su unión al dominio NBD1. La mutación F508del se encuentra en el dominio NBD1 y se ha descrito que la unión de CPX es más afín en NBD1 con la mutación F508del que con el NBD1 salvaje (BE Cohen, 1997).

El potencial terapéutico del CPX ha conllevado un estudio de farmacocinética y seguridad en un protocolo clínico de fase I (NA McCarty, 2002) donde 37 pacientes homocigotos F508del se sometieron a placebo y a dosis crecientes de CPX. Las mediciones de diferencia de potencial nasal y de cloruros en el test del sudor no revelaron ningún efecto terapéutico tras una única dosis de CPX pero no se detectó toxicidad ni efecto adverso lo que evidencia la seguridad en el uso del CPX. El CPX está actualmente en un protocolo clínico de fase II en pacientes homocigotos F508del.

Inhibidores de fosfodiesterasas: incrementan el cAMP al inhibir uno o más enzimas involucrados en la degradación del cAMP. El cAMP activa la PKA y ésta fosforila el dominio R de CFTR activando el canal. Un ejemplo de inhibidor específico de fosfodiesterasas de cAMP es la milrinona. TJ. Kelley y colaboradores encontraron que este fármaco aumentó el flujo de cloruros en células Calu-3 que expresaban CFTR salvaje, de manera dosis-dependiente y que actúa a nivel de la vía cAMP/PKA (TJ Kelley, 1995). En otro estudio, los mismos autores observaron que la administración de una combinación de milrinona y forskolina (activador de la adenilato ciclasa que resulta en el incremento de cAMP intracelular) aumentaba la magnitud del potencial del epitelio nasal de ratones homocigotos F508del (TJ Kelley, 1997). No obstante, la instilación de milrinona en el epitelio nasal de pacientes homocigotos F508del no ha producido ninguna variación del potencial nasal de los mismos (SN Smith, 1999).

Isoflavonas: sustancias naturales que se encuentran en las legumbres. Una de las más conocidas es la genisteína (inhibidor de la tirosina cinasa). B. Illek y colaboradores describieron en 1995 la activación del canal CFTR por la genisteína al medir el flujo de ^{125}I por electrofisiología en células NIH3T3 transfectadas con *CFTR* salvaje (B Illek, 1995). Los mismos autores también han demostrado que la genisteína es efectiva en mutantes G551D y F508del aumentando su conductancia. En células HeLa (carcinoma cervical humano) transfectadas con *CFTR-G551D*, la adición de genisteína y forskolina activó corrientes de cloruros pero no en células homocigotas F508del a menos que éstas estuvieran pretratadas con 4-PBA. Este hallazgo sugirió que la genisteína tenía efecto únicamente cuando la proteína CFTR mutada estaba presente en la membrana plasmática. Además, la perfusión

de genisteína en mucosa nasal de pacientes G551D estimuló un potencial nasal dependiente de cloruros (B Illek, 1999).

Se ha propuesto que la genisteína actuaría como un inhibidor de fosfatasa incrementando el estado fosforilado del canal CFTR (WW Reenstra, 1996). Otro estudio ha demostrado que la genisteína se une al dominio NBD2 de CFTR inhibiendo sus actividades ATPasa, GTPasa y adenilato quinasa (C Randak, 1999).

10.1.2. Antibioterapia y proteína CFTR

Los aminoglicósidos son antibióticos que además de su acción antimicrobiana pueden suprimir codones de terminación de la traducción al favorecer la incorporación de un aminoácido en el codón sin sentido y evitando que el ribosoma “salte”. Por lo tanto, permiten que la traducción de la proteína continúe a pesar de que el mRNA contenga mutaciones puntuales sin sentido. De esta manera, estos antibióticos reducen la fidelidad de la traducción al inhibir el mecanismo “proofreading” del ribosoma que evita que aminoacil RNA de transferencia se unan a la cadena polipeptídica si el reconocimiento entre codón y anticodón no es el correcto (T Ruusala y CG Kurland, 1984). Las primeras referencias de que un aminoglicósido suprime un codón sin sentido en células eucariotas fueron en 1978 y 1979 (E Palmer y JM Wilhelm, 1978), (E Palmer, 1979). M. Howard y colaboradores han demostrado que se pueden restablecer la síntesis y la función del canal CFTR en células HeLa transfectadas con la mutación sin sentido G542X o R553X, al tratarlas con el aminoglicósido G-418 (M Howard, 1996). DM. Bedwell y colaboradores han probado que la incubación de las células IB3.1 (F508del/W1282X) con G-418 o gentamicina promueve la expresión de proteína CFTR en la membrana apical de estas células y que el canal CFTR que forma es funcional (DM Bedwell, 1997). Más recientemente, A. Zsembery y colaboradores aislaron colangiocitos del hígado de un paciente FQ (F508del/G542X) y los incubaron con gentamicina. El resultado fue la expresión de canal CFTR funcional (A Zsembery, 2002).

El efecto de los aminoglicósidos también se ha evaluado en organismos vivos. M. Du y colaboradores generaron un ratón transgénico *cfr* *-/-* que también expresaba el cDNA de *CFTR* humano con la mutación G542X. Los tratamientos con gentamicina y tobramicina resultaron en la expresión de canal CFTR humano en la superficie apical de las glándulas de los ratones tratados aunque en menor medida en el caso de la tobramicina. Estos resultados demostraron que se podía suprimir una mutación sin sentido *in vivo* (M Du, 2002).

Se ha valorado la utilización de gentamicina en pacientes FQ. M. Wilschanski y colaboradores iniciaron un estudio piloto de administración de gentamicina a 9 pacientes FQ con mutaciones sin sentido (homocigotos W1282X, heterocigotos compuestos W1282X/G542X o W1282X/otra mutación). Estos pacientes recibieron gentamicina por vía

intranasal 3 veces al día durante 14 días. Los autores midieron la diferencia de potencial nasal antes y después del tratamiento y observaron que el potencial nasal variaba lo que indicaba un incremento de transporte de cloruros en el epitelio nasal de los pacientes tratados (M Wilschanski, 2000).

En otro estudio, JP. Clancy y colaboradores han demostrado un aumento de la conductancia de CFTR (por medición de diferencias en el potencial nasal) en pacientes FQ heterocigotos F508del y una mutación sin sentido (W1282X, R553X o G542X) respecto a un grupo control de pacientes homocigotos F508del tras la administración sistémica de gentamicina (JP Clancy, 2001).

Más recientemente, M. Wilschanski y colaboradores de nuevo vuelven a tratar a número mayor de pacientes homocigotos W1282X, heterocigotos compuestos W1282X/G542X o W1282X/otra mutación y a homocigotos F508del como grupo control pero el estudio esta vez es doble ciego y con placebo. Nuevamente, la instilación de gentamicina hizo variar el potencial nasal en pacientes homocigotos para la mutación sin sentido W1282X, en los pacientes heterocigotos W1282X/- pero no en los homocigotos F508del. Además, en preparaciones celulares del epitelio nasal los autores observaron la expresión de CFTR en la membrana apical de estas células (M Wilschanski, 2003).

Estos estudios demuestran que la administración de gentamicina a pacientes FQ con mutaciones sin sentido resulta en la expresión de CFTR funcional. Lo que queda por averiguar es la toxicidad, efectividad y tolerancia de la gentamicina en tratamientos más prolongados. Además, los efectos secundarios de la gentamicina sobre la traducción de otros genes deberían ser estudiados.

10.2. Trasplante de células madre

Un trasplante alternativo al trasplante pulmonar sería el trasplante celular con el fin de repoblar el epitelio pulmonar de pacientes FQ con células que expresasen CFTR. Así, una estrategia de trasplante ha sido sugerida en un estudio realizado con células madre hematopoyéticas de donante masculino trasplantadas en el pulmón de mujeres receptoras (BT Suratt, 2003). Se examinaron muestras de tejido pulmonar biopsiado de 3 mujeres y se observó quimerismo celular (presencia de células epiteliales y endoteliales). Estos resultados abren una nueva vía terapéutica para el posible tratamiento del pulmón dañado mediante el uso de células madre humanas. En el ratón se han descubierto células madre en el epitelio traqueal y se ha descrito que están localizadas en nichos celulares específicos (DW Borthwick, 2001). La plasticidad de las células madre fue demostrada por primera vez por DS. Krause y colaboradores (DS Krause, 2001). En este estudio, los investigadores trasplantaron células madre de la médula ósea de ratón a huéspedes murinos irradiados. A las 48h, extrajeron de nuevo células madre de la médula ósea de los ratones huésped y las

trasplantaron en otros ratones receptores dando lugar a injertos celulares en el epitelio de bronquios y alvéolos. Esta investigación constituye una evidencia de que se podría repoblar el epitelio respiratorio. Por el contrario, este tipo de trasplantes no parece funcionar en humanos. JC. Davies y colaboradores no consiguieron repoblar el epitelio nasal de mujeres al cabo de 15 años de haber sido trasplantadas con células madre de médula ósea de hombres. En 4 mujeres a las que les practicaron un raspado del epitelio nasal, los autores detectaron la presencia del cromosoma Y pero no de un tipo de citoqueratina que debía demostrar el origen epitelial de las células. De esta manera, estos resultados ponen de manifiesto que las células progenitoras de la médula ósea no se diferenciaron en células del epitelio respiratorio (JC Davies, 2002).

A diferencia de otros órganos del cuerpo humano en los que se conoce la existencia de células madre se están identificando estas células en el pulmón que en un principio tiene poca capacidad de regeneración. Sin embargo, los bronquios y bronquiolos contienen poblaciones celulares progenitoras con capacidad proliferativa: las células basales y las células secretoras no ciliadas de las cuales las mejores estudiadas son las células Clara, que fueron descritas en 1937 por M. Clara (M Clara, 1937). Los bronquiolos también presentan células ciliadas. Los alvéolos están formados por células escamosas (neumocitos tipo I) y células cuboidales (neumocitos tipo II) (AE Bishop, 2004). KU. Hong y colaboradores han demostrado que un tipo de células basales (que expresan citoqueratina 14) son células multipotentes capaces de regenerar el epitelio bronquial (KU Hong, 2004). Se ha propuesto que las células Clara y los neumocitos tipo II sean células madre de los bronquios y los alvéolos respectivamente (RJ Mason, 1997), (JE Boers, 1999). SD. Reynolds y colaboradores han sugerido que en el ratón, los cuerpos neuroepiteliales del pulmón que contienen células Clara, células neuroendocrinas pulmonares y una variante de células Clara sirvan de reservorio de células progenitoras capaces de regenerar el epitelio. Estos cuerpos neuroepiteliales participaron en la regeneración epitelial después de dañar las células Clara del pulmón de ratón mediante naftaleno (SD Reynolds, 2000).

La primera evidencia de que los neumocitos tipo II eran células madre surgió en 1954 cuando se demostró que proliferaban y restauraban el epitelio alveolar dando lugar a nuevos neumocitos tipo II y a neumocitos tipo I, después de un daño pulmonar generado mediante dióxido de nitrógeno (CC Macklin, 1954). D. Duan y colaboradores han demostrado que la expresión del factor linfóide Lef1 define una población de células progenitoras en la superficie epitelial involucradas en la formación y desarrollo de las glándulas submucosales (D Duan, 1998). Los autores también propusieron la terapia génica *in utero* de estas glándulas. En un modelo de xenoinjerto de tráquea de hurón implantada en ratones atómicos, los investigadores demostraron la infección de células progenitoras mediante

retrovirus que contenían el gen *ALP* (fosfatasa alcalina) y que su expresión fue estable durante la morfogénesis glandular.

MP. Vacanti y colaboradores han evidenciado la existencia de células madre pluripotentes en distintos tejidos del ratón con características semejantes a las esporas, de ahí que las hayan llamado células “spore-like”(MP Vacanti, 2001). Estas células tuvieron la capacidad de regenerar *in vitro* componentes celulares de los tejidos de los cuales fueron aisladas. Las células que provenían del pulmón dieron lugar a estructuras bronquiolares. En todos los tejidos estudiados las células aisladas resultaron ser muy pequeñas y fueron capaces de sobrevivir en condiciones con casi ausencia de oxígeno después del sacrificio de los ratones. A pesar de haber sido congeladas sin ningún crioprotector, estas células mantuvieron su capacidad de proliferación después de ser descongeladas a temperaturas que otras células de mamífero no hubieran aguantado.

El mejor conocimiento de los tipos celulares que componen el pulmón y sobretodo de las células madre presentes en los epitelios de las vías respiratorias abre las puertas a la utilización de promotores específicos para la transferencia del gen *CFTR* a las células que realmente necesitan su expresión. Un ejemplo queda representado en el estudio reciente de LE. Ostrowski y colaboradores (LE Ostrowski, 2003) quienes caracterizaron el promotor del gen *FOXJ1* humano, un factor de transcripción necesario para la diferenciación de células ciliadas pulmonares. Los autores insertaron parte de este promotor en un retrovirus que contenía el gen *EGFP* y generaron un ratón transgénico. Los análisis de expresión de la proteína verde demostraron que ésta se expresó muy fuertemente en las células ciliadas de la tráquea, bronquios y epitelio nasal. El fragmento del promotor del gen *FOXJ1* mantuvo la expresión específica celular y tisular en este modelo transgénico sugiriendo que la administración de un vector en el pulmón resultaría en la expresión de *CFTR* únicamente en las células ciliadas del epitelio pulmonar eliminando entonces su expresión en otros tipos celulares que no la requieren y que incluso podría ser perjudicial para las células. Finalmente, los diferentes modelos de xenoinjertos de células respiratorias humanas en ratones acabarán por identificar cuales son realmente las células progenitoras y células madre pulmonares que intervienen en la regeneración epitelial (E Puchelle y B Peault, 2000).

10.3. Vacunas anti-*Pseudomonas aeruginosa*

Hoy en día, la antibioterapia sirve para controlar la proliferación bacteriana pero todavía no se ha encontrado un antibiótico que la erradique. Por este motivo, se está investigando una vacunación eficaz de los pacientes con FQ que aún no han desarrollado el cuadro de infección por *Pseudomonas aeruginosa* para evitar la colonización bacteriana.

Muy recientemente, A. Lang y colaboradores han publicado un análisis retrospectivo sobre el seguimiento durante 10 años de 30 niños con FQ (media de edad 7 años) sin previa historia clínica de infección por *P. aeruginosa*, que fueron vacunados contra esta bacteria cada año desde 1989 hasta 2001 (AB Lang, 2004). Se compararon parámetros clínicos como la infección bacteriana, la proporción de pacientes infectados, la función pulmonar (medición de la FEV1) y el peso corporal entre el grupo vacunado y un grupo control de pacientes FQ. Los resultados del estudio retrospectivo fueron los siguientes:

El tiempo de aparición de la infección por *P. aeruginosa* fue mayor en el grupo vacunado que en el control y más pacientes de este último grupo se infectaron de manera crónica que en el grupo vacunado. Al cabo de 10 años, la media de la FEV1 y del peso corporal fue superior en los pacientes vacunados con respecto al grupo control.

Las infecciones respiratorias en los pacientes con FQ implican un mayor deterioro de la función pulmonar y progresión de la enfermedad. Por esta razón, es recomendable la vacunación contra la gripe en estos pacientes. Sin embargo, miembros del grupo de estudio de enfermedades genéticas y fibrosis quística de la *Cochrane Collaboration* (www.cochrane.org) (*Cochrane Cystic Fibrosis and Genetic Disorders Group*) revisaron tres protocolos de vacunación contra la gripe para un total de 115 pacientes con FQ (A Tan, 2000). En los 3 protocolos, la vacunación generó la producción de anticuerpos pero los pacientes no obtuvieron ningún beneficio

10.4. Terapia génica: estrategias de adición o reemplazo

10.4.1. Terapia génica no viral

La corrección del transporte de cloruros mediante liposomas con el gen *CFTR* humano se obtuvo en ratones transgénicos en 1993 (SC Hyde, 1993), (EW Alton, 1993).

Son muchos los estudios preclínicos realizados en animales por lo que a continuación se tomarán como ejemplos publicaciones relevantes que cubren aspectos relacionados con la mejora de la transferencia y persistencia del transgén (modificación de vectores no virales, disminución de la respuesta inmunitaria frente al transgén y utilización de promotores para aumentar la expresión del mismo y finalmente uso de agentes químicos para incrementar la transferencia génica).

Modificación de vectores no virales: entre estas modificaciones se encuentra la adición de azúcares a polilisinas y polietileniminas para incrementar la internalización de los complejos. Se ha desarrollado el direccionamiento genético mediado por receptor como por ejemplo el receptor del complejo enzima-serpina (sec-R). AG. Ziady y colaboradores han demostrado corrección parcial del transporte de cloruros en el epitelio nasal de ratones “knock-out” (14 de 18) tras la administración de un complejo plasmídico CFTR junto con el

ligando de sec-R. Sin embargo, el potencial nasal volvió a valores iniciales 18 días después del tratamiento (AG Ziady, 2002).

Respuesta inmunitaria frente al transgén: NS. Yew y colaboradores redujeron la capacidad inmunoestimuladora de complejos plásmido-liposoma al disminuir hasta 80% los motivos CpG del plásmido (NS Yew, 2002). Estos motivos CpG inmunoestimuladores contribuyen a la respuesta inmunológica de los vectores (AM Krieg, 2001), (AM Krieg, 2002). Después de inyectar los complejos plasmídicos en la vena de la cola de ratones, los autores observaron menos cambios en parámetros sanguíneos y niveles reducidos de citoquinas inflamatorias con respecto al plásmido sin modificación de las CpGs. La expresión de la cloranfenicol acetil transferasa contenida en el plásmido se mantuvo más tiempo (hasta 49 días) en el pulmón de estos ratones que la expresión transitoria observada con el plásmido sin modificar.

Promotores y transgén: DR. Gill y colaboradores han estudiado el efecto de distintos promotores en la expresión de plásmidos reporteros sin complejar en el pulmón de ratones tras una administración intranasal (DR Gill, 2001). La expresión fue transitoria cuando los genes quedaron bajo el control de los promotores SV40 (Simian Virus 40), RSV (Rous Sarcoma Virus) y CMV (Citomegalovirus) pero fue persistente (hasta 8 semanas) utilizando los promotores endógenos de la poliubiquitina C (UbC) y factor 1 α de elongación (EF1 α). Se ha demostrado que el promotor CMV es silenciado por el TNF- α (Tumor Necrosis Factor- α) e INF- γ (interferón- γ) cuya expresión está aumentada después de una transferencia génica (AR Brooks, 2004). No obstante no se conoce todavía por qué los promotores UbC y EF1 α son más resistentes al silenciamiento genético.

Agentes químicos: otros estudios se han encaminado hacia la alteración de la mucosidad para incrementar la transferencia génica no viral. Por ejemplo, S. Ferrari y colaboradores mediante el uso del mucolítico N-acetilcisteína incrementaron la eficiencia de transfección de lípidos catiónicos y polímeros complejados con el gen reportero cloranfenicol acetil transferasa en el pulmón de ratones. Sin embargo al utilizar el gen *CFTR* no observaron una mejora en el potencial nasal de ratones “knock-out” (S Ferrari, 2001).

10.4.2. Terapia génica viral

En 1990, solamente un año después de que se clonara el gen *CFTR*, ya se realizaron los primeros experimentos de adición de su cDNA en células eucariotas. ML. Drumm y colaboradores infectaron células de adenocarcinoma de páncreas CFPAC-1 (homocigotas F508del) con un retrovirus que contenía el cDNA de *CFTR*. El análisis de clones celulares reveló la presencia de RNA derivado del cDNA y de corrientes de cloruros medidas por la técnica de “patch-clamp” (ML Drumm, 1990). Los primeros ensayos en animales se llevaron a cabo en 1992 y ya se demostró que se podía transferir el gen *CFTR* al epitelio pulmonar

de ratas. MA. Rosenfeld y colaboradores administraron por vía intratraqueal un adenovirus conteniendo el gen *CFTR* humano y detectaron mRNA derivado del genoma viral y proteína en células epiteliales hasta 6 semanas después de la transducción.

A. Scaria y colaboradores, mediante instilación al pulmón de ratones de un adenovirus que contenía el *CFTR* humano mostraron que el mRNA se mantuvo hasta 70 días en tres tipos de cepas murinas (A Scaria, 1998). Además, se detectó proteína funcional en el epitelio nasal de los mismos. Los resultados sugirieron que se podía obtener una expresión a largo plazo de *CFTR* en el epitelio respiratorio de ratones.

En un estudio en primates RJ. McDonald y colaboradores evaluaron la eficacia de la administración por aerosol de un adenovirus-*CFTR* (RJ McDonald, 1997). Los experimentos demostraron que es factible transferir el gen *CFTR* a los pulmones de estos primates sin que se den reacciones adversas considerables.

La primera utilización de virus adenoasociados en modelos animales fue en 1993. TR. Flotte y colaboradores transdujeron un lóbulo pulmonar de conejos mediante broncoscopia (TR Flotte, 1993). Tanto RNA como proteína CFTR fueron detectados en el epitelio pulmonar hasta 6 meses después de la administración.

Tras transducir los pulmones de macacos *Rhesus* con un AAV2-*CFTR* mediante broncoscopia, CK. Conrad y colaboradores detectaron DNA específico del vector y mRNA hasta 180 días postadministración sin observarse inflamación de los pulmones (CK Conrad, 1996). De todas maneras, las células que mostraron expresión de *CFTR* fueron las alveolares, fisiológicamente menos relevantes para el tratamiento de la FQ. Se ha descrito que el receptor del AAV2 es el heparan-sulfato y éste se expresa en la membrana basolateral de las células epiteliales. Por esta razón se están investigando nuevos serotipos de virus adenoasociados con distinto tropismo.

Se han identificado varias isoformas de virus adenoasociados humanos. Se ha documentado que los AAV5 y AAV6 infectan más eficientemente las células epiteliales que los AAV2 aunque la eficiencia sigue siendo baja. A. Auricchio y colaboradores han mostrado que se puede readministrar al pulmón de ratón un AAV2/5 (genoma del AAV2 pero con la cápside del AAV5) por vía nasal 5 meses después de la primera administración (A Auricchio, 2002).

Los lentivirus, virus RNA integrativos derivados del VIH (Virus de la Inmunodeficiencia Humana), se han utilizado para transferir el gen *CFTR* a células epiteliales y al epitelio pulmonar del ratón. M. Limberis y colaboradores demostraron por primera vez que el defecto en el transporte de cloruros *in vivo* se podía revertir mediante la transducción de *CFTR* con lentivirus (M Limberis, 2002). Los autores instilaron una dosis de lentivirus conteniendo el

gen *CFTR* a ratones “knock-out” y la variación del potencial nasal se mantuvo hasta 110 días. Sin embargo, para poder infectar el epitelio pulmonar fue necesario pretratar con lisofosfatidilcolina y abrir así las uniones estrechas intercelulares (“tight junctions”).

10.4.3. Terapia génica *in utero* en modelos animales

Los estudios de transferencia génica prenatal en animales han puesto de manifiesto que es factible la terapia génica *in utero* mediante vectores virales y no virales (KM Gaensler, 1999). Esta terapia adquiere sentido para enfermedades graves en las que una temprana intervención puede prevenir la aparición de las manifestaciones clínicas de las mismas. De esta manera no hace falta esperar al nacimiento de la descendencia para empezar a tratarla. Además, el feto es un mejor candidato para terapia génica que el adulto por las siguientes razones:

1. su sistema inmunológico no está aún desarrollado por lo que se podrían evitar los problemas de reacción inmunológica asociados al transgén, al producto del transgén y/o al vector de transferencia.
2. mediante esta técnica se pueden manipular las células madre en las fases de crecimiento y diferenciación, que no son tan accesibles en el adulto.
3. se puede crear inmunotolerancia frente al virus que se administra para posteriores tratamientos postnatales con el mismo virus. Uno de los argumentos en contra de la utilización de esta técnica es la posibilidad de que el material genético transferido se incorpore en las células germinales o produzca mutagénesis insercional como ha ocurrido en los niños “burbuja” que fueron tratados de SCID (S Hacein-Bey-Abina, 2003). La madre gestante corre también un riesgo que hay que evaluar. Se ha descrito que la placenta de macacos y cultivos de células de placenta humana son infectados por una variedad de retrovirus (T Bui, 1995), (KA McGann, 1994) y que ésta permite el paso de partículas retrovirales desde la madre hacia el feto (M Tsukamoto, 1995).

Son necesarias más investigaciones en modelos animales para evaluar este aspecto, máxime cuando se contemplan repetidas administraciones de virus. CD. Porada y colaboradores realizaron un estudio a largo plazo de transferencia génica mediada por retrovirus en fetos de oveja y constataron que no se produjo transferencia génica en la línea germinal mientras que se mantenía hasta 5 años la expresión del gen de resistencia a neomicina en las células hematopoyéticas transducidas (CD Porada, 1998).

La oveja es un buen modelo para estudiar la transferencia de genes en el epitelio pulmonar ya que el desarrollo del pulmón ovino y del humano son muy parecidos.

La primera demostración de que la transferencia de genes en pulmón fetal era posible queda reflejada en la investigación de 1995 llevada a cabo por BR. Pitt y colaboradores

(BR Pitt, 1995). Los investigadores evidenciaron la transferencia y expresión durante 2 a 3 semanas de los genes *glb* (β -galactosidasa) (bacteriano) e IRAP (antagonista del receptor humano de interleuquina, como control) mediante un retrovirus no replicativo por vía intratraqueal en fetos gemelos de oveja. Este primer estudio deja patente que las células fetales de pulmón se pueden transfectar con un retrovirus mientras que el epitelio pulmonar del adulto no puede ser transfectado por este tipo de virus.

Poco después, MC. Vincent y colaboradores transfirieron el gen *glb* (β -galactosidasa) al pulmón de 10 fetos de oveja por instilación intratraqueal de un adenovirus no replicativo (MC Vincent, 1995). A dos fetos control se les administró suero salino fisiológico. Los autores evidenciaron la expresión de β -Gal en 5 fetos al cabo de 3 días y hasta 14 días después de la administración del adenovirus. Sin embargo, el análisis de fluido pulmonar reveló una infiltración de neutrófilos, macrófagos y linfocitos. La disminución de la expresión del transgén se debió a la reacción inflamatoria que se produjo porque el sistema inmunitario de estos fetos era suficientemente competente para reconocer los antígenos del adenovirus.

Otros modelos animales utilizados en terapia génica *in utero* son los ratones y las ratas. HS. Sekhon y colaboradores inyectaron adenovirus no replicativos que contenían el gen *lacZ* en el líquido amniótico de fetos de rata de 16 días de gestación, tiempo que según los autores equivalía al mismo estado de maduración de un pulmón fetal humano de 22 semanas de gestación, evidenciado por la presencia de células madre multipotentes e indiferenciadas en ambos organismos. La expresión de β -Gal se mantuvo en los bronquios y bronquiolos pulmonares hasta una semana después del nacimiento de las ratas. Exámenes histológicos no constataron reacciones inmunológicas (HS Sekhon y JE Larson, 1995).

La primera evidencia de que la terapia *in utero* puede revertir un fenotipo de fibrosis quística aparece en la publicación de JE. Larson y colaboradores en 1997 (JE Larson, 1997). El modelo de estudio de la FQ fue el ratón "knock-out" homocigoto S489X que reproduce la patología intestinal observada en los humanos (JN Snouwaert, 1992). Solo 5% de estos ratones llega a la edad adulta (50 días) si no reciben tratamiento de la obstrucción intestinal que padecen. Los autores inyectaron un adenovirus con el gen *cftr* en cada saco amniótico de los fetos. Para los ratones controles utilizaron un adenovirus con el gen *lacZ*. 13 ratones *cftr* $-/-$ tratados con el gen *cftr* llegaron a la edad adulta y vivieron hasta 250 días. Todos los ratones controles murieron antes de 50 días.

Estos resultados sugieren además que la presencia de la proteína CFTR en los fetos es esencial para el desarrollo temprano normal de los mismos y que su ausencia causa el fenotipo intestinal. La importancia de la expresión de la proteína CFTR en el desarrollo fetal queda confirmada por la investigación de SL. Morrow y colaboradores (SL Morrow, 1998). Tras administrar un adenovirus con el gen *CFTR* humano (*CFTRh*), *lacZ* o *F508del* como controles, al líquido amniótico de fetos de ratas normales, los autores detectaron que los

fetos tratados con *CFTRh* presentaban unos pulmones con unas características distintas a los fetos tratados con *lacZ*, como son un incremento de la densidad celular y la mayor presencia de lípidos y glicoconjugados. Para correlacionar estos cambios fenotípicos con la disfunción pulmonar característica de la FQ, ratas de 90 días que habían sido tratadas *in utero* con *CFTRh*, *F508del* y *lacZ* fueron infectadas con *Pseudomonas aeruginosa* por vía intratraqueal. La comparación de unidades formadoras de colonias (CFU) reveló que sólo las ratas que habían sido infectadas con *CFTRh* mostraron una inhibición del crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* e incluso menor cantidad de estas bacterias que la inoculada al inicio del experimento. Las ratas controles murieron por neumonía fulminante. Sin embargo, gracias a los estudios inmunohistoquímicos los investigadores constataron que se iba perdiendo la expresión de *CFTRh* a lo largo del tiempo, hecho que atribuyeron a que el adenovirus no era integrativo. Todos estos resultados además de poner manifiesto que la proteína CFTR-F508del no protege frente a infecciones por *P. aeruginosa*, demuestran que la expresión transitoria de la proteína CFTR en el pulmón modifica tanto su estructura como su función.

Los animales de experimentación más emparentados con los humanos son los primates y también se han utilizado en ensayos de terapia génica *in utero*. Las observaciones experimentales en estos animales son las más extrapolables al hombre por su proximidad filogenética. De nuevo JE. Larson y colaboradores pero trabajando esta vez con fetos de macacos *Rhesus* (JE Larson, 2000), observaron que la administración de adenovirus conteniendo genes reporteros control (*luciferasa*, *lacZ*) y *CFTR* en el líquido amniótico de 6 fetos de macaco no generaba reacciones inmunológicas y que la expresión de las proteínas perduraba hasta 30 días. Además, la presencia de CFTR resultó en la alveolarización del pulmón, lo que demostró un estado del desarrollo más avanzado del mismo mientras que los fetos tratados con adenovirus control exhibieron una morfología normal de inmadurez pulmonar. Al igual que en estudios previos en rata y ratón, la expresión de CFTR en el pulmón de fetos de primates estimuló la diferenciación celular. Una observación importante fue que no se detectó transferencia génica en las gónadas, aspecto que sirve de argumento para los detractores de la terapia génica *in utero* para evitar la aplicación de esta técnica.

AF. Tarantal y colaboradores (AF Tarantal, 2001b), (AF Tarantal, 2001a) han demostrado la efectividad de la transferencia génica *in utero* en primates *Rhesus*. En el primer estudio los autores concluyeron que la administración de retrovirus y lentivirus por vía intraperitoneal e intrahepática en los fetos resultó en la expresión de EGFP en distintos tejidos y en células hematopoyéticas y que la expresión fue mayor en el caso de los lentivirus y que no hubo transferencia de vector a través de la placenta. En el segundo trabajo, los investigadores administraron lentivirus-EGFP por vía intrapulmonar mediante inyección guiada por ultrasonidos en el pulmón fetal de primates y observaron la expresión de EGFP en los

lóbulos pulmonares. Además, concluyeron que la expresión del transgén no afectó al desarrollo de los primates y que no hubo transferencia génica a través de la placenta ni respuesta inmunológica.

También se ha valorado la efectividad de los virus adenoasociados (AAV) para la transferencia de genes *in utero*. Sirva como ejemplo el estudio de MP. Boyle y colaboradores (MP Boyle, 2001) llevado a cabo en conejos. Estos investigadores administraron por vía intraamniótica AAV-*luciferasa* a 110 fetos de conejo, lo cual resultó en una expresión mayor del gen reportero en las membranas amnióticas seguida de la tráquea y del pulmón fetales. En estos tejidos, el pico de expresión se obtuvo a los 10 días post-transducción pero éste fue disminuyendo hasta el día 24 cuando ya se hizo indetectable la expresión de *luciferasa*. Un dato interesante es que los investigadores no observaron inflamación de los tejidos ni tampoco expresión del vector en los ovarios o hígado de las madres, lo que evidencia que el AAV no pasó a la circulación materna.

Un artículo muy reciente de D. Peebles y colaboradores (D Peebles, 2004) describe la administración directa de adenovirus- *β -gal* en la tráquea de fetos de oveja mediante inyección percutánea guiada por ultrasonidos por la caja torácica. Esta nueva técnica descrita por AL. David y colaboradores en 2003 (AL David, 2003) se utilizó para inyectar virus directamente en las vías aéreas de los fetos de oveja. Aún siendo una tecnología invasiva no causa mortalidad fetal. Las ventajas respecto a la vía intraamniótica son que no se produce pérdida de transfección del vector administrado al evitar la transducción de las membranas amnióticas y/o el efecto de dilución en el líquido amniótico. En el estudio de D. Peebles y colaboradores, los autores detectaron una baja expresión de *β -Gal* (medición por ELISA) en el parénquima pulmonar de los fetos tratados con el adenovirus. Ahora bien, cuando inyectaron los virus complejados con el polication DEAE dextrano observaron 10 veces más expresión de *β -Gal* en la tráquea y los bronquios. Este polication compensa las cargas negativas del adenovirus, reduciendo así la repulsión entre el virus y las glicoproteínas y glicolípidos cargados negativamente de las células epiteliales. Para mejorar aún más la transducción, los investigadores realizaron un pretratamiento con caprato sódico junto con el DEAE dextrano cuyo resultado fue un incremento de 90 veces la expresión de *β -Gal* con respecto al virus sin complejar. El caprato sódico es un agente que abre las uniones estrechas intercelulares ("tight junctions") por lo que permite la exposición de los receptores CAR (Coxsackie Adenovirus Receptor) del adenovirus presentes en la membrana basolateral de las células epiteliales del pulmón y en consecuencia favorece una mayor transducción. Este agente también ha demostrado su efectividad en ratones (LG Gregory, 2003) donde la transferencia del gen *g/lb* (*β -galactosidasa*) mediada por un adenovirus complejado con DEAE dextrano en la tráquea y vías respiratorias se vio incrementada por la administración de caprato sódico.

Recientemente, un estudio de CD. Porada y colaboradores pone de manifiesto que el estado de desarrollo de cada órgano y por consiguiente la edad gestacional en el momento de la inyección determina la eficiencia de transferencia génica *in utero* (CD Porada, 2004). Retomando su investigación previa (CD Porada, 1998), los mismos autores volvieron a analizar la expresión y transferencia del gen de resistencia a neomicina mediada por retrovirus en fetos de oveja pero evaluando el efecto de la edad de gestación en la eficiencia de transferencia génica en tejidos hematopoyéticos y no hematopoyéticos. Los investigadores constataron que los fetos inyectados en una etapa más temprana de la gestación presentaban mayor transducción de las células hematopoyéticas y hepáticas mientras que en el caso de las células no hematopoyéticas del pulmón ocurría lo contrario.

Todos estos estudios demuestran que en distintos modelos animales la transferencia de genes *in utero* es factible, siendo el ser humano el siguiente paso. Sin embargo, sólo cuando se haya establecido y demostrado en modelos animales que la terapia génica *in utero* funciona será aplicable al ser humano. No obstante, tienen que resolverse antes cuestiones tales como el tipo de vector, la eficacia y la seguridad de la transferencia génica, y cuales son las enfermedades más adecuadas a tratar; la transmisión en la línea germinal y la posible afectación de la madre gestante. De todas maneras, French Anderson y colaboradores propusieron dos pre-protocolos clínicos de terapia génica prenatal en humanos para tratar la deficiencia de adenosina deaminasa (ADA) y la alfa-talasemia. Esta propuesta ha animado todavía más el debate ético y científico entre los investigadores a favor y en contra de la aplicación de la terapia génica humana *in utero* (PR Billings, 1999), (H Schneider y C Coutelle, 1999).

10.4.4. Ensayos clínicos de terapia génica para la fibrosis quística

El primer ensayo clínico en pacientes FQ tuvo lugar en 1993 (J Zabner, 1993) (esta investigación está explicada en el apartado 10.4.4.1. Ensayos clínicos: vectores virales) y desde entonces se han registrado 33 protocolos (www.wiley.co.uk/wileychi/genmed/clinical). A pesar de los resultados esperanzadores obtenidos en modelos preclínicos con animales y de los numerosos protocolos clínicos con virus y vectores no virales todavía no se ha podido curar la FQ pero sí se ha demostrado que la transferencia génica de *CFTR* es posible en humanos. La eficiencia de transferencia en el pulmón sigue siendo muy baja por lo que todavía es necesario mejorar los vectores virales y no virales.

10.4.4.1. Ensayos clínicos: vectores virales

Adenovirus: El primer ensayo clínico para la fibrosis quística utilizando un virus como vector de transferencia génica se realizó en 1993. J. Zabner y colaboradores administraron un adenovirus con el gen *E1* delecionado al epitelio nasal de 3 pacientes con

FQ (J Zabner, 1993). Este tratamiento conllevó a la corrección del transporte de cloruros en este epitelio sin observarse efectos adversos asociados al virus. Un año más tarde, RG. Crystal y colaboradores transdujeron el epitelio nasal y bronquial de 4 pacientes con FQ. Un seguimiento de hasta 12 meses reveló la ausencia de efectos adversos debidos al tratamiento. Tampoco se observó la aparición de anticuerpos neutralizantes a una dosis de 2×10^9 pfu, ni mRNA derivado del vector, ni proteína CFTR 10 días después de la administración (RG Crystal, 1994).

PM. Joseph y colaboradores han reportado el ensayo clínico de transferencia de *CFTR* por adenovirus con el mayor número de pacientes, que ascendió a 36 (PM Joseph, 2001). El virus fue administrado por broncoscopia o nebulización. Los autores concluyeron que la administración del virus fue tolerada pero la transferencia del cDNA de *CFTR* fue ineficiente y la expresión del transgén transitoria. En un estudio en el que se utilizaron 3 dosis de adenovirus-*CFTR* a intervalos de tres meses en los bronquios de pacientes con FQ, los niveles de mRNA se vieron reducidos tras la segunda dosis e indetectables tras la tercera, lo que demostró que administraciones sucesivas de un adenovirus limita su aplicabilidad para terapia génica (BG Harvey, 1999).

En el caso de los adenovirus, la transferencia del gen *CFTR* sigue siendo ineficiente a menos que ocurra daño epitelial. Esta observación se explica por la ausencia del receptor adenovírico CAR en la superficie apical de las células epiteliales humanas. Se ha identificado el coreceptor $\alpha_v\beta_5$ para el adenovirus pero también se localiza en la membrana basolateral de la células epiteliales respiratorias humanas (MJ Goldman y JM Wilson, 1995). Con el fin de incrementar la eficiencia de transfección de los vectores adenovirales *in vivo*, LG. Gregory y colaboradores evaluaron el efecto del caprato sódico aplicado al pulmón de ratón. Cuando el adenovirus de complejó con DEAE dextrano, la expresión de β -Gal se incrementó en 45 veces si previamente se administró caprato sódico (LG Gregory, 2003). Queda por determinar si el caprato sódico puede ser utilizado en humanos ya que cabe la posibilidad de invasión sistémica de las bacterias que colonizan los pacientes con FQ.

AAV: Los virus adenoasociados (AAV) han acaparado bastante interés ya que no se han asociado a patologías humanas y presentan elevada expresión del transgén. Varios ensayos se han llevado a cabo en el epitelio nasal, sinus y lóbulos pulmonares en pacientes con FQ.

El primer ensayo clínico con virus adenoasociados se llevó a cabo en 1998 por JA. Wagner y colaboradores (JA Wagner, 1998). Los resultados de este protocolo con 10 pacientes demostraron una respuesta dosis dependiente de acumulación de DNA del vector en el epitelio de los sinus, pero ausencia de transcritos derivados del mismo. Cabe destacar la casi ausencia de reacciones inmunológicas. Cuatro años más tarde, JA. Wagner y

colaboradores llevaron a cabo de nuevo un ensayo de fase II con 23 pacientes FQ a los que transfirieron un AAV2 en los sinus maxilares. Sus conclusiones fueron que la administración fue bien tolerada sin observarse efectos respiratorios adversos graves (JA Wagner, 2002).

ML. Aitken y colaboradores trataron a 12 pacientes FQ con un AAV2 mediante nebulización. En algunos de los pacientes se observaron efectos adversos graves como taquicardia. Los investigadores constataron la infección de las vías respiratorias pero no detectaron mRNA de *CFTR* derivado del vector (ML Aitken, 2001).

En otro ensayo clínico con 25 pacientes afectados de FQ, TR. Flotte y colaboradores administraron un AAV2 por vía intranasal y endobronquial (al lóbulo inferior del pulmón). Se observaron efectos adversos pero debidos a la técnica de administración y únicamente en un único paciente se pensó en el vector como posible causa de estos efectos. A pesar de detectarse muy pocas copias de DNA viral, los resultados del estudio demostraron la seguridad del protocolo en un rango amplio de dosis víricas (TR Flotte, 2003).

El protocolo clínico más reciente con AAV ha involucrado a 42 pacientes con FQ de ocho centros en Estados-Unidos. RB. Moss y colaboradores han reportado la administración repetida de AAV2-*CFTR* mediante aerosol (RB Moss, 2004). Los investigadores utilizaron 3 dosis de vector a intervalos de un mes y todos los pacientes generaron anticuerpos neutralizantes de AAV2. Se demostró la transferencia génica pero no la expresión del gen *CFTR*. De todas maneras, algunos pacientes que recibieron AAV2-*CFTR* mostraron una mejora en la FEV₁ a los 30 días (medida de espirometría que sirve para evaluar la eficacia del tratamiento. FEV₁: volumen de fuerza expiratoria en 1 segundo) comparado con el grupo control que recibió placebo. La conclusión del protocolo es que dosis repetidas de AAV2 en forma de aerosol son seguras y están bien toleradas por los pacientes.

Tanto en modelos murinos como en animales de mayor tamaño (conejo, oveja y primates no humanos) los resultados obtenidos con virus adenoasociados han sido prometedores. Se han ensayado varios serotipos y el consenso general es que la eficiencia de transferencia génica en el epitelio respiratorio siga este orden: AAV5>AAV6/AAV1>AAV2>AAV3>AAV4 (RA Driskell y JF Engelhardt, 2003). Se desconoce cual es el serotipo más adecuado para transferir el gen *CFTR* al epitelio pulmonar humano y quizás la respuesta requiera ensayos clínicos dirigidos a comparar la eficacia de estos serotipos.

Lentivirus y otros retrovirus: Hasta la fecha no se ha descrito ningún protocolo clínico con lentivirus u otro tipo de retrovirus para la FQ.

La baja transfección del epitelio pulmonar humano junto con la dificultad de una administración repetida al producirse reacciones inmunitarias continúan siendo los principales obstáculos para introducir la terapia génica viral en la práctica clínica.

10.4.4.2. Ensayos clínicos: vectores no virales

Debido a las reacciones inmunitarias observadas con los vectores virales, se han probado los vectores no virales como alternativa al presentar menor inmunogenicidad. En 1995 tuvo lugar el primer ensayo clínico con este tipo de vectores (NJ Caplen, 1995). En concreto, NJ. Caplen y colaboradores administraron por vía nasal liposomas que contenían el gen *CFTR* y el protocolo involucró a 15 pacientes, 9 de ellos recibieron el plásmido con el liposoma y 6 de ellos el liposoma únicamente. Se pudo restaurar en un 20% el potencial nasal en respuesta a cloruros a los 3 días pero el efecto se desvaneció al cabo de una semana. En la mayoría de los individuos tratados se detectó RNA derivado del plásmido administrado.

Los estudios clínicos con vectores no virales han demostrado que la transferencia génica de *CFTR* a la vías respiratorias es segura pero ineficiente y transitoria (J Zabner, 1997), (DJ Porteous, 1997), (MR Knowles, 1998).

A pesar de la aparente reducción de toxicidad de los complejos liposoma/DNA comparado con los adenovirus, una investigación reciente donde participaron 8 pacientes con FQ puso de manifiesto que la administración por aerosol de complejos liposoma/DNA al pulmón produjo reacciones adversas en 4 de estos 8 pacientes como fiebres y mialgias asociadas al incremento de expresión de interleuquina 6 (IL-6). Los efectos adversos fueron el resultado de los dinucleótidos CpG no metilados del plásmido bacteriano utilizado (FE Ruiz, 2001).

La terapia génica ha utilizado desde sus inicios una estrategia de adición génica en la que un gen no funcional es reemplazado por adición de una copia salvaje del gen para restablecer la función proteica ausente. Conceptualmente, esta aproximación es sencilla pero siguen existiendo barreras que impiden su éxito:

1. la copia salvaje del gen suele ser grande con muchos exones y regiones reguladoras haciendo que la construcción del vector de transfección sea complicada o incluso imposible.
2. el vector de transfección es generalmente un virus y la respuesta inmunológica de los organismos con la producción de anticuerpos impide una segunda administración.
3. la expresión del gen está regulada y es dependiente de contexto génico en muchos casos por lo que es muy difícil controlar expresión y función adecuadas.
4. es complicado administrar suficiente virus a las células que necesitan de la expresión del gen para obtener un beneficio terapéutico.

Otras estrategias se han dirigido hacia la corrección *in situ* de mutaciones.

A continuación se describen una serie de técnicas cuyo objetivo es la corrección o reparación génica tanto a nivel de DNA como de RNA.

10.5. Terapia génica: estrategias de reparación génica dirigida

10.5.1. Reparación génica a nivel de DNA

10.5.1.1. Quimeroplastia

La quimeroplastia es una técnica de corrección génica a nivel de DNA que se basa en la utilización de oligonucléotidos híbridos o quiméricos de RNA/DNA, llamados quimeroplastos. Fue descrita en 1996 por K. Yoon y colaboradores en el laboratorio de Eric B. Kmiec quien acuñó el término quimeroplastia (K Yoon, 1996). El objetivo de estas moléculas híbridas es activar los mecanismos de reparación intrínsecos de las células transfectadas, para corregir *in situ* mutaciones puntuales, deleciones o inserciones de un nucleótido en el DNA genómico. La idea de diseñar quimeroplastos surgió a raíz de la investigación de H. Kotani y colaboradores cuyos resultados sugirieron que un oligonucléotido con secuencia de RNA y DNA se unía más eficientemente al DNA genómico diana que un oligonucléotido compuesto únicamente por DNA (H Kotani y EB Kmiec, 1994). El diseño original de un quimeroplasto consta de 68 nucleótidos con una estructura muy característica (ver Figura 3): una cadena de 25 nucleótidos de DNA se une a la cadena complementaria híbrida compuesta por 2 regiones de 10 oligoribonucleótidos 2'-O-metil modificados cada una (en rojo) que flanquean 5 nucleótidos de DNA (en azul) en los que se localiza el nucleótido mutador (M) en una posición central. En ambas cadenas complementarias se encuentra una región con 5 nucleótidos G y C y la estructura en "hairpin" del quimeroplasto viene determinada por la presencia de 4 timidinas en cada extremo de las cadenas.

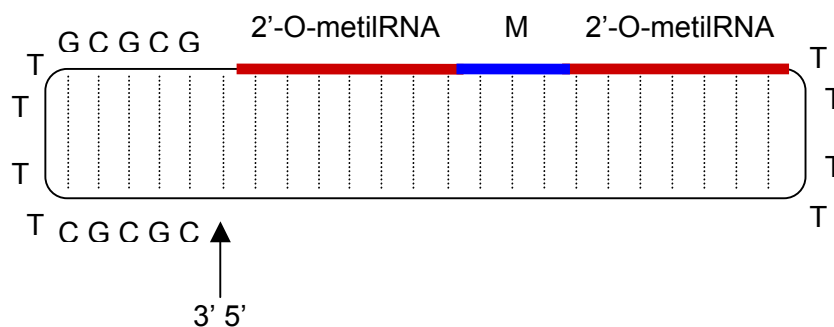


Figura 3. Estructura de un quimeroplasto de 68 nucleótidos

(Leyenda: G: guanina, C: citosina; T: timina; M: nucleótido mutador)

La modificación química 2'-O-metil confiere resistencia al RNA frente a la RNAsaH. La presencia de RNA aumenta la afinidad y tiempo de unión a la región diana del DNA genómico.

Los "hairpins" de T previenen la concatamerización del quimeroplasto y evitan su integración en el genoma. El nucleótido mutador (M) promueve el desaparejamiento de bases o

“mismatch” entre el quimeraplasto y el nucleótido diana susceptible de ser modificado. Este “mismatch” activa los mecanismos de reparación celular. Los nucleótidos G y C conforman lo que se denomina un “GC clamp” y sirven para dar estabilidad a la estructura del quimeraplasto. La flecha simboliza un enlace fosfodiéster no ligado del quimeraplasto lo que le permite adaptarse a la topología del DNA diana.

El mecanismo de acción de los quimeraplastos se ha sugerido en dos etapas (unión del quimeraplasto al DNA diana y corrección del nucleótido mutado) con la participación del sistema de reparación MMR (siglas de “Mismatch Repair”) y otras proteínas de recombinación homóloga para mediar la conversión génica (ver Figuras 4 y 5).

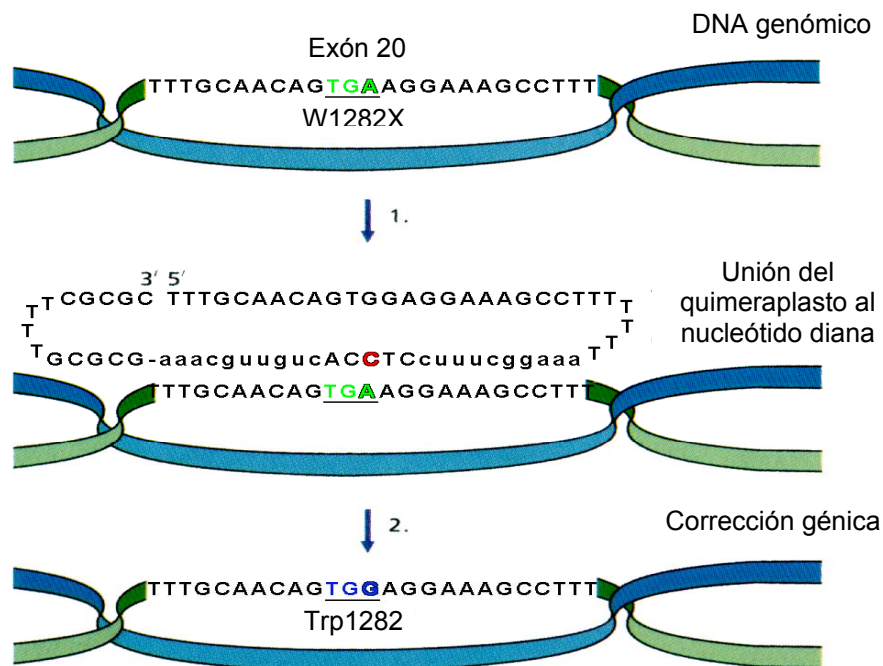


Figura 4. Mecanismo propuesto para la corrección de la mutación W1282X en el exón 20 del gen *CFTR*

La mutación W1282X en las células IB3.1 (F508del/W1282X) viene determinada por la presencia de una Adenina (en verde en el DNA genómico) en la tercera posición del codón dando lugar a un codón Stop en lugar del codón TGG que codifica para el aminoácido Triptófano. El nucleótido mutador C (en rojo en el quimeraplasto) provoca el “mismatch” que es reconocido por los mecanismos de reparación y recombinación de la célula que escinden la adenina. Una DNA polimerasa utiliza el nucleótido mutador como molde para colocar la base complementaria (en este caso una Guanina (G)) recuperándose entonces la secuencia normal. De esta manera se consigue revertir la mutación al genotipo salvaje TGG.

Esquema adaptado de M. Strauss 1998 (M Strauss, 1998).

Se ha descrito la composición de proteínas del sistema de reparación MMR y se ha sugerido su participación en la reparación de mutaciones puntuales, pequeñas deleciones e inserciones (ver Figura 5).

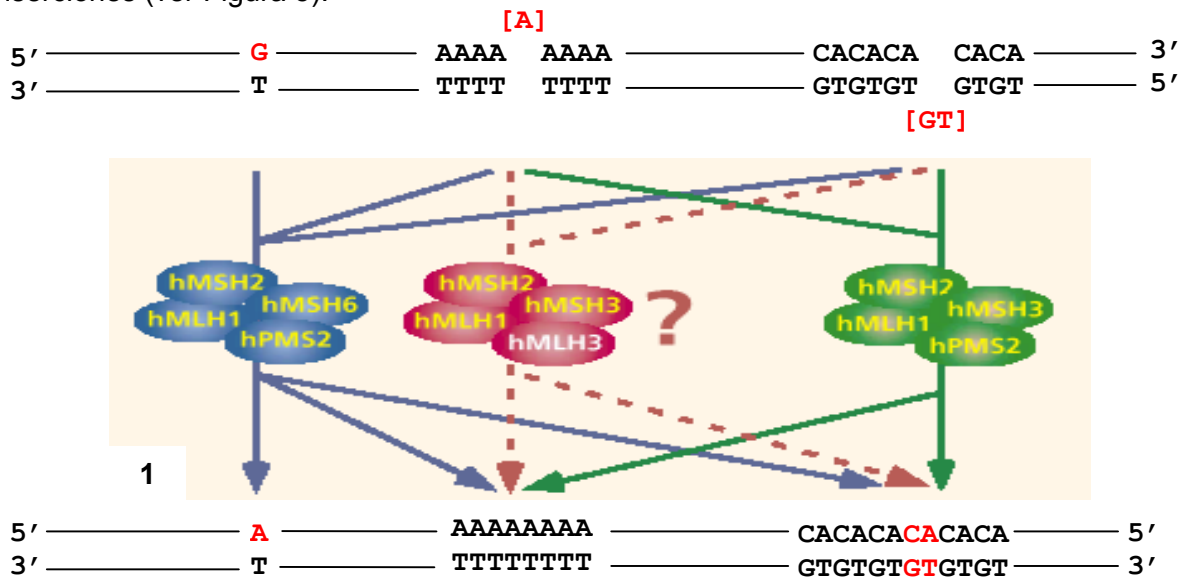


Figura 5. Modelo de reparación "mismatch" (MMR)

El sistema MMR en humanos está formado por el tetrámero proteico MSH2, MLH1, MSH6 y PMS2 e interviene en la reparación de "mismatch", de inserciones y deleciones.

Esquema adaptado de J. Jiricny 2000 (J Jiricny, 2000).

10.5.1.1.1. Quimeroplastia en células bacterianas y eucariotas

A. Cole-Strauss y colaboradores diseñaron un ensayo en *E. coli* para evaluar si extractos proteicos de células eucariotas eran capaces de corregir una mutación puntual en el gen de resistencia a kanamicina contenido en un plásmido y en presencia de un quimeroplasto generado para corregir esa mutación (explicado con más detalles en el apartado "14. Ensayo *in vitro* para evaluar la competencia reparadora de las células IB3.1 y otras líneas celulares") (A Cole-Strauss, 1999). Uno de los resultados fue que extractos proteicos de células LoVo que carecen de la expresión de la proteína MSH2 humana fueron menos efectivos en la corrección de la mutación puntual que extractos proteicos de células HUH-7 (hepatoma humano). Además, la adición de anticuerpos anti-MSH2h a una mezcla conteniendo quimeroplasto, plásmido y extracto celular de HUH-7, redujo la actividad reparadora de los extractos proteicos sugiriendo la participación de MSH2 en los procesos de corrección génica mediada por quimeroplastos. Sin embargo, MSH2 no parece intervenir en los procesos de reparación donde participan oligonucleótidos monocadena (M Dekker, 2003).

Varios estudios han indicado que el grupo de 14 nucleótidos formado por los 2 "GC clamps" más el "hairpin" de timinas deben abrir el quimeroplasto para formar una región monocadena

que une RecA (homólogo bacteriano de RAD51 de levadura y mamífero) e inicia la homología con la región diana del genoma. Además, la región central de 5 nucleótidos de DNA fue necesaria para una eficiente unión del quimeraplasto con el DNA genómico (PA Havre y EB Kmiec, 1998). HB. Gamper y colaboradores han explicado el posible mecanismo por el cual actuarían los quimeraplastos tras evaluar la relación entre el diseño del quimeraplasto y su actividad (HB Gamper, Jr., 2000). Se estudiaron 20 estructuras de quimeraplasto y sus eficiencias respectivas de corrección de una mutación puntual en el gen de resistencia a kanamicina contenido en el plásmido pK^sm4021. Los resultados obtenidos indicaron que:

1. la cadena de DNA es la que media la reparación génica donde el nucleótido mutador es utilizado como molde para introducir el cambio nucleotídico deseado y que la cadena quimérica de RNA y DNA aumenta la frecuencia de conversión génica al facilitar la formación de un heterodúplex con el DNA diana.
2. la localización del "GC clamp" y del enlace fosfodiéster no ligado del quimeraplasto no alteran la frecuencia de corrección génica.
3. cuanto mayor es la longitud de la región de homología con el DNA diana, superior es la frecuencia de corrección génica.
4. la proteína RecA (homólogo bacteriano de RAD51 de levadura y mamífero) cataliza el intercambio de cadenas del quimeraplasto y del DNA diana.

HB. Gamper y colaboradores han propuesto el siguiente esquema para explicar como se produce la conversión génica por quimeraplastos (ver Figura 6).

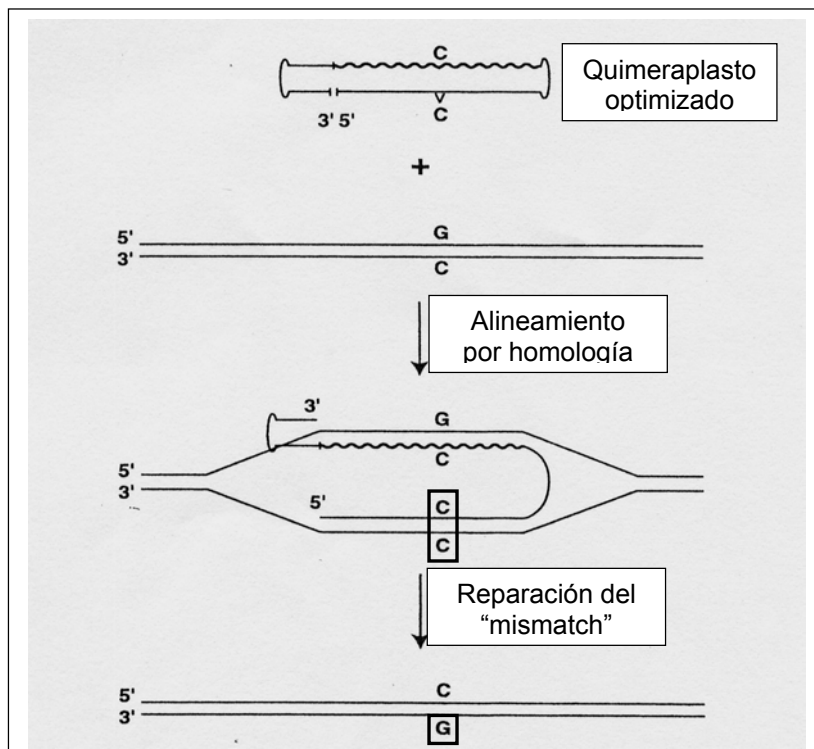


Figura 6: Formación de una estructura génica estable entre el quimeraplasto y el DNA diana.

Leyenda: la línea ondulada del quimeraplasto corresponde a la cadena de RNA mientras que en la cadena complementaria de DNA, el triángulo con la C (citosina) representa el nucleótido mutador que produce un “mismatch” con la C del DNA diana (rectángulo negro). Este desaparejamiento es reparado con la colocación del nucleótido complementario al nucleótido mutador, en este caso una G (guanina) (cuadrado negro).

Esquema adaptado de HB. Gamper y colaboradores 2000 (HB Gamper, Jr., 2000).

La transfección con quimeraplastos se puede realizar con lípidos catiónicos o polímeros catiónicos como la PEI (polímero catiónico llamado polietilenimina). El complejo formado por un quimeraplasto y un lípido catiónico se denomina lipoplejo mientras que un poliplejo está formado por un quimeraplasto y un polímero catiónico.

La Lipofectina fue el lípido catiónico utilizado para transfectar un quimeraplasto en el primer estudio en 1996, para corregir mediante quimeraplastia una mutación puntual en el gen *ALP* humano (fosfatasa alcalina) contenido en un plásmido episomal. K. Yoon y colaboradores transfectaron células de ovario de Hámster (CHO) con un quimeraplasto de 68 nucleótidos (nt) (diseño original) y obtuvieron un 30% de corrección génica. La reversión del genotipo y del fenotipo mutado a salvaje se evidenció por secuenciación y por la detección de actividad fosfatasa alcalina además de observarse una tinción positiva en ensayos de citoquímica (K Yoon, 1996). A esta publicación le siguió otra también en 1996 y del mismo grupo donde se describió la corrección de una mutación puntual en el gen de la β -globina cromosómica responsable de la anemia falciforme en células B linfoblastoides homocigotas para esta mutación tras la transfección de un quimeraplasto de 68nt mediante un liposoma comercial. El porcentaje de corrección del 50% se demostró mediante secuenciación automática, Southern-Blot y RFLP (fragmentos de restricción de longitud polimórfica). Justamente, la corrección del nucleótido mutado provocó la pérdida de una diana de restricción lo que permitió diferenciar por tamaño el alelo corregido del alelo mutado (A Cole-Strauss, 1996).

En 1997, Y. Xiang y colaboradores utilizaron de nuevo el gen de la β -globina como diana pero en vez de corregir una mutación puntual, la crearon en este gen tras la transfección de un quimeraplasto de 68nt en células hematopoyéticas humanas CD34⁺ mediante DOTAP (Y Xiang, 1997). Su objetivo fue demostrar que la modificación génica era posible en este tipo de células. La frecuencia de conversión génica resultó ser del 5 al 11% según los análisis de RFLP y secuenciación automática. Sin embargo, cuando el quimeraplasto estuvo compuesto únicamente por oligonucleótidos de DNA no se detectó modificación génica. Cinco años más tarde, H. Liu y colaboradores realizaron experimentos para mutar el gen de la β -globina en

células CD34⁺ de nuevo y en células Lin⁻CD38⁻ (células madre todavía más primitivas que las CD34⁺) mediante el mismo quimeraplasto pero administrado por microinyección (H Liu, 2002). La progenie derivada de ambos tipos celulares microinyectados mantuvo la modificación nucleotídica hasta 4 semanas en cultivo según el estudio de su mRNA.

BT. Kren y colaboradores quisieron retomar las investigaciones del primer estudio de K. Yoon con el gen *ALP* (fosfatasa alcalina) episomal y mostrar que se podía generar una mutación en este gen esta vez en forma cromosómica en las células HUH7 (hepatoma humano) (BT Kren, 1997). Para ello transfectaron un quimeraplasto de 68nt mediante PEI para producir un cambio nucleotídico en este gen. La frecuencia de conversión génica fue del 10,7% pero teniendo en cuenta el porcentaje de transfección del 25% resultó ser finalmente del 43%.

En 1998, se demostró que la quimeroplastia funciona *in vivo* en modelos animales. BT. Kren y colaboradores introdujeron una mutación puntual en el gen *F9* (factor IX de la coagulación) causante de la hemofilia B en la rata tras la inyección de un quimeraplasto en la vena de la cola complejo con PEI unida a lactosa (PEI-lactosilada). El porcentaje de corrección de los hepatocitos fue del 40% después de la administración de dos dosis de quimeraplasto (BT Kren, 1998).

P. Bandyopadhyay y colaboradores han reportado que se puede introducir una mutación “missense” en el gen *F9* (factor IX de la coagulación) con un 48% de eficiencia en los hepatocitos de rata (P Bandyopadhyay, 1999). Los autores diseñaron un quimeraplasto de 68nt y lo introdujeron complejo con PEI-lactosilada en la vena de la cola de ratas. Ensayos de coagulación demostraron el cambio fenotípico en las ratas al detectarse una reducción en un 45% de la actividad coagulante del factor IX que además se mantuvo hasta 46 semanas.

El objetivo de otro estudio fue revertir el fenotipo de hiperbilirubinemia en ratas Gunn (modelo de la enfermedad de Crigler-Najjar) (BT Kren, 1999). Las dianas celulares fueron nuevamente los hepatocitos, el gen *ugt1a1* de los cuales se encuentra mutado por un cambio nucleotídico puntual. BT. Kren y colaboradores inyectaron 5 dosis de un quimeraplasto de 74nt complejo con PEI en la vena de la cola de estas ratas en cinco días consecutivos. La frecuencia de corrección génica en muestras de hígado de las ratas incluso a los 6 meses postinyección fue del 20%. Se constató el cambio fenotípico al reducirse los niveles de bilirrubina en el suero de los animales tratados.

V. Alexeev y K. Yoon corrigieron una mutación puntual en el gen *tyr* (tirosinasa) en melanocitos albinos de ratón (melan-c) con un quimeraplasto de 68 nt y demostraron que la reparación génica fue heredable y permanente en clones aislados de células al mantenerse su pigmentación producida por la síntesis de melanina a lo largo de 15 pases celulares (V Alexeev y K Yoon, 1998). En una investigación posterior, utilizaron de nuevo el mismo

quimeraplasto complejo con Citofectina en ratones albinos BALB/c (V Alexeev, 2000). Las administraciones tópica e intradérmica conllevaron a la aparición de pelos negros en 50% de los animales tratados en áreas localizadas de la piel. La corrección génica se mantuvo hasta 3 meses como lo demostraron los análisis de DNA y RFLP de biopsias de piel.

Se ha evaluado la efectividad de un quimeraplasto para revertir mutaciones puntuales en el gen *dmd* (distrofina) en ratones *mdx* y en perros *mdx*, siendo ambos animales buenos modelos de la distrofia muscular de Duchenne. TA. Rando y colaboradores inyectaron un quimeraplasto de 78nt únicamente con PBS directamente en el músculo tibialis de ratones *mdx* con una mutación puntual en el exón 23 del gen *dmd* (TA Rando, 2000). Estudios inmunohistoquímicos con anticuerpos específicos de distrofina sirvieron para determinar la presencia de proteína salvaje en fibras musculares alrededor del punto de inyección. Dos semanas después de la administración del quimeraplasto, el máximo número de fibras distrofina positivas representó el 1-2% de todas las fibras en el músculo. Este porcentaje se mantuvo hasta 10 semanas indicando que la corrección de la mutación puntual fue estable. En un estudio posterior, C. Bertoni y TA. Rando demostraron que se podía revertir el fenotipo de distrofia en células precursoras de músculo de ratón utilizando exactamente el mismo quimeraplasto que en la investigación previa pero vehiculizado por Lipofectamina (C Bertoni y TA Rando, 2002). Análisis cuantitativos de distintos cultivos celulares mostraron que entre el 2-15% de las células expresaron distrofina. Cuando se extrajeron células precursoras derivadas de los cuádriceps tratados *in vivo* por inyección de quimeraplasto con PBS, los autores constataron la reparación génica en estas células. Los mismos investigadores utilizaron otra estrategia con un quimeraplasto de 68nt al crear una mutación en el intrón 22 del gen *dmd* (distrofina) de mioblastos de ratón *mdx* que promoviera "splicing" alternativo conllevando la pérdida del exón 23 mutado. De esta manera, la transfección del quimeraplasto con Lipofectamina generó una proteína Dmd 71 aminoácidos más corta que la salvaje al mantenerse la pauta de lectura del gen *dmd* (C Bertoni, 2003).

RB. Bartlett y colaboradores han tratado perros *mdx* Golden retriever con un quimeraplasto de 74nt inyectado directamente en el músculo tibialis de los mismos (RJ Bartlett, 2000). Los análisis de RT-PCR cuantitativa de biopsias de músculo indicaron que el 10% de mRNA producido en los músculos tratados había sido corregido. Anticuerpos específicos de distrofina determinaron la presencia de proteína salvaje. La reversión de la mutación puntual se confirmó por secuenciación automática de DNA genómico y se constató que permaneció hasta 48 semanas post-tratamiento. Sin embargo, los autores no hacen ninguna referencia acerca de la mejora en la debilidad muscular inicial de los perros tratados.

El mayor porcentaje de corrección génica mediada por quimeraplastos se obtuvo en células CHO y fue del 60% tras la aplicación de una segunda dosis de quimeraplasto a células tratadas previamente (AD Tagalakis, 2001). AD. Tagalakis y colaboradores trataron células

CHO que expresaban de manera estable la proteína ApoE2, una isoforma de la apolipoproteína, con un quimeraplasto de 68nt complejo con PEI (poliplejo). El gen *APOE2* es responsable de hiperlipidemia tipo III y aterosclerosis. El objetivo del estudio fue convertir la isoforma ApoE2 en ApoE3 en las células CHO, en ratones que sobreexpresaban *APOE2* humana y en linfocitos homocigotos $\epsilon 2/\epsilon 2$ extraídos de pacientes. La primera administración del quimeraplasto a las células CHO produjo una frecuencia de conversión del 37% que pasó a ser del 60% al aplicar una segunda dosis. DNA extraído de hígados fue analizado 7 días tras la inyección intraperitoneal del mismo poliplejo en ratones y se constató que el 25% de la isoforma ApoE2 se había convertido en ApoE3. En los linfocitos tratados con el poliplejo se observó una frecuencia de modificación génica del 34%. Sin embargo, A. Manzano y colaboradores (los mismos autores) intentaron sin éxito dos años más tarde convertir mediante un quimeraplasto el gen *APOA1* salvaje en sus dos variantes naturales ApoA1_{Milano} (AIM) y ApoA1_{Paris} (AIP) que están asociadas a una función cardioprotectora (A Manzano, 2003). Se transfectaron células HepG2 (hepatoblastoma) y CHO-AI con PEI y un quimeraplasto de 68nt diseñado para generar las dos variantes del gen *APOA1*. Únicamente se detectó un 5% de conversión en el caso de las células CHO-AI para la variante AIP pero los resultados no fueron reproducibles ni siquiera al volver a aplicar otro estoc del mismo quimeraplasto, tras modificar el diseño del quimeraplasto (52nt, 60nt, 76nt y 80nt) y optimizar el vector de transfección (otra PEI y Lipofectamina). Los investigadores han apuntado que los estocs de quimeraplastos tienen características variables y que la calidad de los mismos es un factor a tener en cuenta para evaluar la eficiencia de conversión génica por quimeraplastos.

W. Fan y K. Yoon inyectaron por vía intradérmica un oligonucleótido monocadena de 69 bases con 4 uridinas 2'-O-metil modificadas en cada extremo y un quimeraplasto de 68nt complejados con Lipofectamina en la piel de ratones recién nacidos C57Bl/6 para generar la mutación R94P en el gen *K17* (queratina 17), que se encuentra mutado en pacientes con una afectación de los folículos pilosos (W Fan y K Yoon, 2003). El examen histológico de biopsias de piel de estos ratones a los 8 días postinyección, puso de manifiesto cambios morfológicos de los folículos pilosos como la pérdida de su orientación uniforme en la piel y las puntas curvadas. La frecuencia de modificación génica fue inferior al 3% de acuerdo con los análisis de RFLP del DNA genómico aislado de cortes de folículos pilosos. La administración de un oligonucleótido y un quimeraplasto controles no resultó en ningún cambio genético ni fenotípico.

Los extractos proteicos de mitocondrias contienen los factores necesarios para mediar la corrección génica de mutaciones puntuales con un quimeraplasto *in vitro* (Z Chen, 2001). En un ensayo con *E. coli*, Z. Chen y colaboradores demostraron que extractos proteicos de mitocondrias aisladas de hígado de rata (tanto de hepatocitos quiescentes como

regenerativos tras hepatectomía) fueron capaces de corregir una mutación puntual en el gen de resistencia a tetraciclina y a kanamicina contenidos en plásmidos distintos (pT^sm153 y pK^sm66 respectivamente). La frecuencia de reparación fue similar a la obtenida con extractos proteicos nucleares. La presencia de la proteína MSH2 en ambos extractos se comprobó gracias a un anticuerpo específico.

En la Tabla 1 se muestran algunas aplicaciones de la quimeroplastia.

Gen diana	Modelo de estudio	% de conversión génica	Diseño del quimeraplasto ^(a)	Referencia
<i>ALP</i> (fosfatasa alcalina) (episomal)	Células CHO	30%	68nt (10-5-10)	(K Yoon, 1996)
<i>F9</i> (hemofilia B)	Hígado de rata	40%	68nt (10-5-10)	(BT Kren, 1998)
<i>UGT1A1</i> (Crigler-Najjar)	Hígado de rata	20%	76nt (10-9-10)	(BT Kren, 1999)
Apolipoproteína E (aterosclerosis)	Células CHO	37% (o 60% *)	68nt (10-5-10)	(AD Tagalakis, 2001)
	Linfocitos humanos $\epsilon 2/\epsilon 2$	35%		
	Hígado de ratón	25%		
<i>Dmd</i> (distrofia muscular de Duchenne)	Músculo de ratón	20%	78nt (12-6-12)	(TA Rando, 2000)
	Músculo de perro	10%	74nt (10-5-13)	(RJ Bartlett, 2000)
β -globina (Anemia falciforme)	Células B linfoblastoides	50%	68nt (10-5-10)	(A Cole-Strauss, 1996)

Tabla 1. Ejemplos de la utilización de la quimeroplastia en modelos celulares y animales

(a) Longitud total del quimeraplasto y su composición en número de nucleótidos de la cadena quimérica (RNA-DNA-RNA).

* porcentaje que se obtiene al volver a tratar las células con el mismo quimeraplasto.

Hasta la publicación de D. de Semir y colaboradores, no se había aplicado la quimeroplastia a células de epitelio respiratorio de fibrosis quística (D de Semir, 2003).

10.5.1.1.2. Quimeroplastia en plantas

Los quimeraplastos han sido utilizados para introducir cambios nucleotídicos (tanto corrección como generación de mutaciones) en dianas episomales y cromosómicas en

células humanas y de mamífero y también en animales pero su aplicabilidad no ha quedado restringida a estos modelos sino que la modificación nucleotídica se ha llevado a cabo incluso en plantas. Esta manipulación génica abre la posibilidad de crear nuevas características en las plantas sin la necesidad de tener que introducir un transgén. La mejora genética de cosechas comerciales se puede considerar con los quimeroplastos.

Los primeros estudios en plantas se publicaron simultáneamente en 1999 (PR Beetham, 1999), (T Zhu, 1999). PR. Beetham y colaboradores introdujeron una mutación puntual en el gen *SuRA* (acetolactato sintasa) gracias a un quimeroplasto de 68nt mediante biolística (bombardeo de micropartículas) en células Nt-1 de la planta del tabaco (*Nicotiana tabacum*). Esta mutación confirió resistencia a las células frente al herbicida clorsulfurón. Tras la selección en medio selectivo de las células resistentes, los análisis de DNA confirmaron la presencia del cambio nucleotídico generado. A. Kochevenko y L. Willmitzer también utilizaron el gen *ALS* (acetolactato sintasa) como diana para crear en su caso plantas de tabaco resistentes a clorsulfurón. La electroporación de quimeroplastos de 68nt en protoplastos generó callos resistentes, la modificación génica de los cuales se mantuvo a lo largo del tiempo, y posteriormente a plantas insensibles al herbicida. La germinación de sus semillas dio lugar a plantas y dos tercios de las mismas fueron resistentes lo que indica que la transmisión del carácter resistente fue estable y heredable (A Kochevenko y L Willmitzer, 2003). Un quimeroplasto con únicamente oligonucleótidos de DNA tuvo una eficiencia menor que otro quimérico con RNA. En este estudio, los autores utilizaron dos quimeroplastos en experimentos independientes para crear una mutación puntual en distintas posiciones del gen *ALS* y observaron que los dos oligonucleótidos quiméricos fueron igual de eficientes en la generación de las mutaciones puntuales en contradicción con los datos obtenidos en la investigaciones de A. Manzano y colaboradores (A Manzano, 2003) en la que únicamente generaron una de las variantes del gen *APOAI*.

Con el gen *ALS* como diana se ha obtenido arroz resistente a los herbicidas clorsulfurón y bispiribac-sodio. A. Okuzaki y K. Toriyama microbombardearon 3 quimeroplastos diferentes de 68nt cada uno a callos de *Oryza sativa* (arroz). El objetivo fue crear mutaciones puntuales en distintas posiciones del gen *ALS* que confirieran resistencia a herbicidas diferentes (A Okuzaki y K Toriyama, 2003). La eficiencia de los quimeroplastos fue del orden de 10^{-4} . La introducción de uno de los quimeroplastos generó el cambio nucleotídico esperado en la posición 171 del gen *ALS*. Los dos oligonucleótidos híbridos restantes se administraron simultáneamente a los callos para crear dos mutaciones a la vez, en las posiciones 548 y 627. Esta investigación es la primera en la que se han utilizado dos quimeroplastos simultáneamente para generar dos mutaciones en el mismo gen. Se conoce que la doble mutación confiere más resistencia al herbicida bispiribac-sodio que la mutación única en la posición 548. Tras la introducción de ambos quimeroplastos se obtuvieron

plantas resistentes al bispiribac-sodio pero los análisis de DNA extraído de las hojas evidenciaron que tan sólo se había producido la mutación en la posición 548 del gen *ALS*.

Esta observación está en concordancia con los resultados descritos por A. Manzano y colaboradores aunque estos autores no administraron los quimeroplastos al mismo tiempo para convertir el gen *APOAI* (A Manzano, 2003).

En 1999, T. Zhu y colaboradores también generaron células de maíz resistentes a las herbicidas clorsulfurón y imidazolinona al crear una mutación puntual con un quimeroplasto de 68nt en el gen *AHAS* (acetohidroxiácido sintasa) contenido en un plásmido (T Zhu, 1999). De hecho, los autores introdujeron un cambio nucleotídico en dos posiciones distintas en plásmidos independientes mediante biolística. Los autores expresaron establemente una construcción con el gen *EGFP* mutado para revertir el fenotipo con un quimeroplasto de 68nt. Las células tratadas generaron callos y plantas fluorescentes. Células extraídas de estas plantas dieron lugar a nuevos ejemplares fluorescentes por lo que la modificación de la mutación puntual se mantuvo en varias generaciones. Las frecuencias de conversión génica fueron de 10^{-4} en el caso del gen *AHAS* y de 10^{-3} para el gen *EGFP*, entre 1-3 órdenes de magnitud más que la frecuencia reportada en experimentos de recombinación homóloga en plantas. Cabe resaltar que tanto en ciertos callos resistentes como en células de plantas fluorescentes se había introducido otro nucleótido en vez del esperado en la posición predicha. Este hecho también se había detectado en el estudio de PR. Beetham y colaboradores (PR Beetham, 1999). Es posible que la variedad en las mutaciones puntuales introducidas sea fruto de la baja fidelidad de los mecanismos de reparación "mismatch" en las plantas en comparación con las células de mamífero y/o que la presión selectiva del herbicida haya aumentado la frecuencia de mutaciones espontáneas. En este sentido, estudios de MC. Rice y colaboradores con extractos proteicos de plantas y el ensayo con el plásmido pK^sm4021 (ver "14. Ensayo *in vitro* para evaluar la competencia reparadora de las células IB3.1 y otras líneas celulares") han confirmado la peculiaridad de los fenómenos de conversión génica en plantas (MC Rice, 2000). Los extractos proteicos de la banana y del maíz fueron capaces de corregir de una manera precisa la mutación en el gen de resistencia a kanamicina al introducir el cambio nucleotídico esperado con una frecuencia semejante. Sin embargo, los extractos de la planta del tabaco también corrigieron la mutación pero con menos precisión. La secuenciación automática de colonias de *E.coli* resistentes a kanamicina reveló que el nucleótido introducido no siempre fue el mismo.

EB. Kmiec y colaboradores han utilizado de nuevo el plásmido pK^sm4021 y el plásmido pT^sΔ208 (contiene una delección de un nucleótido que inactiva el gen de resistencia a tetraciclina), junto con quimeroplastos y oligonucleótidos monocadena correctores de las mutaciones puntuales y extractos proteicos de cloroplasto de *Arabidopsis*, para demostrar que los cloroplastos contienen los factores necesarios para inducir la corrección génica de

mutaciones puntuales *in vitro* (EB Kmiec, 2001). El número de colonias de *E. coli* resistentes tanto a tetraciclina como a kanamicina fue mayor después de los ensayos *in vitro* con los oligonucleótidos monocadena de 25-28nt (con 3 enlaces fosforotioato) que con los quimeroplastos de 68nt. Los investigadores constataron que la frecuencia de corrección génica de la mutación puntual en el gen de resistencia a kanamicina fue mayor que la obtenida para la reparación de la delección en el gen de resistencia a tetraciclina.

T. Zhu y colaboradores retomaron de nuevo su investigación previa y usaron otra vez el mismo quimeroplasto para generar esta vez la planta del maíz resistente al herbicida imidazolinona (T Zhu, 2000).

10.5.1.2. Small Fragment Homologous Replacement (SFHR)

Inicialmente descrita por K. Kunzelmann y colaboradores en 1996 en el laboratorio de Dieter C. Gruenert, esta estrategia se basa en la utilización de fragmentos de DNA obtenidos mediante PCR convencional (generalmente entre 400 a 800pb) para modificar secuencias génicas específicas. A diferencia de la quimeroplastia, la técnica de SFHR (siglas de “Small Fragment Homologous Replacement”) permite abordar un rango más amplio de mutaciones y no únicamente las mutaciones puntuales. Aunque se desconoce el mecanismo por el cual actúan estos fragmentos de DNA, parece intervenir un proceso similar al de la recombinación homóloga además de mecanismos de reparación todavía no caracterizados (ver Figura 7).

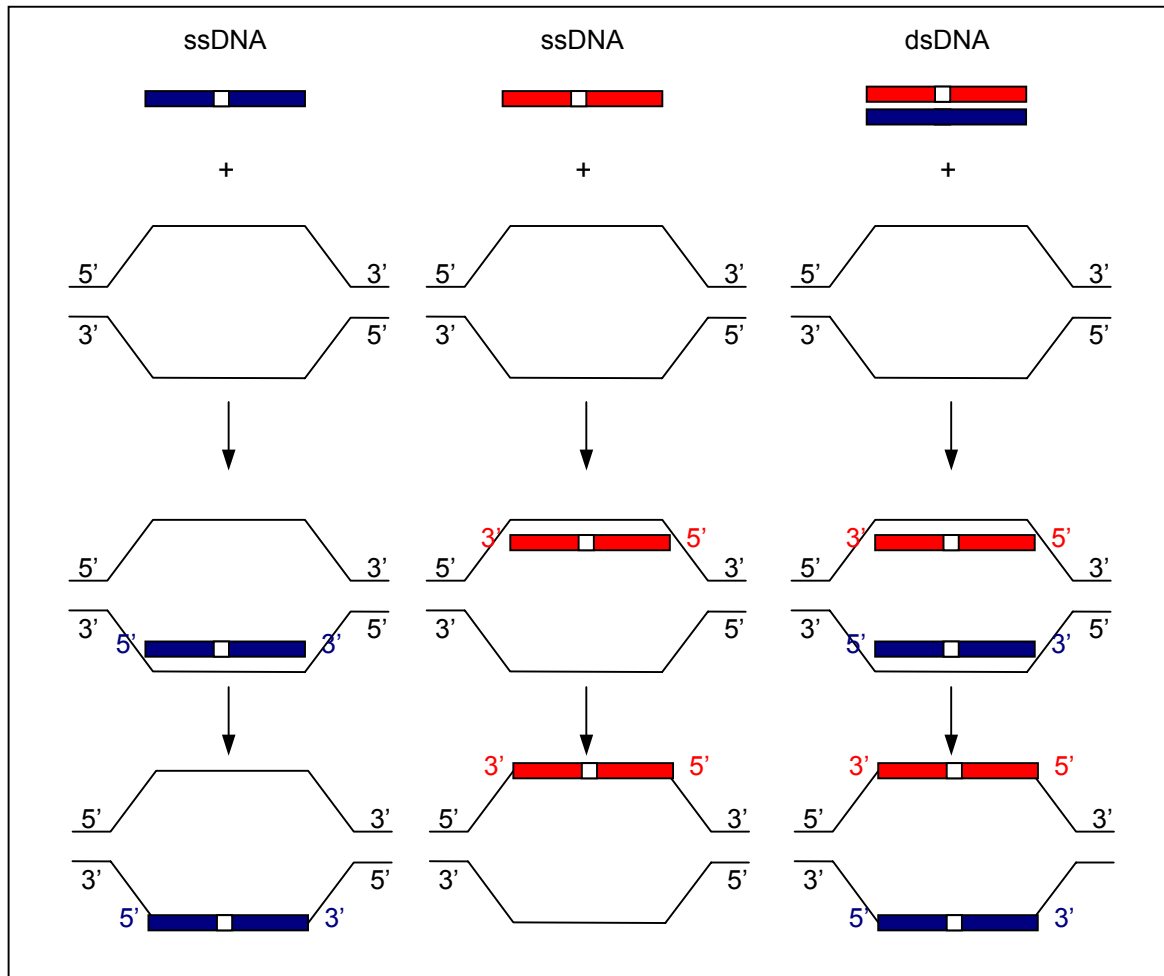


Figura 7. Representación esquemática de diferentes configuraciones de fragmentos de DNA en la modificación de un gen diana por SFHR

Leyenda: ssDNA: DNA monocadena; dsDNA: DNA doble cadena.

En cada fragmento el cuadrado blanco representa el/los cambio/s nucleotídico/s que se pretende generar en el gen diana. Los fragmentos se pueden introducir en las células como cadena sencilla o doble cadena y se unen tanto a la cadena transcrita, como no transcrita, o a las dos cadenas del gen diana.

Los mecanismos enzimáticos involucrados no se han elucidado todavía pero parecen intervenir tanto la recombinación homóloga como otros procesos de corrección génica.

Esquema adaptado de DC. Gruenert y colaboradores 2003 (DC Gruenert, 2003).

K. Kunzelmann y colaboradores utilizaron un fragmento de PCR de 491pb para corregir la mutación F508del del gen *CFTR* presente en homocigosis en varios tipos celulares transformados con SV40 (K Kunzelmann, 1996). Los fragmentos correctores fueron microinyectados, electroporados o transfectados mediante dendrímeros o liposomas. Los análisis de "Southern-blot" y de "patch-clamp" sugirieron que aproximadamente un 1% de las células tratadas recobraron el transporte de cloruros.

Los mismos autores quisieron demostrar que la técnica de SFHR también servía para introducir mutaciones en células epiteliales transformadas y no transformadas (KK Goncz, 1998). Para ello, generaron un fragmento de 488pb que introdujo la mutación F508del en el gen *CFTR* además de una diana de restricción a 100nt de distancia de la mutación en células normales epiteliales tanto transformadas (por SV40) como no transformadas. Tras la transfección del fragmento mutador con Lipofectamina, la conversión génica y la nueva diana de restricción se mantuvieron durante al menos 21 generaciones celulares en cultivo, evidenciado por digestión con enzima de restricción y análisis de RT-PCR de las células F508del tratadas. La nueva diana de restricción, además de indicar la introducción del fragmento, pone de manifiesto que no se requiere el 100% de homología entre el fragmento mutador o corrector y el gen diana para que tenga lugar SFHR.

F. Sangiuolo y colaboradores han estudiado los parámetros que pueden tener influencia en la introducción de fragmentos SFHR, como la relación de cargas positivas y negativas de un complejo lípido catiónico-fragmento SFHR y el tiempo de incubación del complejo en las células tratadas (F Sangiuolo, 2002). Las transfecciones de los complejos con diferentes cocientes de carga se realizaron mediante el lípido catiónico GenePORTER y se utilizaron los mismos fragmentos de 488pb y 491 que en el estudio de KK. Goncz y colaboradores. Los resultados de las transfecciones en dos líneas celulares epiteliales revelaron que las relaciones de carga óptimas para obtener la mayor frecuencia de conversión génica del gen *CFTR* fueron distintas. Esta observación indicó que los cocientes óptimos entre las cargas de DNA y las del lípido catiónico son dependientes del tipo celular transfectado. En lo concerniente a los tiempos de incubación de los complejos, se extrajo el DNA genómico de las células a las 24h, 48h, 72h, 96h y 120h post-transfección. El grado de conversión génica fue mayor en muestras analizadas a las 24h post-transfección para un tipo celular y a las 48h para la otra línea celular.

Los mismos autores utilizaron los fragmentos marcados con partículas de oro para evaluar mediante microscopía electrónica de transmisión la vía de entrada de los complejos en ambas líneas celulares. Sus conclusiones fueron que los complejos entraron en la célula por diferentes vías en función del cociente de cargas. Así, los lipoplejos más negativos penetraron por fusión con la membrana plasmática mientras que los complejos más positivos lo hicieron por vía endocítica no mediada por receptor.

E. Bruscia y colaboradores intentaron aislar clones de células epiteliales con el gen *CFTR* corregido (E Bruscia, 2002). Tras transfectar células homocigotas F508del con el lípido catiónico GenePORTER y fragmentos de 491pb de DNA salvaje de *CFTR*, los investigadores analizaron 30 clones por dilución límite, de los cuales dos presentaron mRNA salvaje y mRNA F508del, y uno únicamente mRNA salvaje. La corrección génica se mantuvo durante 150 generaciones celulares.

La metodología SFHR se ha aplicado también *in vivo* a un modelo murino. Los resultados obtenidos *in vitro* en el laboratorio de DC. Gruenert dieron lugar a un ensayo de SFHR en un ratón salvaje al que se introdujo la mutación F508del en el gen *cftr* en células del pulmón (KK Goncz, 2001). KK. Goncz y colaboradores administraron fragmentos de 783pb con distintos vectores no víricos por vía intratraqueal con el objetivo de introducir la delección de 3pb (F508del) además de una diana de restricción. A los 3 días de la instilación intratraqueal se analizaron los pulmones, el corazón, la tráquea y el hígado de los ratones tratados. La expresión de mRNA F508del fue detectada por RT-PCR en muestras de pulmón únicamente. 6 de los 13 ratones tratados (46%) presentaron esta modificación génica (3 de 3 con el vector fosfolipídico AVE, 2 de 3 con Lipofectamina, 1 de 2 con DDAB (bromuro de amonio dimetil-dioctadecil) y ninguno de 5 con el dendrímero Superfect).

La técnica de SFHR no se ha testado únicamente para la modificación del fenotipo de fibrosis quística sino también para otras patologías como la distrofia muscular de Duchenne y a la anemia falciforme. Para determinar si la técnica de SFHR se podría utilizar en terapia *ex vivo* de la anemia falciforme, KK. Goncz y colaboradores, utilizando un fragmento de 559pb, introdujeron una mutación puntual y una nueva diana de restricción en el gen de la β -globina endógena en células K562 (células eritroleucémicas humanas) por electroporación y en células madre hematopoyéticas CD34⁺/CD38⁻ por microinyección (KK Goncz, 2002). En ambos casos se detectó la introducción de los dos cambios nucleotídicos en el mRNA. A pesar de que no se pudo establecer el porcentaje de conversión génica, los autores sí observaron que células K562 expuestas a 2 millones de fragmentos mostraron más conversión del gen de la β -globina que las células tratadas con 1 millón de fragmentos sugiriendo que la modificación génica mediada por SFHR fue un proceso dosis-dependiente. En lo que concierne la distrofia muscular de Duchenne, R. Kapsa y colaboradores han corregido una mutación puntual en el gen *dmd* en mioblastos murinos en cultivo y músculo de ratón *mdx* con un fragmento de 603pb (R Kapsa, 2001). La transfección se realizó con Lipofectamina en el caso de los mioblastos y con Lipofectina para el músculo. Las frecuencias de corrección fueron del 15-20% en mioblastos en cultivo, que se mantuvo hasta 28 días, e inferior al 0,1% en fibras musculares extraídas del músculo a los 21 días. Los investigadores también observaron que dos transfecciones seguidas en mioblastos cultivados aumentaron la eficiencia de reparación. El efecto dosis-dependiente de SFHR ya había sido descrito por KK. Goncz y colaboradores Sin embargo, únicamente se pudo constatar corrección génica mediante PCR-RFLP y densitometría a nivel de DNA. Los autores no detectaron mRNA corregido ni la expresión de proteína distrofina.

10.5.1.3. Oligonucleótidos

RP. Moerschell y colaboradores aportaron en 1988 las primeras evidencias de que oligonucleótidos de DNA eran capaces de alterar nucleótidos en la levadura (RP Moerschell, 1988). De hecho, los investigadores mutagenizaron el gen del citocromo c con oligonucleótidos de un tamaño de hasta 20 bases. Unos años más tarde el mismo grupo demostró que los oligonucleótidos frente a la cadena 5'-3' generaban 20 veces más levaduras transformantes que los oligonucleótidos dirigidos contra la cadena complementaria (T Yamamoto, 1992).

En un intento de simplificar el diseño de oligonucleótidos y de elucidar los componentes activos de un quimeraplasto, HB. Gamper y colaboradores estudiaron por separado la cadena quimérica del quimeraplasto y la cadena de DNA (HB Gamper, 2000) y constataron que esta última cadena es la que induce la reparación génica mientras que la cadena quimérica serviría para estabilizar la molécula junto a la secuencia de DNA diana.

El mecanismo por el cual actuarían estos oligonucleótidos queda reflejado en la Figura 8.

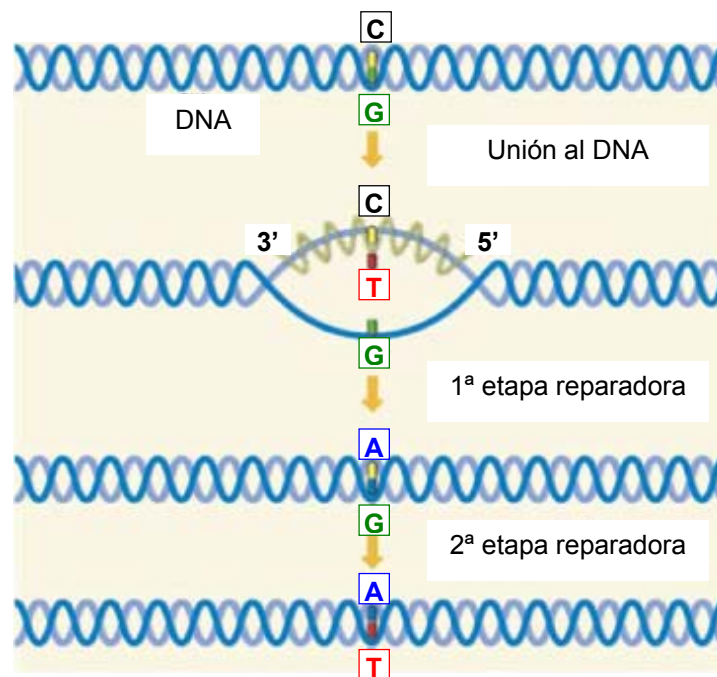


Figura 8. Alteración nucleotídica mediante un oligonucleótido modificado.

El oligonucleótido (representado por la molécula helicoidal en verde) busca la complementariedad con el DNA diana y se alinea por homología. Tras la hibridación se crea el "mismatch" que es reparado en dos etapas por los sistemas de reparación del DNA resultando en la conversión del par C-G a A-T.

Esquema adaptado de AJ. van Brabant y colaboradores 2004 (AJ van Brabant, 2004).

Según los datos obtenidos por HB. Gamper y colaboradores, muchos investigadores se han decantado por la utilización de oligonucleótidos monocadena en lugar de los quimeroplastos para reparar mutaciones.

O. Igoucheva y colaboradores han demostrado que oligonucleótidos de 25 hasta 61 bases con 4 uracilos 2'-O-metil modificados en ambos extremos fueron capaces de corregir una mutación puntual en el gen *gfb* (β -galactosidasa) en extractos nucleares, en forma episomal y cromosómica en células de mamífero con unas frecuencias de corrección del 0,05%, 1% y 0,1% respectivamente (O Igoucheva, 2001). Los oligonucleótidos con una homología de 45 bases mostraron la frecuencia de conversión más elevada y los que iban dirigidos a la cadena no transcrita fueron 1000 veces más efectivos que los dirigidos contra la cadena transcrita sugiriendo un efecto de la transcripción en la corrección génica. Comparando oligonucleótidos de RNA *versus* DNA, los autores observaron que los desoxioligonucleótidos exhibieron mayor frecuencia de reparación que los ribonucleótidos con la misma secuencia. Mediante la utilización de oligonucleótidos se ha conseguido modificar por primera vez dos genes endógenos al mismo tiempo en una misma línea celular (V Alexeev, 2002).

V. Alexeev y colaboradores corrigieron una mutación puntual en el gen *tyr* (tirosinasa) (en el cromosoma 7) y generaron una mutación puntual en el gen *c-kit* (tirosina quinasa en el cromosoma 5) en melanocitos de ratón albino con oligonucleótidos de 45 bases de homología con la región diana pero con los extremos 5' y 3' protegidos por 4 uracilos 2'-O-metil modificados cada uno. La transfección se realizó con un vector no viral (dendrímero Superfect) y las frecuencias de conversión oscilaron entre 2×10^{-4} a 1×10^{-3} , que de hecho fueron comparables a las obtenidas con quimeroplastos en un estudio previo (V Alexeev y K Yoon, 2000). Sin embargo, los experimentos llevados a cabo con estos oligonucleótidos fueron más reproducibles que con los quimeroplastos. S. Agarwal y colaboradores han conseguido insertar dos mutaciones puntuales a la vez en un mismo gen y con un único oligonucleótido tanto *in vitro* como *in vivo* (S Agarwal, 2003) y han evaluado además el efecto de la posición del nucleótido mutador en la secuencia del oligonucleótido corrector. Los autores utilizaron extractos proteicos celulares, el plásmido pK^sm4021 que contiene una mutación puntual en el gen de resistencia a kanamicina para los experimentos con bacterias y el plásmido pAURHygeGFP con una mutación puntual en el gen de resistencia a higromicina que se encuentra fusionado al gen *EGFP* de la proteína verde para los experimentos con levadura. Para los ensayos *in vitro*, se diseñaron oligonucleótidos de 25 bases con el nucleótido mutador en distintas posiciones en la secuencia, en el centro o desplazado hacia el extremo 5'. En todos los oligonucleótidos ambos extremos contenían 3 enlaces fosforotioato para evitar su degradación. Los investigadores observaron que la frecuencia de conversión génica de la mutación puntual en el gen de resistencia a kanamicina disminuía conforme el nucleótido mutador se alejaba de la posición central en el

oligonucleótido. Para demostrar que se podían introducir dos cambios nucleotídicos a la vez se diseñó un oligonucleótido con dos nucleótidos mutadores separados por 3 bases, el primero para corregir la mutación puntual (kanamicina) y el segundo para generar una mutación que cambiara la secuencia pero manteniéndose el mismo aminoácido codificado. El número de colonias resistentes a kanamicina fue comparable tanto si se utilizaba el oligonucleótido con un único nucleótido mutador como con dos pero en el segundo caso todas las colonias presentaron el segundo cambio nucleotídico. Para investigar la corrección génica mediada por dos nucleótidos mutadores separados por una distancia de bases mayor se probó un oligonucleótido de 70 bases en el que esos dos nucleótidos se encontraban a una distancia de 21 bases. Se obtuvieron los mismos resultados que con el oligonucleótido de 25 bases en el que los nucleótidos mutadores se encontraban a 3 bases de distancia. Sin embargo, en los experimentos con levadura en los que se utilizaron nuevamente oligonucleótidos con dos nucleótidos mutadores, la distancia entre ellos sí tuvo un efecto en la frecuencia de conversión génica. Cuanto más cercanos están esos dos nucleótidos en la secuencia del oligonucleótido corrector más probabilidad hay de que se produzcan los dos cambios nucleotídicos deseados. Además, los autores observaron que los oligonucleótidos dirigidos contra la cadena diana no transcrita fueron más eficientes que los dirigidos contra la cadena transcrita. Este hecho ya se había observado anteriormente también en levadura donde se constató la influencia de la transcripción en los procesos de reparación génica mediada por oligonucleótidos (L Liu, 2002b).

Los oligonucleótidos también se han utilizado para modificar el genoma de células madre de ratón *msh2*^{-/-}, proteína del sistema de reparación MMR (M Dekker, 2003). M. Dekker y colaboradores han reparado en estas células mediante oligonucleótidos el gen de resistencia a neomicina inactivado por la inserción de los nucleótidos GT. Cabe destacar que después de la transfección de los oligonucleótidos correctores, las células resistentes a G-418 fueron únicamente las deficientes en Msh2 y no las células salvajes indicando que la expresión de Msh2 supone una barrera en la reparación génica. La variación en la longitud del oligonucleótido no tuvo ningún efecto sobre la frecuencia de corrección génica en estas células. En vez de promover la delección de GT, otra manera de reparar el gen *neo* fue mediante la inserción por un oligonucleótido de una Adenina entre los nucleótidos G y T. En otro estudio también con células madre de ratón, EA. Pierce y colaboradores corrigieron copias integradas de los genes *EGFP* y *LacZ* con oligonucleótidos de 53 bases aunque con una frecuencia de 10^{-4} (EA Pierce, 2003).

Al igual que en el caso de los quimeroplastos, también se ha demostrado que extractos proteicos de mitocondrias son capaces de mediar la reparación génica con oligonucleótidos (BT Kren, 2003). En un ensayo *in vitro* libre de células, con extractos proteicos de mitocondrias aisladas de hígado de rata, plásmidos con mutaciones puntuales en los genes

neo y *glb* (β -galactosidasa) y oligonucleótidos diseñados para revertir esas mutaciones, BT. Kren y colaboradores demostraron que las mitocondrias tienen las moléculas necesarias para inducir cambios nucleotídicos.

Los oligonucleótidos han mostrado su efectividad en animales. IL. Lu y colaboradores transfectaron oligonucleótidos de 25 y 35 bases con tres enlaces internucleotídicos fosforotioato en cada extremo para corregir una mutación puntual en el gen de la α -D-glucosidasa responsable de la enfermedad de Pompe (relacionada con el mal almacenamiento del glicógeno) en fibroblastos de la piel de pacientes y generaron una mutación sin sentido en el mismo gen en los hepatocitos de ratones tras inyectar por la vena de la cola un oligonucleótido de 35 bases unido al ligando del receptor de asialoglicoproteína (IL Lu, 2003). En los experimentos con los fibroblastos, la frecuencia de corrección génica osciló entre 0,5% hasta 4% y fue dependiente de la longitud del oligonucleótido siendo mayor para el de 35 bases. Reacciones de PCR de muestras de hígado de los ratones tratados revelaron que se había introducido la mutación sin sentido esperada.

W. Fan y K. Yoon modificaron el gen de la queratina 17 de queratinocitos de ratones C57Bl/6 al inyectarles intradérmicamente un oligonucleótido y un quimeraplasto para generar una mutación puntual (W Fan y K Yoon, 2003) (para más detalles ver "10.5.1.1. Quimeroplastia").

En un estudio muy reciente, AJ. van Brabant y colaboradores han puesto a punto un sistema de direccionamiento génico dual en levadura en el que dos oligonucleótidos han sido diseñados para modificar dos nucleótidos en la misma célula (AJ van Brabant, 2004).

S. cerevisiae contiene el gen de resistencia a higromicina con una mutación puntual que lo inactiva en su genoma y además un cromosoma artificial de levadura (YAC) con el gen de interés. Los autores han demostrado que la introducción del segundo oligonucleótido de 70 bases aumenta diez veces la frecuencia de modificación del gen contenido en el YAC (en este caso, el de la β -globina humana) tras haber aplicado el primer oligonucleótido de 74 bases frente al gen de resistencia. Los investigadores sugieren que quizás el hecho de administrar varios oligonucleótidos en distintos momentos favorezca la actuación sinérgica de los mismos en la activación de los mecanismos de reparación génica celulares. La expresión del gen *RAD51* contenido en un plásmido episomal incrementó la frecuencia de corrección del gen de resistencia a higromicina. Los autores indican que esta técnica podría ser útil para la construcción de colecciones de células cuyos genomas difieran únicamente en un nucleótido.

Muy recientemente, EE. Brachman y EB. Kmiec han evidenciado que la replicación del DNA, además de la transcripción tiene influencia en los procesos de reparación génica en células de mamífero (EE Brachman y EB Kmiec, 2004). Se ha utilizado un plásmido con el origen de replicación de SV40 y se le ha insertado en varias orientaciones el gen *EGFP* con una

mutación puntual que lo inactiva. La replicación es bidireccional y una de las dos cadenas se replica antes que la otra cuya replicación va más retrasada. Los autores electroporaron en células COS-1 (de riñón de primate) las distintas construcciones plasmídicas además de los oligonucleótidos respectivos de 72 bases para corregir la mutación puntual. La frecuencia más elevada de reparación fue cercana al 4% y se dio cuando la cadena que se replica más lentamente es la cadena del gen *EGFP* que no se transcribe.

Finalmente, los oligonucleótidos han sido utilizados en ensayos *in vitro* con bacterias junto con extractos proteicos de cloroplastos para corregir una deleción en el gen de resistencia a tetraciclina y una mutación puntual en el gen de resistencia a kanamicina contenidos en plásmidos distintos (EB Kmiec, 2001).

10.5.1.4. Triplex Forming Oligonucleotides (TFO)

Los oligonucleótidos que forman triple hélice con secuencias específicas de DNA, llamados TFO (siglas de “Triplex Forming Oligonucleotides”), tienen la capacidad de unirse con especificidad y afinidad a regiones ricas en purinas de una de las cadenas del DNA o a pirimidinas de la otra cadena, en el surco mayor de la doble hélice del DNA. La habilidad de los ácidos nucleicos para formar triples hélices fue descubierta por G. Felsenfeld y A. Rich en 1957 (G Felsenfeld y A Rich, 1957). El primer ejemplo de la utilización de una tercera cadena con un objetivo funcional fue en 1968 por AR. Morgan y RD. Wells cuando describieron la inhibición de la transcripción por parte de una tercera cadena de RNA (AR Morgan y RD Wells, 1968).

Esta especificidad ha hecho que estos oligonucleótidos, de una longitud típica de 10 a 30 nucleótidos, hayan sido también utilizados para modificar el genoma con el objetivo final de corregir mutaciones en células humanas. Varios estudios han demostrado que el tratamiento de células con TFO provoca la reparación del DNA y la recombinación. La prueba en 1987 (HE Moser y PB Dervan, 1987) de que oligonucleótidos sintéticos formaban estructuras en triplex sugirió que se podían desarrollar como moléculas para introducir cambios de secuencia en los genes. Las purinas (G y A) de los TFO se unen al DNA a través de puentes de hidrógeno del tipo Hoogsteen y de manera antiparalela (ver Figura 9). Las pirimidinas (C y T) se unen con el mismo tipo de enlace pero de manera paralela. Las G del TFO se unen a las G del par G:C del DNA y la A a la A del par A:T. Sin embargo, la T del TFO se une a la A del par A:T del DNA y la C, siempre y cuando esté protonada, se une a la G del par G:C (ver Figura 9).

El mecanismo por el cual actúan estos oligonucleótidos es mediante la estimulación de la recombinación. En el caso de TFO no conjugados a ningún mutágeno se ha descrito que el incremento de recombinación se pierde en células humanas deficientes en XPA, factor clave en el sistema de reparación de nucleótidos por escisión (NER) pero su efecto se puede

restaurar por la expresión del cDNA del gen *XPA* en estas células. En los TFO conjugados con psoraleno, un mutágeno que se intercala y se une covalentemente al DNA cuando se activa por luz ultravioleta, la inducción de recombinación se ve parcialmente disminuida en células deficientes en *XPA* sugiriendo que los TFO conjugados se procesan de forma tanto dependiente como independiente de la vía NER (AF Faruqi, 2000).

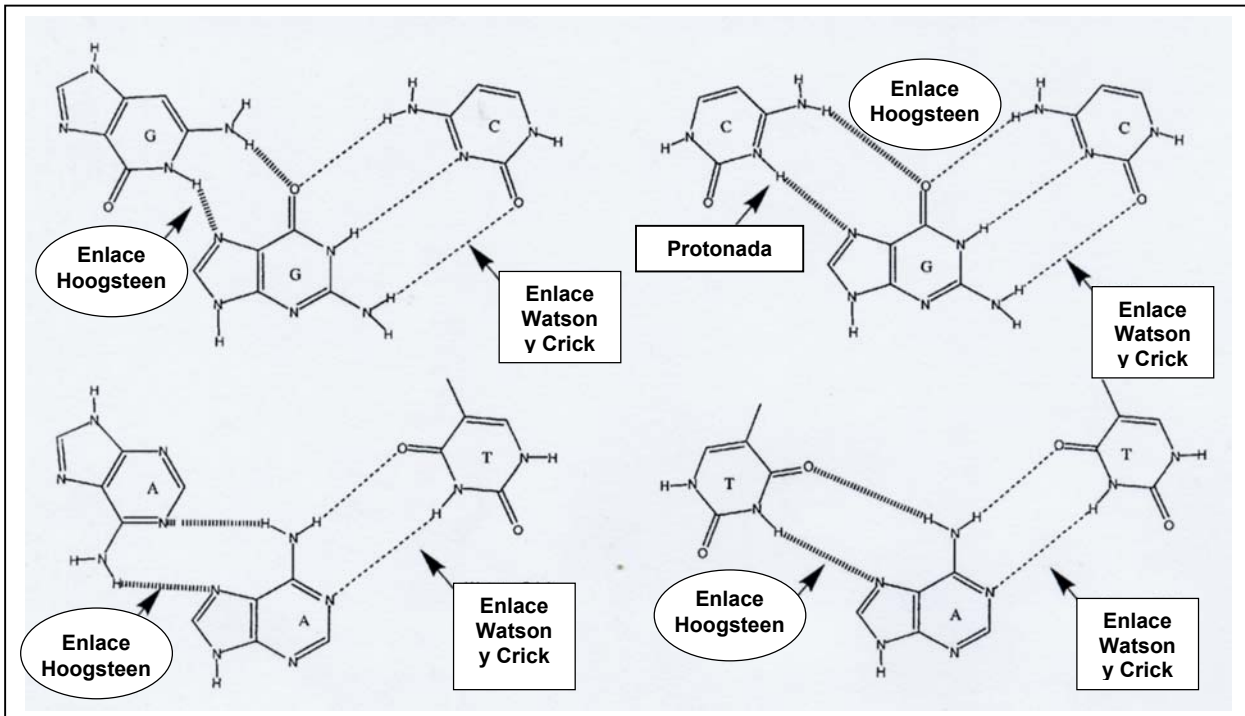


Figura 9. Formación de la triple hélice para purinas y pirimidinas.

Leyenda: G: guanina, C: citosina ; A: adenina ; T: timina.

Esquema adaptado de MP. Knauert y PM. Glazer 2001 (MP Knauert y PM Glazer, 2001).

A. Majumdar y colaboradores dirigieron un TFO conjugado con psoraleno contra el gen *hprt* (hipoxantina fosforibosil transferasa) en células ováricas de Hamster chino (CHO) y recuperaron clones deficientes en *hprt* ("knockout") tras la introducción del TFO mediante electroporación y la fotoactivación con luz ultravioleta (UVA) (A Majumdar, 1998). El análisis de 282 clones indicó que el 85% tenía mutación en la región diana del gen *hprt*. Este estudio demostró que se podía modificar un locus cromosómico mediante un TFO.

KM. Vasquez y colaboradores consiguieron mutagenizar el gen reportero λ *SupFG1* en ratones transgénicos C57BL/6 que contenían múltiples copias cromosómicas integradas de este gen, tras la administración intraperitoneal de un TFO sin conjugar (KM Vasquez, 2000). Aunque la frecuencia de mutación fue baja, los ratones tratados con el TFO diana durante cinco días consecutivos mostraron una frecuencia de mutación cinco veces superior a la de los ratones tratados con un TFO irrelevante. Diez días después de las inyecciones, los ratones fueron sacrificados y se recogieron muestras de tejidos para el análisis de mutación.

La piel, el colon, los pulmones, el riñón, el hígado y el intestino evidenciaron una frecuencia de mutación superior a los correspondientes tejidos de los ratones control. No se observó mutagénesis en el cerebro quizás por el hecho de que los oligonucleótidos no atraviesan bien la barrera hematoencefálica tras una administración intraperitoneal. Para demostrar que la mutagénesis del TFO era específica y no debida a reacciones inespecíficas utilizaron el mismo TFO pero frente al gen *lacI* control. Los animales tratados con el TFO diana y el TFO irrelevante no mostraron inducción de mutagénesis en este gen. Esta investigación establece que se puede mediar el direccionamiento genético con un TFO *in vivo*.

Una de las limitaciones que presentan los TFO es que sólo se unen a regiones de purinas y pirimidinas lo que reduce las posibilidades de direccionamiento genético. Tras la observación de que los TFO provocan reparación de DNA y estimulan recombinación, se ha desarrollado una estrategia de conversión génica que utiliza un TFO unido a un fragmento reparador. Estos oligonucleótidos se denominan entonces bifuncionales (ver Figura 10).

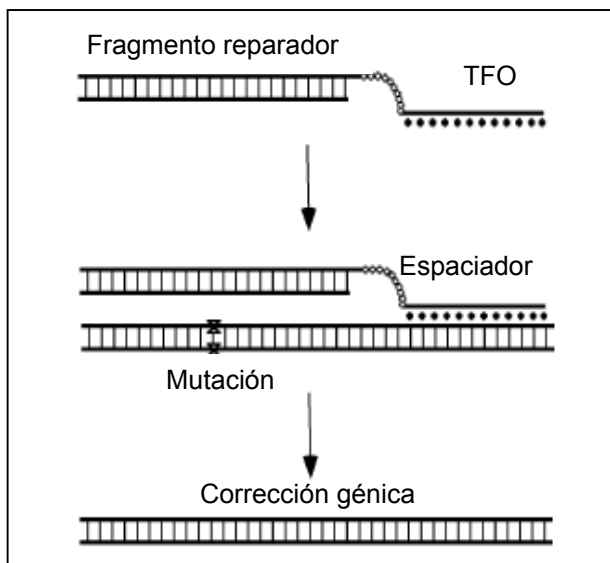


Figura 10. Conversión génica mediada por el fragmento reparador de un TFO

El fragmento reparador es homólogo al DNA diana excepto para el nucleótido que se debe corregir (mutación puntual). El espaciador permite que el TFO no tenga que unirse directamente o inmediatamente adyacente a la mutación. Esquema adaptado de PP. Chan 1999 (PP Chan, 1999).

KW. Culver y colaboradores han corregido mutaciones puntuales en los genes *ADA* y *p53* con una frecuencia de corrección del 1-2% y 7,5% respectivamente mediante oligonucleótidos monocadena constituidos por un dominio reparador que forma el heterodúplex con el DNA y un dominio formador de triplex que se une mediante enlaces de tipo Hoogsteen (KW Culver, 1999). Ambos dominios están separados por un espaciador de 3 nucleótidos.

En lo que concierne la FQ, hasta el momento no se ha descrito ningún estudio acerca de la reparación de mutaciones en el gen *CFTR* por los TFO.

Cabe destacar que el tratamiento con los TFO puede producir mutagénesis no deseada con una frecuencia superior a la de la mutagénesis espontánea. En el estudio de A. Majumdar y

colaboradores (A Majumdar, 1998), se detectaron inserciones, deleciones y sustituciones nucleotídicas no deseadas en el gen *Hprt* diana en 85% de los 282 clones analizados. Los autores atribuyeron estos hechos a la mala reparación de la rotura de las dos cadenas de DNA promovidas por el psoraleno. En la investigación de KM. Vasquez y colaboradores también se produjo mutagénesis al detectarse inserciones y deleciones en la región triplex diana a pesar de no utilizar TFO conjugados con psoraleno (KM Vasquez, 2000). De hecho, las regiones ricas en purinas y pirimidinas necesarias para que el TFO lleve a cabo la conversión génica esperada, son zonas génicas con más frecuencia de mutación durante la replicación. El tratamiento con un TFO incrementaría esta frecuencia de mutación en estas regiones.

Los TFO requieren de 10 a 30 nucleótidos de purinas o pirimidinas para la formación del triplex lo que supone una limitación para su aplicación. Estas regiones aparecen cada kilobase en el genoma más o menos y es posible que la mayoría de los genes contengan una diana para TFO (JR Goni, 2004). Estas regiones se concentran en zonas reguladoras, específicamente en promotores lo que sugiere el potencial de los TFO en el control de la expresión génica. Para mejorar los TFO se ha propuesto la técnica de recombinación homóloga guiada (GOREC) que combina un TFO bifuncional y SFHR donde el TFO se utiliza para unir un fragmento de DNA de 800 bases (E Biet, 2001), (R Maurisse, 2002).

10.5.1.5. Virus adenoasociados (AAV)

Tal y como se ha descrito en el apartado “10.4.2. Terapia génica viral”, los virus se han utilizado en terapia génica de adición o reemplazo para transferir copias salvajes del gen *CFTR* tanto *in vitro* como *in vivo*, modelos en los que el gen *CFTR* endógeno está mutado. Ahora bien, también se han usado ciertos virus en reparación génica para corregir genes como es el caso de los virus AAV (siglas de “adeno-asociated virus”).

DW. Russell y RK. Hirata describieron en un artículo publicado en 1998 (DW Russell y RK Hirata, 1998) la utilización de vectores AAV para corregir el gen de la neomicina fosfotransferasa (*neo*) en células HeLa con copias integradas del gen *neo* que había sido previamente mutado mediante la inserción de 14pb en su secuencia por un AAV. La transducción de estas células con un AAV que contenía una inserción de 3pb devolvía el fenotipo resistente a G-418 a 0,1% de estas células (las dos mutaciones disrumpen el gen *neo* pero la recombinación homóloga entre los dos genes mutados devuelve la funcionalidad al gen *neo*). Los autores también mutagenizaron el gen *HPRT* en células humanas de fibrosarcoma y en fibroblastos humanos con la introducción de 4pb en su secuencia. La mutagénesis de este gen, al causar un cambio en la pauta de lectura, hizo que las células *Hprt*^{-/-} fueran resistentes a 6-tioguanina (utilizado como factor de selección). La mayor frecuencia de modificación génica fue del 1% y se obtuvo en los fibroblastos.

N. Inoue y colaboradores han corregido distintos tipos de mutaciones en el gen *neo* de resistencia a neomicina (inserciones de 1pb, 8pb o 14pb, delección de 1pb, sustitución de 3pb y una doble sustitución nucleotídica localizada a una distancia de 117pb) contenidas en construcciones retrovirales integradas en células de fibrosarcoma humano y fibroblastos humanos. Las células transducidas se pudieron seleccionar gracias al gen de resistencia a higromicina del vector retrovítico y las diferentes mutaciones en el gen *neo* se repararon mediante un AAV que contenía el gen *neo* salvaje (N Inoue, 1999).

En un trabajo similar, los mismos autores volvieron a utilizar los AAV para corregir mutaciones puntuales en el gen *ALP* (fosfatasa alcalina) y para introducir mutaciones en el gen *HPRT*. Fibroblastos humanos fueron transducidos nuevamente con construcciones retrovirales que contenían el gen *HPRT* en un plásmido. La introducción de mutaciones produjo la aparición de colonias resistentes a 6-tioguanina. En el caso de la fosfatasa alcalina, se transfectaron los mismos fibroblastos con retrovirus que contenían plásmidos con mutaciones puntuales en el gen *ALP*. La corrección se evidenció por la expresión de fosfatasa alcalina (N Inoue, 2001).

R. Hirata y colaboradores han utilizado los AAV para introducir con una frecuencia de inserción del 1%, fragmentos de hasta 1,5kb en loci cromosómicos determinados tanto en fibroblastos humanos normales como en transformados, en particular en el locus del gen *HPRT* y en el locus del gen *COL1A1* (colágeno tipo I) (R Hirata, 2002).

Una investigación muy reciente de X. Liu y colaboradores (X Liu, 2004) ha demostrado que la transducción con AAV recombinantes (AAVr) puede corregir una mutación puntual en el transgén *eGFP* en células HEK293 con una eficiencia máxima del 0,1% a los 5 días post-transducción (detección mediante citometría de flujo). La reparación génica se comprobó secuenciando el transgén después de producir una expansión clonal de células GFP positivas. Para mejorar la eficiencia de corrección génica los autores evaluaron la influencia de la fase del ciclo celular en la que se encontraban las células previamente a la transducción. Al detectar un aumento en la corrección génica (dos veces) en células en fase S del ciclo celular con respecto a otras fases del ciclo los investigadores concluyeron que esta fase S debe facilitar la reparación génica. Sin embargo, la transducción con AAV en el músculo tibialis de ratones transgénicos con el gen *eGFP* mutado no consiguió corregir la mutación.

La corrección del 0,1% en este sistema no selectivo con la proteína verde es un orden de magnitud inferior a la obtenida en sistemas selectivos que utilizan neomicina o HPRT ((N Inoue, 1999), (DW Russell y RK Hirata, 1998) pero semejante a la conseguida en sistemas no selectivos como la fosfatasa alcalina (N Inoue, 2001).

La utilización de AAV para introducir sustituciones de 1 nucleótido, inserciones o delecciones inferiores a 20pb e inserciones de hasta 1,5kb en loci cromosómicos concretos muestra el

potencial de esta técnica. Esta flexibilidad no es posible con el uso de oligonucleótidos, TFO, quimeraplastos o SFHR. Sin embargo, la utilización de los AAV para corregir mutaciones queda restringida a pocos laboratorios por lo que DW. Russell y colaboradores abogan por que otros centros apliquen esta técnica y publiquen sus resultados aunque sean negativos (DW Russell, 2002). En lo que concierne la FQ, hasta el momento no se ha descrito ningún estudio acerca de la reparación de mutaciones en el gen *CFTR* por los AAV.

10.5.1.6. Recombinación homóloga

La recombinación homóloga es una técnica que ha sido ampliamente utilizada para elucidar la función de genes en ratones y para generar modelos animales transgénicos y clónicos (B Wang, 2003). La inserción de secuencias de DNA en un cromosoma humano por recombinación homóloga se demostró por primera vez en 1985. O. Smithies y colaboradores lograron modificar el gen humano de la β -globina (O Smithies, 1985). En 1989 se describe que la recombinación homóloga puede utilizarse para modificar específicamente un locus en el genoma de ratones. T. Doetschman y colaboradores corrigieron una mutación en el gen *hprt* mediante esta técnica en células madre de ratón que habían sido utilizadas previamente para producir un ratón deficiente en HPRT (T Doetschman, 1987). El vector más comúnmente utilizado para modificar las células madre de ratón es el vector de reemplazo (ver Figura 11) que contiene marcadores de selección positiva (NeoR) para seleccionar las células transformadas y de selección negativa (HSV-tk) para eliminar la integración al azar después de la selección positiva.

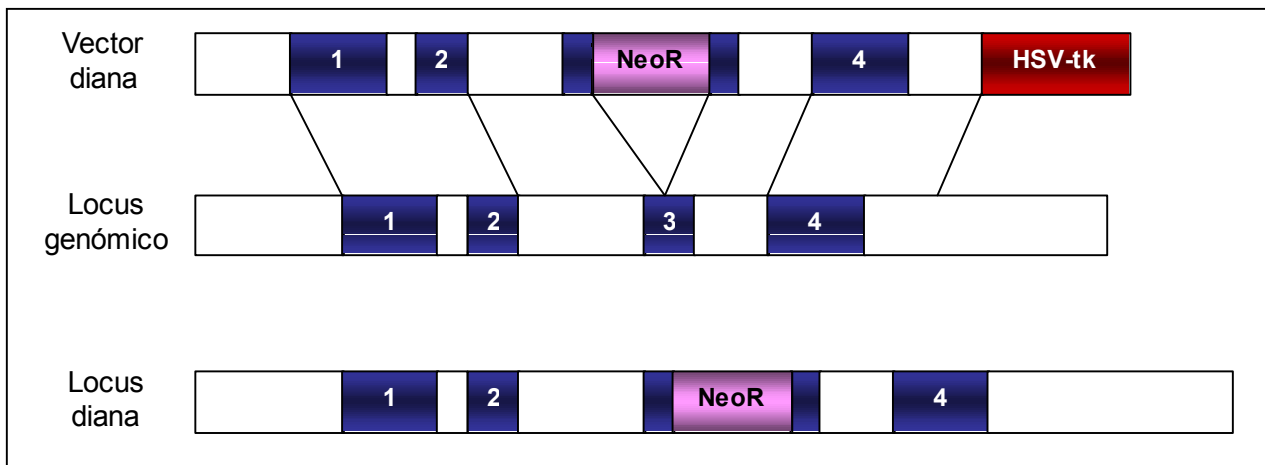


Figura 11. Ejemplo de disrupción del exón 3 de un gen por el gen de resistencia a neomicina (NeoR) mediante recombinación homóloga

El gen de la timidina quinasa (HSV-tk) se pierde después de la recombinación homóloga. Las células que expresan la timidina quinasa son sensibles a ganciclovir. De esta manera,

únicamente las células transformadas por recombinación homóloga son aisladas tras selección negativa. Esquema adaptado de B. Wang y J. Zhou 2003 (B Wang y J Zhou, 2003).

En el caso de la fibrosis quística, la recombinación homóloga no se ha utilizado para corregir mutaciones pero sí en la generación de modelos murinos de FQ, en la disrupción del gen *CFTR* en células madre, epiteliales y en fibroblastos ovinos, estos últimos utilizados con el fin de generar un modelo FQ de oveja por clonación. La primera investigación que hace referencia a la recombinación homóloga y la FQ es la llevada a cabo por BH. Koller y colaboradores (BH Koller, 1991), y además representa el primer intento para producir un ratón como modelo de FQ. En este estudio, se utilizaron células madre embrionarias de ratón E14TG2a que fueron electroporadas con construcciones que contenían 7,8kb de DNA con el exón 10 del gen *cfr* de ratón interrumpido por dos genes *neo* (resistencia a neomicina y seleccionables con G-418) además del gen *TK* (timidina quinasa y seleccionable con ganciclovir) en cada extremo de la construcción. Esta disrupción conllevaría la introducción de un codón de terminación en la posición 489 de *CFTR*. La inyección de estas células modificadas en blastocistos daría lugar a ratones con este genotipo. Los autores obtuvieron una frecuencia de recombinación homóloga de 1 de cada 2500 colonias resistentes a G-418 pero no detectaron ninguna modificación del gen *cfr* en más de 1800 células resistentes a G-418 y a ganciclovir analizadas, hecho que relacionaron con el pase de cultivo de las células dado que la doble selección se realizó en células con un pase de cultivo inferior al de la células seleccionadas con G-418.

C. Montrose-Rafizadeh y colaboradores han demostrado que se puede insertar el gen de resistencia a neomicina en el exón 1 del gen *CFTR* en las células HT29 (carcinoma de colon) mediante recombinación homóloga (C Montrose-Rafizadeh, 1997). Construcciones de DNA con el gen *neo* fueron electroporadas en estas células que presentan múltiples alelos de *CFTR*. La pérdida de uno de los alelos las hace “knockout” parciales por lo que los autores observaron que se producía proteína *CFTR* completamente glicosilada a niveles similares a los de las células no tratadas. Sus resultados sugirieron que un incremento en la traducción del mRNA de *CFTR* sería un mecanismo post-transcripcional de regulación de los niveles de proteína *CFTR*.

SH. Williams y colaboradores han evaluado la recombinación homóloga en fibroblastos ovinos como primer paso para clonar una oveja que sirva de modelo de FQ. Para ello, electroporaron fibroblastos fetales y postnatales de ovejas Poll Dorset (PDFF) y New Zealand Romney (NZRFF) con construcciones que contenían las mutaciones F508del del exón 10 y G27X del exón 2, ambas con una homología de 11kb con el gen *CFTR* diana. La selección positiva se hizo mediante el gen de resistencia a neomicina y la selección negativa

con el gen de la toxina de la difteria A. En ninguno de los 217 clones resistentes a G-418, tuvo lugar la recombinación homóloga de *CFTR*, quedando patente que es un proceso muy ineficiente al menos en estas células. De todas maneras, los autores presentaron datos acerca de la estabilidad del cariotipo de estas células después de la electroporación de las construcciones. Un aspecto importante de la viabilidad de las células utilizadas en transferencia de núcleo para ensayos de clonación es la estabilidad cromosómica durante el cultivo de las mismas. Cabe destacar que los fibroblastos fetales presentaron aneuploidías y translocaciones en los cromosomas mientras que los fibroblastos postnatales mantuvieron los 54 cromosomas típicos de un cariotipo ovino. A pesar de que se observó un acortamiento de los telómeros en los dos tipos celulares no se detectaron diferencias en la longitud de los mismos entre fibroblastos fetales y postnatales. Ahora bien, las células fetales mostraron una senescencia más rápida que las células postnatales. A diferencia de otros estudios en los que se generaron animales transgénicos clónicos utilizando fibroblastos fetales transfectados (AE Schnieke, 1997), (JB Cibelli, 1998), (KJ McCreath, 2000), (C Denning, 2001), (L Lai, 2002), (CJ Phelps, 2003), esta investigación quiso resaltar la importancia de la elección las células dadoras de núcleo y demostró que los fibroblastos postnatales persisten más tiempo en cultivo que los fibroblastos fetales sin mostrar inestabilidad cromosómica ni senescencia por lo que son una opción para producir animales transgénicos por clonación de células somáticas.

Al igual que ha servido para interrumpir el gen *CFTR*, la recombinación homóloga se podría utilizar para corregir mutaciones en este gen y revertir el fenotipo de fibrosis quística.

De hecho, la recombinación homóloga ya se ha utilizado para corregir el gen *hprt* en células madre de ratón derivadas de las células E14TG2a (S Hatada, 2000).

10.5.2. Reparación génica a nivel de RNA

10.5.2.1. Spliceosome-mediated RNA trans-splicing (SMaRT)

El “splicing” del RNA es el mecanismo que utiliza la célula para eliminar los intrones de un gen. Descrito en 1985 (E Brody y J Abelson, 1985), (PJ Grabowski, 1985), el espliceosoma es un complejo de 50 proteínas y 5 RNA que reconoce las señales 5’GT y 3’AG de los intrones para escindirlos y ligar los exones entre sí. Cuando el “splicing” ocurre en la misma molécula de pre-mRNA se llama “splicing” en *cis* mientras que si se produce entre dos moléculas de pre-mRNA independientes se denomina “splicing” en *trans*. En la Figura 12 se muestra el ejemplo de la corrección de la mutación F508del en el gen *CFTR*.

El “splicing” en *trans* del RNA (de las siglas SMaRT) mediado por el espliceosoma cuyo mecanismo se descubrió en 1986 en *Tripanosoma* (WJ Murphy, 1986), (RE Sutton y JC

Boothroyd, 1986), se ha convertido en una estrategia de terapia génica utilizada para reprogramar la secuencia de transcritos pre-mRNA.

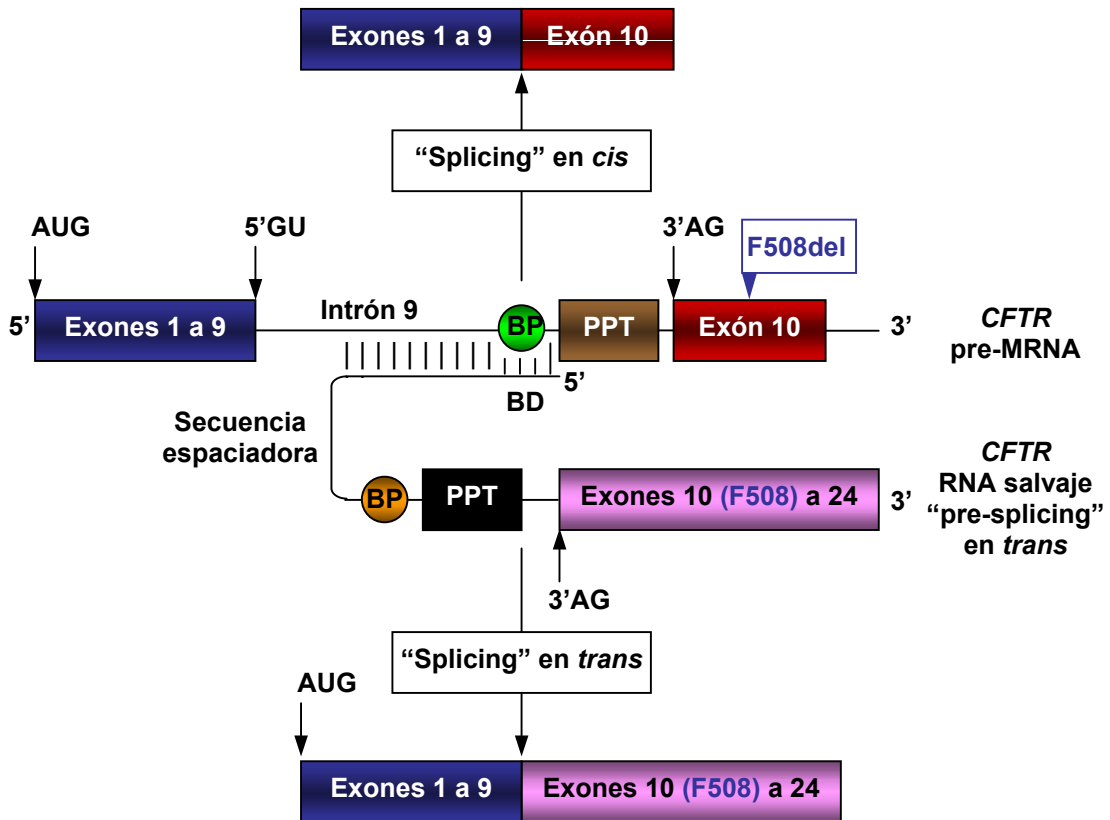


Figura 12. SMaRT para la corrección de la mutación F508del en el gen *CFTR*

Leyenda: BP: "branchpoint" con secuencia consenso UACUAAC; PPT: "polypyrimidine tract"; BD: "binding domain"; U: uracilo; A: adenina; G: guanina.

Esquema adaptado de SG. Mansfield y colaboradores 2000 (SG Mansfield, 2000).

La primera aplicación de SMaRT aparece en 1999 tras la publicación de M. Puttaraju y colaboradores (M Puttaraju, 1999). Los autores desarrollaron el SMaRT *in vitro* con extractos nucleares de células HeLa y con células humanas de cáncer de pulmón (H1299), e *in vivo* con ratones a los que les habían producido neoplasias subcutáneas mediante la inyección de las células H1299. El "splicing" en *trans* se realizó entre el pre-mRNA del gen 6 de la subunidad β de la gonadotropina coriónica humana y distintas moléculas de RNA "pre-splicing" en *trans*. Tras crear los tumores en los ratones, los investigadores los inyectaron y electroporaron con las construcciones plasmídicas que codificaban para las moléculas de RNA terapéuticas. Tras extraer los tumores se detectó "splicing" en *trans* en 8 de los 19 tumores tratados mediante RT-PCR. Los autores describieron además que el SMaRT produjo proteína funcional en la célula. Para demostrar que el mRNA que ha sufrido

“splicing” en *trans* se expresa, los investigadores desarrollaron un modelo con el gen *lacZ* y las células HEK293 y observaron la actividad de la β -Galactosidasa.

La primera aplicación de SMaRT a la fibrosis quística aparece en la publicación de SG. Mansfield y colaboradores (SG Mansfield, 2000) donde demostraron la reparación de la mutación F508del tras cotransfectar células HEK293 con moléculas de RNA codificadas en plásmidos y la mutación F508del presente en un minigen *CFTR* (exones 1 a 11) contenido en otro plásmido distinto. Los autores reemplazaron del exón 10 hasta el exón 24 lo que determinó la aparición de un transcrito *CFTR* reparado (detectado por RT-PCR) que fue traducido a proteína CFTR madura (detectada por “Western-blot”). Basándose en RT-PCR semicuantitativa, el porcentaje de “splicing” en *trans* fue estimado en 12% respecto al “splicing” en *cis*.

Además, los investigadores pusieron de manifiesto que el “splicing” en *trans* también ocurrió con *CFTR* endógeno. Utilizando una línea celular HEK293 estable que expresaba el minigen *CFTR* y células T84 (epiteliales humanas del intestino, expresan transcrito *CFTR* de manera endógena), los autores demostraron que el “splicing” en *trans* ocurrió en ambos casos.

Este estudio representa la primera evidencia de reparación de la mutación más frecuente en la FQ a nivel de RNA.

Otro estudio sobre la aplicación de SMaRT a la FQ es el de X. Liu y colaboradores (X Liu, 2002) donde corrigieron parcialmente (hasta 16%) la mutación F508del mediante esta técnica en células polarizadas aisladas de pacientes homocigotos F508del, lo que resultó en la aparición de corrientes de cloruros. La corrección se confirmó además por la detección de mRNA reparado y de proteína CFTR madura. Los autores transdujeron las células con adenovirus que contenían las construcciones génicas con las señales de “splicing” en el intrón 9 junto con los exones 10 a 24 del gen *CFTR*. En un modelo *in vivo* de xenoinjerto con células bronquiales humanas también transducidas con estos adenovirus se demostró nuevamente la corrección parcial del transporte de cloruros por el canal CFTR al medir una diferencia de potencial transepitelial equivalente al 22% del potencial que se obtiene en un xenoinjerto salvaje no FQ. M. Puttaraju y colaboradores han desarrollado de nuevo un sistema de reparación del gen *lacZ* truncado con el intrón 9 de *CFTR* como modelo de SMaRT (M Puttaraju, 2001). La cotransfección en células HEK293 de moléculas pre-RNA para promover el “splicing” en *trans* y del plásmido con el gen *lacZ* reparó los transcritos de *lacZ* restaurando la actividad enzimática β -Galactosidasa (medida por “Western-blot”). Con el fin de optimizar el SMaRT, los autores transfectaron distintas moléculas de pre-RNA que diferían en la longitud del dominio de unión (binding domain BD, ver Figura 12) al intrón 9 de *CFTR* y concluyeron que cuanto mayor era esa secuencia de unión mayor era la eficiencia de “splicing” en *trans*. La RT-PCR en tiempo real les sirvió para cuantificar la reparación de los transcritos *lacZ*. Así, las moléculas de pre-RNA con 153 nucleótidos de unión mostraron

una eficiencia de corrección de hasta 15,2% en las células HEK293 mientras que sólo fue del 1,2% con moléculas de pre-RNA con 23 nucleótidos de unión. Experimentos similares con células HEK293 que expresaban *lacZ* endógeno de manera estable mostraron un 4% de corrección tras la transfección de la molécula de RNA más optimizada.

H. Chao y colaboradores han descrito por primera vez la corrección/reversión fenotípica de una enfermedad genética en un modelo animal mediante SMaRT (H Chao, 2003). El modelo utilizado fue el ratón hemofílico “knock-out” para el gen *F8* (factor VIII de la coagulación; su ausencia causa hemofilia A). Los investigadores administraron directamente en la vena porta del hígado de los ratones un plásmido que codificaba para una molécula pre-terapéutica de RNA a fin de promover el “splicing” en *trans* en el intrón 15 del pre-mRNA del gen *F8*. Para el grupo control de ratones utilizaron un plásmido que codificaba para una molécula pre-terapéutica de RNA sin el dominio *trans*-“splicing”, es decir sin dominio de unión, sin secuencia espaciadora y sin 3'AG. Tras la inyección del plásmido terapéutico se detectó un pico de actividad de factor VIII de hasta el 20% respecto a los niveles normales detectados en ratones salvajes a las 48-72h horas (en el grupo tratado el promedio de la actividad del factor VIII fue del 13%). El análisis por “Western-blot” realizado sobre muestras de plasma reveló la presencia de la proteína factor VIII. Para confirmar que los transcritos mutados del gen *F8* habían sufrido “splicing” en *trans*, los autores evaluaron y cuantificaron los distintos transcritos mediante RT-PCR semicuantitativa. Basándose en la intensidad de las bandas obtenidas, se estimó que entre un 1,6% y un 6,3% de los transcritos mutados habían sido reparados. Los autores quisieron demostrar entonces que el SMaRT resultaba en la corrección fenotípica de la hemofilia A. Para ello, generaron adenovirus no replicativos con las dos construcciones plasmídicas utilizadas en los experimentos previos y los inyectaron en la vena de la cola de los ratones hemofílicos. Un pico de actividad del factor VIII fue detectado a las 3 semanas y perduró hasta las 8 semanas. Para testar el potencial homeostático de los 10 ratones tratados, los investigadores utilizaron un ensayo de coagulación en el que 8 de los 10 ratones sobrevivieron al ensayo mientras que el resto murió. Estos resultados ponen de manifiesto que el SMaRT es capaz de corregir durante 2 meses un fenotipo de hemofilia A.

10.5.2.2. Oligonucleótidos antisentido y “splicing”

Aproximadamente 60% de los genes humanos llevan a cabo “splicing” alternativo, mecanismo que produce variantes proteicas con distintas funciones. Estas variantes de “splicing” se han asociado a gran variedad de cánceres y enfermedades genéticas como la fibrosis quística donde el 16% de las mutaciones en el gen *CFTR* promueven este tipo de “splicing”. Una de las aplicaciones de los oligonucleótidos antisentido, que inicialmente fueron diseñados para disminuir o reprimir la expresión de genes, es la de modular o

corregir este “splicing” alternativo para generar proteínas terapéuticas. Las características de los oligonucleótidos cuyo objetivo es modificar el “splicing” son diferentes de las de los oligonucleótidos utilizados para disminuir la expresión de genes. No deben activar la RNAsaH que destruye el pre-mRNA antes de que se produzca el “splicing”, ni competir con los factores de “splicing” para acceder al pre-mRNA en el núcleo. Se pueden realizar ciertas modificaciones en los oligonucleótidos para que cumplan estos requerimientos: por ejemplo, la adición química en la posición 2' como 2'-O-metil, 2'-metoxietil o 2'-O-aminopropil no activan la RNAsaH y confieren además mayor resistencia frente a endonucleasas/exonucleasas y afinidad por las secuencias diana que las moléculas 2'-desoxi.

Los oligonucleótidos antisentido se han utilizado para modular el “splicing” alternativo que ocurre naturalmente como en el caso del gen *Bcl-x*. Este gen codifica para dos variantes de “splicing” con funciones opuestas: la forma larga *Bcl-xL* tiene propiedades antiapoptóticas mientras que la función de la forma corta *Bcl-xS* es proapoptótica. Ambas proteínas son necesarias para la función normal de la célula. Ahora bien, *Bcl-xL* se encuentra sobreexpresada en numerosos cánceres como en el cáncer de próstata. De esta manera, si se favoreciera la aparición de la forma corta *Bcl-xS* mediante oligonucleótidos se incrementarían las señales proapoptóticas inhibiéndose el crecimiento o causando la muerte de las células cancerosas. JK. Taylor y colaboradores transfectaron un oligonucleótido 2'-O-metoxietil modificado mediante Lipofectina para bloquear el lugar de “splicing” de *Bcl-xL* en las células A549 de carcinoma pulmonar (JK Taylor, 1999). Los autores detectaron un incremento dosis-dependiente de la proteína *Bcl-xS* a las 24h post-transfección. Aunque las señales proapoptóticas no causaron la muerte de las células sí las hicieron más sensibles a apoptosis en respuesta a radiación ultravioleta y al quimioterápico cisplatino.

Además de modular el “splicing”, los oligonucleótidos antisentido también han servido para corregir el “splicing” alternativo debido a mutaciones, incluso en modelos animales. Un ejemplo es el estudio de QL. Lu y colaboradores sobre el ratón *mdx* que contiene una mutación en el exón 23 del gen *mdx*, modelo animal de la distrofia muscular de Duchenne (QL Lu, 2003). Mediante el copolímero F127, los investigadores transfectaron un oligonucleótido fosforotioato 2'-O-metil modificado en el músculo tibialis anterior diseñado para promover la pérdida del exón 23 mutado. El “Western-blot” reveló que las fibras musculares expresaron la proteína distrofina hasta 2 meses después de la inyección intramuscular. Un ensayo de fuerza isométrica demostró que las fibras tratadas mejoraron su función motora.

La corrección del “splicing” alternativo también se ha llevado a cabo en el caso de la fibrosis quística. La mutación 3849+10kb C→T en el intrón 19 del gen *CFTR* crea un lugar 5' de

“splicing” erróneo y activa un lugar 3’ de “splicing” críptico. Este tipo de “splicing” acontece en el 2% de todos los casos de FQ pero es más frecuente en la población judía Ashkenazi. KJ. Friedman y colaboradores han corregido este “splicing” alternativo generado por la mutación 3849+10kb C→T en células CFT1 (de epitelio traqueal humano), NIH3T3 (fibroblastos murinos) y C127 (de epitelio mamario murino) tras la transfección en las mismas de un oligoribonucleótido fosforotioato 2'-O-metil modificado mediante ExGen500 o Lipofectamina. Estos tres tipos celulares fueron previamente transfectados para expresar establemente construcciones retrovirales con el mini intrón 19 y la mutación 3849+10kb C→T. La corrección del transcrito fue dosis-dependiente y en el caso de las células C127 se detectó la presencia de la proteína CFTR que además mostró un patrón correcto de glicosilación.

Este estudio demuestra que se puede bloquear el “splicing” alternativo del mRNA de *CFTR* y por lo tanto abre la posibilidad para evitar la pérdida de exones en el transcrito de *CFTR* (ej. pérdida de los exones 9 o 12).

La modulación del “splicing” alternativo se ha basado principalmente en la utilización de oligonucleótidos antisentido pero una de las desventajas radica en la necesidad de administraciones periódicas. Para solventar este problema es posible generar RNA antisentido en la célula mediante construcciones plasmídicas estables. FG. DeAngelis y colaboradores han construido vectores retrovirales que codifican para moléculas de RNA antisentido dirigidas a promover la pérdida del exón 51 del gen *DMD* (distrofina) de la distrofia muscular de Duchenne. Los autores obtuvieron una biopsia muscular de un paciente con DMD. Tras cultivar e immortalizar las células procedentes de la biopsia que presentaban la pérdida de los exones 48 a 50 del gen *DMD*, las transdujeron con las construcciones retrovirales. La pérdida del exón 51 provocó la recuperación de la pauta de lectura del mRNA y se obtuvo una proteína 210 aminoácidos más corta que la proteína DMD salvaje tras los análisis de “Western-blot”.

Estudios posteriores para hacer extensible esta técnica a modelos animales son necesarios para demostrar que la expresión estable de moléculas de RNA antisentido se puede usar en la modificación permanente del “splicing” *in vivo*.

10.5.2.3. Ribozimas

Los ribozimas son enzimas de RNA con capacidad catalítica tanto a nivel de RNA como de DNA. Se pueden utilizar para disminuir la expresión génica y para reparar genes mutados. El ribosoma, el espliceosoma y la ribonucleasa P son ribozimas endógenos celulares. El ribozima más complejo y mejor conocido es el ribosoma que sintetiza los enlaces peptídicos de las proteínas en el proceso de traducción que es dependiente de mRNA. El espliceosoma interviene en la escisión de intrones y unión de los exones del mRNA (para más detalles ver

“10.5.2.1. SMaRT”). La ribonucleasa P procesa los precursores de tRNA. Existen otros ribozimas endógenos como los ribozimas “hammerhead”, ribozimas “hairpin”, y ribozimas de intrón Grupo I y II. De hecho, los ribozimas de intrón Grupo I fueron los primeros RNA catalíticos descritos y se encontraron en *Tetrahymena thermophila* (TR Cech, 1981).

Los ribozimas “hammerhead” y “hairpin” derivan de los virus RNA de plantas mientras que los ribozimas de intrón Grupo I y II provienen de las bacterias, plantas y hongos. Sin embargo, mediante biología molecular e ingeniería genética se pueden desarrollar y manipular estos ribozimas para ensayos de terapia génica.

Los ribozimas “hammerhead” y ribozimas “hairpin” tienen actividad catalítica sobre el mRNA por lo que se pueden aplicar para digerir RNA mutados, oncogénicos o virales. Los ribozimas de intrón Grupo II pueden cortar tanto DNA como RNA y pueden insertarse en los genes como elementos móviles que son. Estos ribozimas se han aplicado en la disrupción de genes tanto en bacterias como en células eucariotas. H. Guo y colaboradores han conseguido insertar mediante ribozimas un intrón en plásmidos que contenían el gen del correceptor CCR5 o el DNA proviral del VIH. Tanto ribozimas como plásmidos se cotransfectaron en células HEK293 con liposomas (H Guo, 2000). Los análisis de PCR revelaron la introducción del intrón en los DNAs diana.

Tanto los ribozimas de intrón Grupo I como II no necesitan el espliceosoma para que se produzca el “splicing” ya que disponen de actividad catalítica de “autosplicing”.

No obstante, en el caso de la corrección génica que nos ocupa únicamente tienen aplicación los ribozimas de intrón Grupo I. A diferencia de los ribozimas anteriormente mencionados, los ribozimas de intrón Grupo I pueden reparar mRNA mutados catalizando “splicing” en *trans*, mecanismo idéntico al que ocurre en SMaRT (ver Figura 13). Los ribozimas de intrón Grupo I únicamente requieren la presencia de un Uracilo (U) precediendo la señal 5'GU en el mRNA diana para producir el “splicing”.

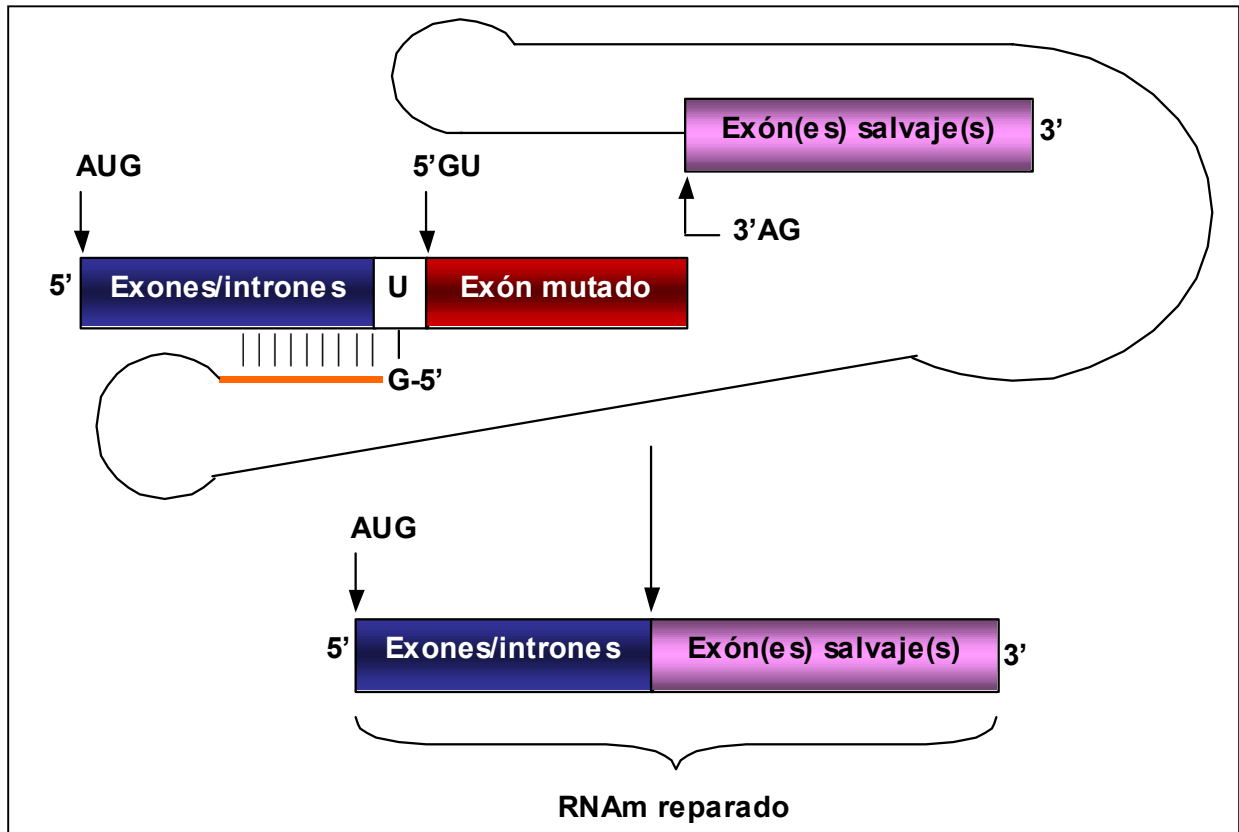


Figura 13: Reparación del mRNA por “splicing” en *trans* mediado por ribozima de intrón Grupo I

Leyenda: en naranja está representada la secuencia guía interna; U: uracilo; A: adenina; G: guanina. El intrón se une por homología de bases al mRNA mediante su secuencia guía interna. El único requerimiento para que se produzca el “splicing” en *trans* del mRNA es la presencia de U antes del lugar de “splicing” 5’ en el mRNA diana y su unión inestable con una G (enlace no Watson-Crick). Una vez escindido el intrón, se ligan los exones.

Esquema adaptado de AS. Lewin y WW. Hauswirth 2001 (AS Lewin y WW Hauswirth, 2001).

El “splicing” en *trans* de mRNA mediado por ribozimas se demostró por primera vez en *E. coli* en 1994 (BA Sullenger y TR Cech, 1994). BA. Sullenger y TR. Cech demostraron que se podía restablecer un transcrito del gen *lacZ* al introducir por electroporación en *E. coli* un plásmido con el promotor T7 de la RNA polimerasa, el 5’ del gen *lacZ* truncado y el ribozima específico con el 3’ del gen *lacZ* para mediar el “splicing” en *trans*. Además, la reparación del transcrito conllevó la aparición de actividad β -Galactosidasa.

T. Watanabe y BA. Sullenger han utilizado estos ribozimas para reparar el mRNA de p53 en células cancerosas en cultivo (osteosarcoma, cáncer de pulmón y cáncer de colon) (T Watanabe y BA Sullenger, 2000). Los transcritos de 1,1kb de p53 corregidos se tradujeron a proteína funcional, evidenciado por la transactivación del promotor del gen *MDR1*. Este

estudio representa la primera evidencia de que se puede restaurar la actividad proteica producida por la traducción de transcritos reparados mediante ribozimas.

La administración directa de los ribozimas no es recomendable, a menos que se modifiquen químicamente sus nucleótidos, dado que el RNA es degradado rápidamente por nucleasas. Ahora bien, modificaciones químicas en la posición 2' de las pirimidinas confiere estabilidad a la molécula sin comprometer su actividad catalítica (L Beigelman, 1995). Los ribozimas estabilizados se pueden administrar repetidamente por vía tópica o intravenosa y los vectores virales se han utilizado para liberarlos. Para la expresión de los ribozimas los oligonucleótidos que codifican para los ribozimas se clonan junto a los promotores de la RNA polimerasa II o RNA polimerasa III. La desventaja que supone utilizar el promotor de la RNA polimerasa III es que no es regulado y promueve la producción de grandes cantidades de ribozima. En cambio los ribozimas expresados a partir del promotor de la RNA polimerasa II producen menos cantidad de ribozimas pero son más eficientes ya que permanecen en el citoplasma junto con el mRNA diana. Aunque los ribozimas de intrón Grupo I no se han utilizado en la FQ sí han servido para corregir el mRNA del canal de cloruros del músculo esquelético canino, modelo celular de la miotonía congénita (CS Rogers, 2002). Los autores demostraron que un ribozima indujo el "splicing" en *trans* del transcrito de 4kb transfectado establemente en células HEK293 con Lipofectamina.

La eficiencia de reparación en una población de células tratadas fue del 1,2% evidenciado por RT-PCR en tiempo real. Sin embargo, cuando se examinó la actividad del canal mediante electrofisiología en células únicas, 18% de células tratadas con el ribozima (13 de 71 células analizadas) mostraron la restauración parcial de la función del canal de cloruros. Incluso, se obtuvieron dos registros electrofisiológicos de células tratadas semejantes a células salvajes lo que pone de manifiesto que un ribozima es capaz de restablecer por completo un fenotipo.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

El principal objetivo fue evaluar el potencial terapéutico de oligonucleótidos modificados y fragmentos de PCR (SFHR) para la corrección *in situ* de mutaciones en el gen *CFTR*. Como objetivos concretos se destacan:

1. Caracterización de la línea celular IB3.1 inmortalizada de epitelio bronquial de un paciente con FQ.
2. Diseño, síntesis y caracterización de los quimeroplastos, de los oligonucleótidos modificados y de los fragmentos SFHR.
3. Optimización del sistema de transfección no viral (formación de lipoplejos con lípidos catiónicos, formación de poliplexos con PEI, y electroporación) para la incorporación de quimeroplastos, de oligonucleótidos modificados y de fragmentos SFHR a las células epiteliales
4. Análisis de la cinética de incorporación de los quimeroplastos.
5. Evaluación de la estabilidad de los quimeroplastos post-transfección.
6. Puesta a punto de metodologías que permitieran cuantificar la reparación génica.
7. Valoración de la eficiencia correctora de distintos oligonucleótidos modificados y fragmentos SFHR.

METODOLOGIA

METODOLOGIA

En este apartado se ha detallado la metodología experimental que, aunque ya esquematizada en los diferentes artículos, resulta de especial relevancia en los ensayos específicos desarrollados en el estudio.

11. GENERACION DE LAS MOLECULAS CORRECTORAS

11.1. Síntesis y purificación de los quimeraplastos

Se preparan 250ml de solución para el gel de acrilamida conteniendo 37,5g de acrilamida, 1,875g bis-acrilamida, 105g urea y 50ml TBE (5X) (54g de Tris base, 27,5g de ácido bórico, 4,35g EDTA, 1litro de dH₂O). Se calienta la solución a 100°C hasta su completa disolución y se añade dH₂O hasta un volumen de 250ml y se filtra. A los 250ml de solución filtrada, se añaden 1,2ml de persulfato amónico (APS) al 10% y 120µl de TEMED (tetrametiletilendiamina) para su polimerización en posición horizontal entre cristales de electroforesis de tamaño 30x40cm y junto con el peine de 16 dientes de 1,6mm de grosor (capacidad de cada pocillo: 100µl). Al cabo de 1 hora de polimerización, se colocan los cristales con el gel polimerizado en el aparato de electroforesis vertical "Model S2 Sequencing Gel Electrophoresis Systems" (Invitrogen). Se realiza un preequilibrio del gel durante 30 minutos a 75mA con 50µl de marcador de carga. Transcurrido este tiempo se cargan 500µl (100µl/pocillo) del quimeraplasto resuspendido en urea 7M con 10% de glicerol. Se deja corriendo la electroforesis toda la noche a 15mA. Al día siguiente, se visualiza el quimeraplasto purificado mediante un transiluminador de luz ultravioleta (ver Figura 14). Se cortan las fracciones de gel conteniendo el quimeraplasto completo de 68nt y no los subproductos de síntesis y se eluyen toda la noche con 500µl de tampón TE (10ml Tris-HCl 1M, 2ml EDTA 0,5M, pH 8, 1 litro de dH₂O) en tubos Nunc colocados en una placa giratoria. Tras la elución, se filtra el contenido con una columna SPIN-X (Corning) para recoger la fracción líquida eluída que contiene el quimeraplasto mediante 5 minutos de centrifugación a 14000rpm. El eluído se desala gracias a una columna G-25 tipo-2 (Amersham Pharmacia Biotech) previamente equilibrada con 50ml de dH₂O. Se juntan las fracciones acuosas y después de ser liofilizadas se resuspenden en dH₂O. La concentración de quimeraplasto purificado se determina espectrofotométricamente a 260nm.

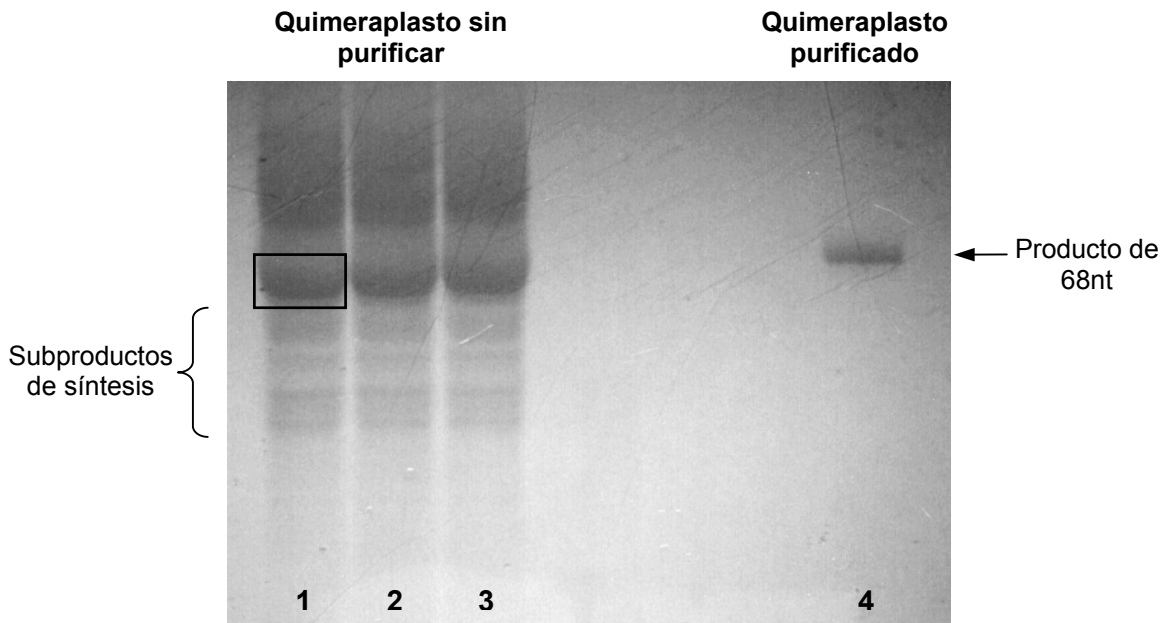


Figura 14. Purificación del quimeraplasto mediante electroforesis en gel desnaturante de acrilamida

Después de la electroforesis, se coloca el gel sobre una placa fluorescente Silicagel (Merck) y se visualizan las bandas mediante el transiluminador de luz ultravioleta. Esta foto de un gel de purificación obtenida tras visualización con luz ultravioleta muestra la purificación de un quimeraplasto de 68nt resuspendido en 300 μ l de una solución con urea 7M y 10% de glicerol (100 μ l en los carriles 1 a 3 respectivamente) y la electroforesis de un quimeraplasto de 68nt purificado (carril 4). La síntesis del quimeraplasto, al no ser 100% eficiente, genera subproductos de tamaños inferiores a 68nt. Después de la electroforesis se cortan fracciones del gel con la banda mayoritaria del quimeraplasto (rectángulo negro) para su procesamiento posterior.

11.2. Generación y extracción de fragmentos SFHR

Hemos amplificado mediante PCR un fragmento de 493pb conteniendo el exón 10 del gen *CFTR* salvaje con el polimorfismo M470V a partir de DNA extraído de un paciente que no presentaba FQ. Para ello, hemos utilizado los cebadores 10i5' (5'-GCAGAGTACCTGAAACAGGA-3') y 10i3' (5'-CATTACAGTAGCTTACCCA-3'). Después de comprobar la amplificación del fragmento en un gel de agarosa al 1% y de su purificación (Qiagen), realizamos una reacción de ligación toda la noche a 16°C con 1 μ l de plásmido pGEM T-easy vector (Promega), 3 μ l de fragmento de PCR purificado, 5 μ l de tampón de ligación y 1 μ l de T4 DNA ligasa. Al día siguiente, electrotransformamos 50 μ l de bacterias XL1 blue (Stratagene) con 2 μ l de una dilución 1:5 de la reacción de la ligación. Tras la

Metodología-Extracción de DNA de pellet celular (sin fenol:cloroformo)

electroporación (2,5 KV de voltaje, 200 Ω de resistencia, 25 μ F de capacitancia), las bacterias se recuperan a 37°C durante 1h en 1ml de medio SOC (1litro de este medio se prepara con: 20g triptona, 5g extracto de levadura, 0,5g NaCl, 900ml dH₂O, 100 μ l NaOH 10N, 2,5ml KCl 1M, 5ml MgCl₂ 2M, 20mM de glucosa y se ajusta con dH₂O hasta 1 litro) y se plaquean en placas conteniendo 100 μ g/ml ampicilina. Una vez comprobada mediante miniprep (Qiagen) y secuenciación la presencia del inserto de 493pb de *CFTR* salvaje, se utiliza este plásmido para generar los fragmentos SFHR de 388pb mediante PCR con los cebadores SFHR-FF2 (5'-GCAAGTGAATCCTGAGCGTGA-3') y SFHR-FR2 (5'-CCATTCACAGTAGCTTACCCATAGAGG-3'). Los fragmentos amplificados se evidencian con un gel de agarosa al 1% y se hace un "pool" con todos los tubos de amplificación para su posterior purificación según el protocolo que sigue a continuación:

1. Juntar todos los tubos de PCR en un eppendorf y medir el volumen.
2. Añadir el mismo volumen de fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1) y mezclar con vórtex. Centrifugar 4 minutos a 14000rpm a temperatura ambiente y recuperar la fase superior, descartando la fase inferior y la interfase.
3. Repetir el punto 2.
4. Añadir el mismo volumen pero de cloroformo:isoamílico (24:1) y mezclar con vórtex. Centrifugar 3 minutos a 14000rpm a temperatura ambiente.
5. Medir el volumen recuperado de la fase superior y separar en 2 eppendorfs.
6. Añadir a cada eppendorf un volumen de acetato amónico 5M equivalente a la mitad del volumen de muestra + 2 volúmenes de etanol al 100%.
7. Dejar 1h en hielo y centrifugar 30 minutos a 14000rpm a 4°C.
8. Descartar el sobrenadante y añadir a cada eppendorf 500 μ l de etanol al 70% en dH₂O (-20°C) y volver a centrifugar 20 minutos a 14000rpm a 4°C.
9. Descartar el etanol y añadir a cada eppendorf 10 μ l de dH₂O (20 μ l totales).
10. Dejar en la nevera toda la noche y leer la absorbancia a 260nm al día siguiente para la cuantificación.

Finalmente y justo antes de la transfección, se originaron los fragmentos SFHR monocadena por desnaturalización a 98°C durante 10min y enfriamiento inmediato en hielo.

12. EXTRACCION DE DNA DE PELLETT CELULAR (SIN FENOL:CLOROFORMO)

El DNA que obtenemos con este protocolo está suficientemente purificado como para realizar las reacciones de PCR posteriores. Además, evitamos la peligrosidad y toxicidad asociadas a la manipulación de este compuesto. A continuación se enumeran las etapas del protocolo:

1. Resuspender el pellet de células con 500µl de tampón STE (1ml NaCl 5M, 5ml Tris-HCl 0,5M, 100µl EDTA 0,5M, 5ml SDS 10%, 5mg/ml de proteinasa K, 38,9ml dH₂O) e incubar 3h a 55°C.
2. Añadir 500µl de isopropanol para la precipitación y mezclar el tubo eppendorf por inversión.
3. Recoger el DNA precipitado con una punta de pipeta y transferirlo a un eppendorf conteniendo 1ml de etanol al 70% (en TE 1X, pH 8).
4. Centrifugar a 14000rpm durante 5 minutos a 4°C y descartar el etanol.
5. Dejar secar el eppendorf a temperatura ambiente y añadir el volumen necesario de tampón TE 1X, pH 8 (10ml Tris-HCl 1M, 2ml EDTA 0,5M, 1 litro de dH₂O). Dejar en la nevera toda la noche.
6. Resuspender el DNA pipeteando y calentar el eppendorf a 50°C durante 30 minutos para mejorar su disolución.
7. Cuantificar el DNA en el espectrofotómetro a una absorbancia de 260nm.

13. PCR-OLA

Para establecer el porcentaje de corrección mediado por los quimeroplastos hemos adaptado la técnica de PCR-OLA (siglas de "oligonucleotide ligation assay") descrita por PD. Grossman y colaboradores (PD Grossman, 1994) y FA. Eggerding y colaboradores (FA Eggerding, 1995). Se realiza una reacción de ligación sobre un volumen de DNA salvaje o mutado (4µl) extraído en fase exponencial de una PCR previa en la que se ha amplificado la región de la mutación a analizar. Para la reacción de ligación, se utilizan tres cebadores, uno es fluoresceinado (FITC) en su extremo 3', posee un grupo fosfato (P) en su extremo 5' y es común para los dos alelos. Los otros dos cebadores son alélicos y de distinta longitud debido a la cola de Adeninas (4 para el cebador salvaje y 6 para el cebador mutado). Los cebadores unidos al DNA diana previamente amplificado en fase exponencial son ligados por una ligasa termoestable (*Tsc* DNA ligasa (Roche)) al cebador fluoresceinado común en función de si existe o no el "mismatch" entre el cebador alélico y el DNA diana en el lugar de la mutación (ver Figuras 15 y 16). *Nota:* para la reacción de ligación también se testó el enzima *Taq* DNA ligasa (New England Biolabs), pero éste fue menos específico que la *Tsc* DNA ligasa en la reacción de ligación (referirse a (D de Semir, 2003)).

Figura15. OLA de DNA salvaje

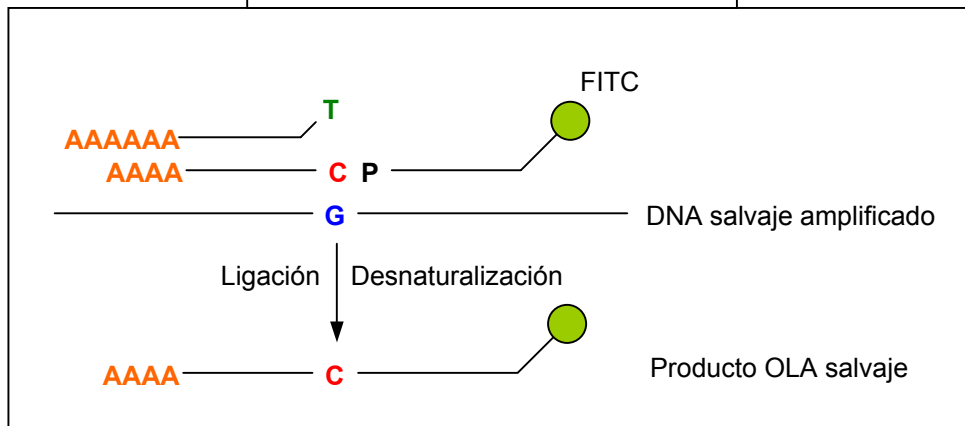
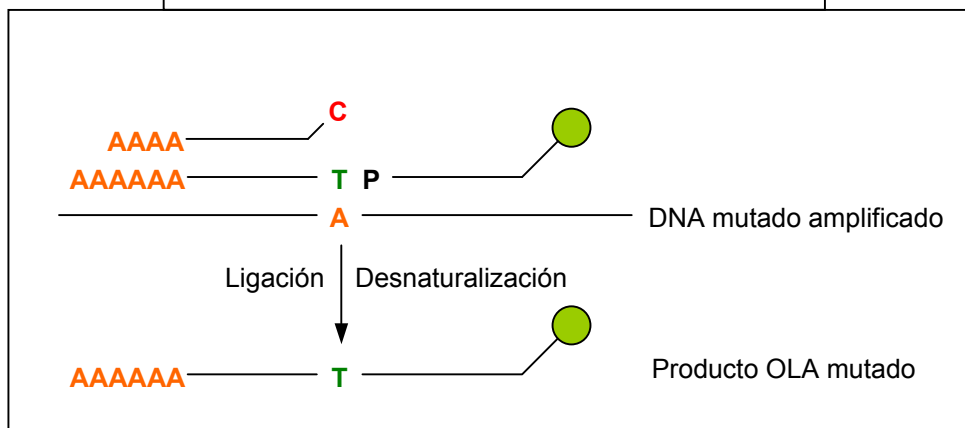


Figura 16. OLA de DNA mutado (W1282X)



Los productos de ligación se separan mediante electroforesis capilar en un ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer con el polímero POP-6™ (“Performance Optimized Polymer”, Applied Biosystems). Seguidamente, se establece una relación entre los valores del área de pico del alelo salvaje (alelo corregido + alelo salvaje original) y la suma de los valores de las áreas del pico salvaje y mutado (W1282X) mediante el “software” GeneScan. De esta manera se obtiene el porcentaje de corrección mediado por el quimeroplasto (ver Figura 17).

Nota: descripción de los genotipadores ABI PRISM™ y del “software” GeneScan.

Los genotipadores ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer y ABI PRISM™ 377 Genetic Analyzer son instrumentos que permiten la determinación automatizada de cambios nucleotídicos, de tamaños de fragmentos, o la cuantificación relativa de fragmentos de DNA marcados con fluorescencia. Estos sistemas automáticos evitan el manejo de radiactividad y manipulación de geles post-electroforesis. Mientras que el primer genotipador realiza las separaciones utilizando electroforesis capilar, el segundo se basa en electroforesis en geles de acrilamida.

Cada equipamiento consiste en un instrumento de electroforesis, una impresora y un ordenador con el programa informático GeneScan de análisis de datos, recogidos por el genotipador. El “software” GeneScan permite determinar el tamaño de los fragmentos de DNA y cuantificarlos. Se pueden marcar los fragmentos con 4 fluorescencias distintas. Los resultados de los experimentos se pueden mostrar en forma de gel “display” (en ABI PRISM™ 377 únicamente), de tabla de datos, de electroferograma o combinación de ambos (ver Figura 17).

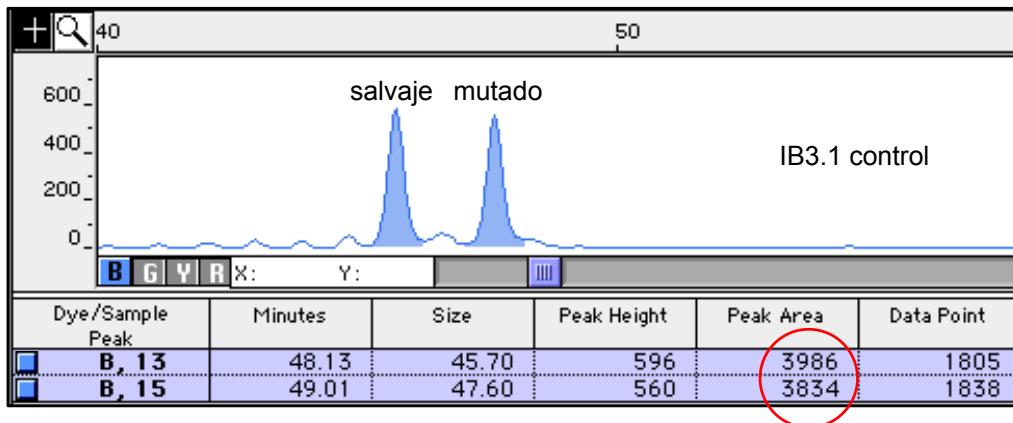


Figura 17. Cálculo de la relación entre áreas de pico de los alelos salvaje y mutado de un electroferograma con tabla de datos.

Área del pico salvaje = 3986 y área del pico mutado = 3834.

Cálculo: $[3986 / (3834+3986)] \times 100 = 51$, lo que indica que en las células IB3.1 control (sin tratamiento con quimeraplasto) el alelo salvaje representa el 51% respecto al alelo mutado W1282X. En el caso de que se trataran las células con un quimeraplasto y el alelo salvaje representara el 61%, restando a este valor el 51% de las células IB3.1 control nos indicaría un 10% de corrección génica. Aplicando este valor a la recta de calibración establecida con los cebadores alélicos WT+4A/M+6A obtendríamos el valor de la corrección génica (referirse al artículo (D de Semir, 2003)).

Ecuación de la recta de calibración: $y=1,944+0,957x$

Ejemplo: $(10-1,944)/0,957= 8,4\%$.

Nota: en la optimización de las reacciones de ligación hemos utilizado diferentes parejas de cebadores alélicos: WT+8A/M+0A, WT+0A/M+2A, WT+4A/M+8A, WT+4A/M+6A.

En el primer caso (WT+8A/M+0A) observamos una descompensación entre el cociente de las áreas del pico salvaje y del mutado W1282X en distintas réplicas de ligación sobre un DNA heterocigoto W1282X de paciente previamente amplificado. Es decir, no detectamos una relación de áreas de 50%/50% entre el alelo W1282X y el alelo salvaje. Por esta razón, decidimos reducir la diferencia de longitud entre los cebadores alélicos y colocar la cola de poliA en el cebador mutado (WT+0A/M+2A). En este caso, evidenciamos que los valores de

cocientes de las áreas no eran reproducibles entre diferentes réplicas. Esta observación nos sugirió que los dos cebadores alélicos debían contener cola de poliA. Así, diseñamos las parejas de cebadores WT+4A/M+8A y WT+4A/M+6A. Los primeros resultados indicaron reproducibilidad de las réplicas de ligación y los cocientes de las áreas de los picos salvaje y mutado cercanos al 50%/50%, por lo que nos propusimos establecer las rectas de calibración con estas dos parejas de cebadores alélicos. Sin embargo, la recta de calibración con los cebadores alélicos WT+4A/M+6A presentó un coeficiente de regresión lineal superior al de la recta de calibración con los cebadores alélicos WT+4A/M+8A ($R^2=0,996$ y $R^2=0,985$ respectivamente) (referirse a (D de Semir, 2003).

14. ENSAYO IN VITRO PARA EVALUAR LA COMPETENCIA REPARADORA DE LAS CELULAS IB3.1 Y OTRAS LINEAS CELULARES

El plásmido pK^sm4021 contiene el gen de resistencia a ampicilina y una mutación puntual en el nucleótido 4021 (T→G) en el gen de resistencia a kanamicina (ambos genes están simbolizados por los rectángulos rojos) (1). Se diseña el quimeraplasto Kan 4021C de 68nt para corregir esta mutación puntual (G→C) (2). El codón TAC resultante (encuadre rojo en la secuencia de nucleótidos) codifica para el aminoácido Tirosina al igual que el codón TAT salvaje lo que permite la discriminación entre el plásmido corregido y plásmido contaminante salvaje. Se realiza una reacción *in vitro* en presencia de ATP entre los extractos proteicos de los tipos celulares a analizar, el quimeraplasto Kan4021C y el plásmido pK^sm4021 (3).

Se electroporan 2µl de plásmido (diluído 5 veces en dH₂O) de la reacción anterior en bacterias *E. coli* DH10B (recA1⁻) y se siembran en placas con ampicilina y en otras con kanamicina (4). Finalmente, se secuencian las colonias resistentes a kanamicina (5) y la frecuencia de conversión génica se establece como el cociente entre el número de colonias resistentes a kanamicina y el número de colonias resistentes a ampicilina de una dilución 10⁻⁵ tras una incubación toda la noche a 37°C (n° colonias Kan^R / (n° colonias Amp^R x 10⁵)).

Metodología-Ensayo in vitro para evaluar la competencia reparadora de las células IB3.1 y otras líneas celulares

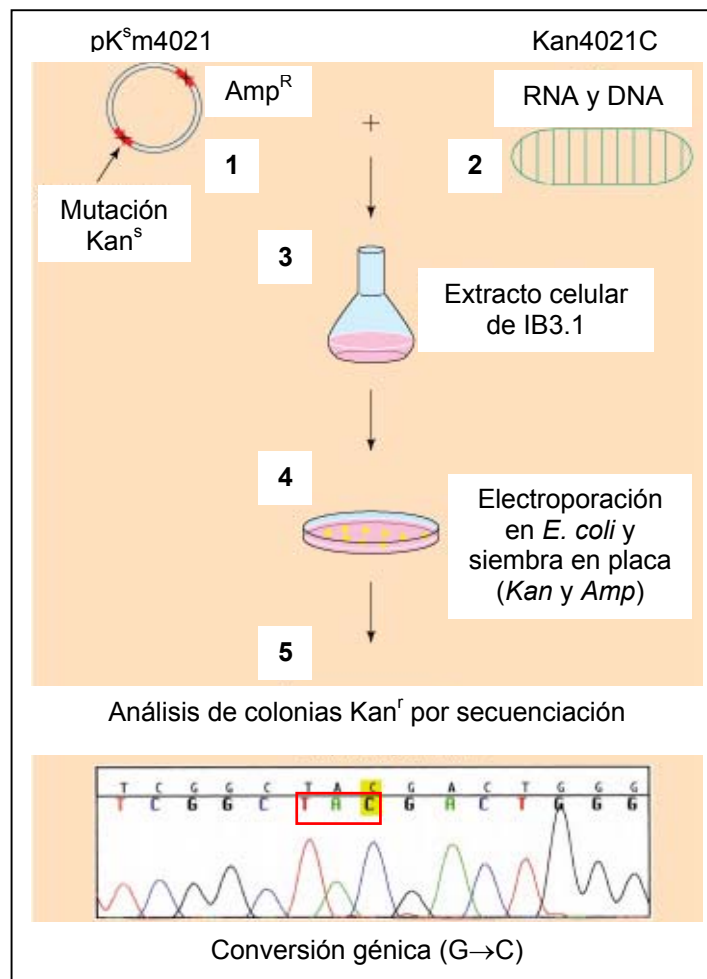


Figura 18. Aproximación bioquímica para evaluar la competencia reparadora de células eucariotas. Esquema adaptado de S.Ye y colaboradores 1998 (S Ye, 1998).

Detalles de la reacción:

Mezclar en un eppendorf los siguientes componentes:

30µg de extracto proteico de células IB3.1; 2µg de quimeraplasto Kan4021C, 1µg de plásmido pK^sm4021, 20mM de tampón Tris-HCl, pH 7,4; 15mM MgCl₂; 1mM ATP; 0,4mM DTT (Ditiotreitol) en un volumen total de 100µl.

1. Incubar la reacción a 37°C durante 45 minutos.
2. Realizar dos extracciones con 100µl de fenol:cloroformo (1:1).
3. Precipitar con 0,1 volúmenes (10µl) de acetato sódico 3M (pH 4,8) y dos volúmenes (200µl) de etanol al 100% (-20°C) durante 2h.
4. Centrifugar a 14000rpm durante 30 minutos a 4°C y descartar el sobrenadante.
5. Lavar el pellet con etanol al 75% (-20°C) y centrifugar a 14000rpm durante 5 minutos a 4°C.
6. Una vez descartado el etanol, resuspender el pellet en 50µl dH₂O.

Metodología-Ensayo in vitro para evaluar la competencia reparadora de las células IB3.1 y otras líneas celulares

7. Se electroporan 2µl de plásmido (diluído 5 veces en dH₂O) en 50µl de bacterias *E.coli* DH10B en una cubeta de 0,2cm con el electroporador GenePulser (Bio-Rad: 2,5KV de voltaje, 25µF de capacitancia, 200Ω de resistencia).
8. Se transfieren las bacterias electroporadas a 1ml de medio SOC (20g triptona, 5g extracto de levadura, 0,5g NaCl, 900ml dH₂O, 100µl NaOH 10N, 2,5ml KCl 1M, 5ml MgCl₂ 2M, 20mM de glucosa) y se incuban a 37°C durante 1h.
9. Se plaquea una alícuota de 250µl de la suspensión bacteriana en placas de Kanamicina (50µg/ml) sin diluir y otra alícuota de 250µl de la misma suspensión diluida 1:10⁵ en placas de Ampicilina (100µg/ml).
10. Se cuentan las colonias resistentes a los antibióticos y se establece la frecuencia de corrección génica.

Nota: la obtención del extracto proteico se realizó mediante la recolección de las células semiconfluentes de 4 placas de 15cm con un raspador de células y lavado con tampón hipotónico frío que contenía 20mM HEPES pH 7,5; 5mM KCl, 1,5mM MgCl₂, 1mM DTT y 250mM de sacarosa. Las células fueron lisadas con un homogeneizador celular tipo Potter-Elvehjem (Sigma) e incubadas en hielo durante 60min. Posteriormente, se centrifugaron a 12000g durante 15min a 4°C. Inmediatamente después de la centrifugación se alicuotó el sobrenadante y se guardó a -80°C. Se utilizó una dilución 1:10 de una alícuota para determinar la concentración de la proteína a una absorbancia de 562nm en el espectrofotómetro y el "BCA Protein Assay Kit" (Pierce).

RESULTADOS

RESULTADOS

En este apartado, se describe un resumen de los resultados presentados en la memoria de tesis, que han sido publicados en cuatro artículos y una carta al editor entre los años 2002 a 2004.

De Semir D, Avinyo A, Larriba S, Nunes V, Casals T, Estivill X, Aran JM.

Quantitative assessment of chimeraplast stability in biological fluids by polyacrylamide gel electrophoresis and laser-assisted fluorescence analysis. *Pharm Res.* **2002**;19(6):914-8.

Hemos desarrollado un método no radiactivo, rápido y fiable para evaluar el porcentaje de degradación de oligonucleótidos (en particular quimeraplastos) en fluidos biológicos usando un quimeraplasto fluorescente de 68nt. Esta metodología nos ha servido para evaluar la influencia del suero presente en el medio de cultivo (LHC-8) de las células IB3.1, de epitelio bronquial aisladas de un paciente con FQ (F508del/W1282X) sobre el metabolismo de un quimeraplasto típico administrado desnudo o complejado con PEI o Citofectina.

Los porcentajes de degradación del quimeraplasto desnudo a las 24h fueron de: 73% en el caso de la incubación con suero fresco, 19% con suero inactivado, 1% con el medio sin suero y 8% con suero "viejo" (guardado a 4°C durante un mes y calentado diariamente a 37°C durante 1h). A las 48h, el porcentaje de degradación aumentó hasta aproximadamente 90% tras la incubación en medio LHC-8 con suero fresco. Se realizaron nuevas incubaciones con un quimeraplasto complejado con PEI o Citofectina en medio LHC-8 con suero fresco. La PEI confirió más protección frente a la degradación que la Citofectina (47% de degradación *versus* 77% respectivamente). Las separaciones electroforéticas en gel desnaturizante de poliacrilamida del quimeraplasto fluoresceinado extraído de las distintas incubaciones y los análisis mediante GeneScan revelaron la actividad exonucleolítica 3' al detectarse metabolitos de 54nt de quimeraplasto. Se evidenció además una región de 25nt que fue resistente a degradación y que justamente coincide con la región quimérica de 25nt del quimeraplasto conteniendo los ribonucleótidos 2'-O-metil modificados y que flanquean a los 5 nucleótidos de DNA incluido el nucleótido mutador.

De Semir D, Petriz J, Avinyo A, Larriba S, Nunes V, Casals T, Estivill X, Aran JM. Non-viral vector-mediated uptake, distribution, and stability of chimeraplasts in human airway epithelial cells. *J Gene Med.* **2002**; 4(3):308-22.

Hemos optimizado la incorporación de un quimeraplasto fluoresceinado y complejo con PEI, Citofectina o GenePorter mediante citometría de flujo bajo distintas condiciones de cultivo (temperatura, presencia de policationes y densidad celular). Además, la distribución intracelular y colocación con marcadores endocíticos se evaluó por microscopía confocal. En las células IB3.1, la incorporación del quimeraplasto fluorescente fue cercana al 100% de eficiencia con PEI y Citofectina, localizándose además en el núcleo de las células. Sin embargo, los lipoplejos de GenePorter quedaron retenidos en el citoplasma por lo que se descartó este vector de transfección en los experimentos posteriores. La incubación de las células a 4°C redujo considerablemente la incorporación de los poliplexos de PEI pero no afectó a la internalización de los lipoplejos de Citofectina. De los policationes testados, únicamente el Polibreno incrementó en 6 veces la incorporación de los lipoplejos de Citofectina pero no produjo ningún efecto en el caso de los poliplexos de PEI. Una elevada densidad celular (90-100%) sólo redujo la transfección de los lipoplejos de Citofectina. En lo concerniente a la cinética de incorporación, los lipoplejos de Citofectina fueron internalizados dos veces más rápido (60 min, mediante fagocitosis) que los poliplexos de PEI (120 min, mediante endocitosis). También hemos analizado la estabilidad intracelular y extracelular del quimeraplasto complejo con PEI y Citofectina mediante fraccionamiento en gel desnaturante de poli(acrilamida). De esta manera, hemos evidenciado que la degradación del quimeraplasto es superior en lisados celulares que en sobrenadantes para ambos vectores de transfección y que la Citofectina parece conferir mayor protección global frente a degradación por suero y células epiteliales que la PEI.

De Semir D, Nadal M, Gonzalez JR, Larriba S, Avinyo A, Nunes V, Casals T, Estivill X, Aran JM.

Suitability of oligonucleotide-mediated cystic fibrosis gene repair in airway epithelial cells. *J Gene Med.* **2003**;5(7):625-39.

Hemos puesto a punto la técnica de PCR-OLA para cuantificar el porcentaje de corrección de la mutación W1282X (exón 20 del gen *CFTR*) y corroborado la competencia reparadora de las células IB3.1 mediante el ensayo *in vitro* en *E. coli* y el plásmido pK^sm4021 que contiene el gen de resistencia a ampicilina y el gen de

resistencia a kanamicina inactivado por una mutación puntual (ver “14. Ensayo *in vitro* para evaluar la competencia reparadora de las células IB3.1 y otras líneas celulares”). Hemos transfectado distintos quimeroplastos de 68nt y 80nt (con PEI o Citofectina) y oligonucleótidos monocadena de 25nt con 5 enlaces fosforotioato en sus extremos (con PEI, Citofectina o electroporación):

los primeros quimeroplastos (CSO-1 y CSO-1C) tenían la estructura clásica de 68nt y fueron diseñados contra ambas cadenas del locus W1282X. El tercer quimeroplasto (CSO-2) contenía dos regiones de 12 ribonucleótidos 2'-O-metil modificados flanqueando 7 nucleótidos de DNA por lo que la estructura optimizada fue de 80nt. El último quimeroplasto (CSO-3) fue diseñado para contener una cadena de RNA 2'-O-metil modificado y complementaria al DNA diana y la otra cadena de DNA con el nucleótido mutador. Sin embargo, ni los distintos quimeroplastos ni los oligonucleótidos monocadena modificados indujeron reparación de la mutación W1282X. El porcentaje de alelo salvaje en el locus W1282X no fue significativamente diferente al porcentaje obtenido en las células control no tratadas según la metodología de PCR-OLA.

De Semir D, Aran JM.

Misleading gene conversion frequencies due to a PCR artifact using small fragment homologous replacement. *Oligonucleotides*. **2003**;13(4):261-9.

En este estudio hemos propuesto un modelo según el cual los fragmentos SFHR generados mediante amplificación por PCR de un plásmido conteniendo un inserto con el exón 10 del gen *CFTR* salvaje y electroporados en las células IB3.1 (F508del/W1282X) para corregir la mutación F508del (exón 10 del gen *CFTR*), actuarían de cebadores en las reacciones de PCR utilizadas para determinar el porcentaje de corrección mediada por estos fragmentos. Sugerimos diseñar adecuadamente la metodología de detección por PCR de la corrección génica y utilizar cebadores cuyas secuencias no coincidan con la de los fragmentos SFHR.

Aran JM, De Semir D.

Response. *Oligonucleotides*. **2004**;14(2):158-60.

Esta respuesta a los editores de la revista “Oligonucleotides” aparece a raíz de las consideraciones recibidas por parte de Dieter C. Gruenert y otros investigadores tras la publicación del artículo anterior en el que describimos que los fragmentos SFHR podrían participar como cebadores en las reacciones de PCR y por lo tanto generar artefactos de PCR que sobreestimen los porcentajes de corrección determinados.

Quantitative Assessment of Chimeraplast Stability in Biological Fluids by Polyacrylamide Gel Electrophoresis and Laser-Assisted Fluorescence Analysis

David de Semir,¹ Anna Avinyó,¹ Sara Larriba,¹ Virginia Nunes,¹ Teresa Casals,¹ Xavier Estivill,¹ and Josep M. Aran^{1,2}

Received December 20, 2001; accepted March 1, 2002

KEY WORDS: chimeraplast; electrophoretogram; fluorescence analysis; oligonucleotide degradation.

INTRODUCTION

Synthetic oligonucleotides are becoming very important tools in biomedicine. Recent advances in oligonucleotide chemistry enable remodeling of their structural units for a wide variety of applications, ranging from basic research to diagnosis and therapy (1). In the therapeutic area, antisense oligonucleotides and ribozymes were the first to be developed for inhibition of gene expression at the transcriptional level, which led to the initiation of clinical trials (2,3). Recently, an antisense oligonucleotide has been approved for the treatment of human cytomegalovirus-induced retinitis (4). Anti-gene strategies using triplex-forming oligonucleotides (TFO) are also becoming useful alternatives to block sequence-specific transcription (5). Moreover, in recent years several oligonucleotide-mediated gene targeting approaches have been envisioned with the purpose of *in situ* mutation correction on genomic DNA (6). One of these approaches is based on the use of hybrid RNA/DNA oligonucleotides, termed "chimeraplasts." These molecules are capable of recognizing and reverting both point and frameshift mutations in cells and animal and plant models by induction of their endogenous mismatch repair mechanisms. Thus, preliminary assays have indicated the huge therapeutic potential of chimeraplasts in the treatment of genetic defects (for a review, see Ref. 7).

A necessary step for the success of oligonucleotide-based therapeutics is to maintain oligonucleotide integrity as much as possible to preserve their function until the target is reached. To increase performance, a variety of modifications have been introduced to the different bases, the sugar backbone, or the internucleoside linkages forming the oligonucleotide chain (1). Thus, phosphorothioate linkages and 2'-*O*-methyl-oligoribonucleotides seem to avoid extra- and intracellular oligonucleotide degradation. Although some of these analogs (e.g., all-phosphorothioate or -methylphospho-

nate backbones) have considerably improved oligonucleotide stability in a variety of biological fluids, other issues such as poor binding affinity, poor solubility, or deficient penetration through membranes has hampered their performance. Therefore, it is becoming clear that either novel synthetic oligomers such as N3'→P5' phosphoramidates (8) or combinations of the above modifications, termed "mixed backbone oligonucleotides" (MBOs) (9), are needed to enhance oligonucleotide effectiveness for multiple applications.

Metabolism is an essential biochemical process that needs to be evaluated on new oligonucleotide structures to optimize their performance. Because most of the currently modified oligonucleotides are charged molecules, electrophoretic techniques such as polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) on slab gels or, more recently, the more sophisticated and expensive capillary gel electrophoresis (CGE), are commonly used to assess their turnover in biological fluids (1). For detection and analysis, the method of choice usually includes autoradiography of radioactively labeled oligonucleotides. But radioactivity-based methodologies, although quite sensitive, are cumbersome, time-consuming, and require both trained personnel and specific radioactive installations.

We have developed an easy, fast, safe, and reliable non-radioactive method to assess the pattern and to quantify the percentage of oligonucleotide degradation in biological fluids using fluorescent oligonucleotides. The whole procedure can be easily performed either in a small laboratory, if adequate genotyping instrumentation and analysis software is available, or the sample analysis step may be completed in any automatic sequencing and genotyping facility. We have applied this methodology to quantify the effect of serum on chimeraplast degradation.

MATERIALS AND METHODS

Chimeraplast Synthesis and Purification

CFO-1 is a 68-mer RNA/DNA chimeric oligonucleotide (5'-FITC-TCTGCTAGGACCCCCACACTTGTTTTT-TaacaagugugGGGGuccuagcagaGCGCGTTTTTCGCGC-3', where DNA residues are capitalized and 2'-*O*-methyl RNA residues are in lower case). This chimeraplast was synthesized on an 0.2- μ mol scale by using the 1000-Å-wide-pore CPG on an ABI 392 DNA/RNA synthesizer (Perkin Elmer, Foster City, California) by standard phosphoramidite procedure. The coupling time was increased to 5 min for the 2'-*O*-methyl RNA phosphoramidites (Cruachem Ltd., Glasgow, Scotland). Fluorescein phosphoramidite was incorporated at the 5'-end with a coupling time of 5 min. After the synthesis was complete, the product was heated in ethanol/concentrated ammonium hydroxide, 1:3 (vol/vol) for 20 h at 55°C to remove the base-protecting groups. Finally, the fluorescent chimeraplast was PAGE purified as previously described (10). Briefly, crude CFO-1 was resuspended in 7 M urea/10% (vol/vol) glycerol, heated at 70°C, and fractionated on a 15% polyacrylamide/7 M urea gel. The 68-mer band was visualized by UV shadowing over a TLC plate (Merck, Darmstadt, Germany) and sliced out from the gel. Gel slices containing the full-length chimeraplast were crushed and incubated overnight in TE buffer (10 mM Tris-HCl/1 mM EDTA, pH 7.5) to release the oligonucleotide from the polymer. Finally, the chimeraplast-containing solution was separated

¹ Centre de Genètica Mèdica i Molecular, Institut de Recerca Oncològica, Hospital Duran i Reynals, Gran Vía s/n km 2,7 08907, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain.

² To whom correspondence should be addressed. (e-mail: jaran@iro.es)

from the gel pieces by centrifugation through a 0.45- μm spin-filter (Millipore, Bedford, Massachusetts) and desalted through a Sephadex G-25 column (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden), lyophilized, and resuspended in 100 μl of ultrapure water.

Chimeraplast Stability Assays

The stability of CFO-1 (260 nM) was assessed after 24-h and 48-h incubation of the chimeraplast, either naked or complexed with nonviral vectors, in 500- μl LHC-8 medium (Biofluids, Rockville, Maryland), without or with 5% fetal calf serum (FCS). The sources of serum tested were either fresh, stored for 1 month at 4°C with daily warming at 37°C during 1 h (old), or incubated at 56°C for 1 h (inactivated). The incubations were terminated at the indicated times by performing two rounds of phenol/isoamyl alcohol/chloroform (24:1:24) organic extraction of the culture media.

CFO-1/PEI polyplexes were prepared by diluting both the CFO-1 oligonucleotide and ExGen 500 (22 kDa linear polyethylenimine [PEI]; MBI Fermentas, Vilnius, Lithuania) at a 9:1 PEI amine/oligonucleotide phosphate molar ratio (N/P = 9) with 5% dextrose in separate polystyrene tubes up to a volume of 50 μl each. Complexes of an estimated size of 60–100 nm, determined by dynamic light scattering, were formed after adding the PEI vector solution dropwise to the CFO-1 oligonucleotide solution, immediate gentle vortexing to mix, and further incubation for 10 min at room temperature. Generation of CFO-1/cytoskeleton lipoplexes (estimated size of 200–400 nm; N/P ratio of 0.12) was identical to that for the polyplexes, except that both the CFO-1 chimeraplast and 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Cytoskeleton GSV (GS3815/DOPE; 2:1 molar ratio, Glen Research, Sterling, Virginia) were diluted in LHC-8 basal medium previous to complex formation. The ratios of both chimeraplast/PEI and chimeraplast/cytoskeleton complexes had been previously optimized in our laboratory for efficient transfection of different cell lines (unpublished results).

Polyacrylamide Gel Electrophoresis and GeneScan Analysis

A 1:5 aqueous dilution of the deproteinized samples was fractionated directly by slab gel electrophoresis under denaturing conditions (5% polyacrylamide/6 M urea gel) on an ABI PRISM 377 DNA sequencer (Applied Biosystems, Foster City, California). The fluorescent oligonucleotide metabolites separated on the gel were analyzed and automatically quantified (each band as peak height and peak area) by GeneScan software, v. 2.1 (Applied Biosystems).

RESULTS AND DISCUSSION

We have developed an easy, fast, safe, and sensitive method to assess oligomer metabolism in biological fluids using fluorescent oligonucleotides. Previous studies seemed to indicate a high resistance of the chimeraplasts to nucleolytic hydrolysis due to their structural features, including two RNA domains (10-mer) of 2'-O-methyl-protected ribonucleotides and two T-hairpin loops (10) (Fig. 1A). Serum is an important factor affecting oligonucleotide stability in both *in vitro* experiments and *in vivo* assays requiring systemic administration. Therefore, we have used our fluorescent oligonucleotide-based approach to further analyze the influence of the

serum included in the culture medium on the metabolism of a typical chimeraplast, administered either naked or complexed with cationic lipid vesicles (cytofectin) or with the polycation polyethylenimine (PEI). Figure 1B shows the fluorescent degradation patterns of CFO-1 from different samples loaded simultaneously on the denaturing gel. Of note, the excellent resolution of laser-mediated fluorescence detection combined with the fractionation power of PAGE enables single-nucleotide resolution of degradation fragments. Moreover, it should also be possible to detect concatamers formed by end-to-end ligation of chimeraplasts or other oligonucleotides by nondenaturing slab gel electrophoresis using this method. We have determined by dilution experiments that the detection limit of our technique for a reliable oligonucleotide degradation analysis can go down to 10 pM (data not shown). This sensitivity enables its successful application in a variety of *in vitro* and *in vivo* stability experiments. Single-lane automatic quantification of nucleic acid fragment amount by GeneScan software is shown in Fig. 2. The result from electrophoretograms A, B, and C indicates a significant metabolic activity over the CFO-1 chimeraplast after 24 h incubation in LHC-8 culture medium containing 5% fetal calf serum, which increased over time (Table I). Because the LHC-8 human epithelial cell culture medium alone was inert on CFO-1 under the same incubation conditions (electrophoretogram D), the degradation patterns generated must be attributed to the serum present in the medium. This was not surprising, as it is known that ubiquitous nucleases are present in significant amounts in different sources of serum (11). A detailed examination of the analytical profile resulting from incubation of CFO-1 in medium containing fresh serum yielded insight about its metabolism (Fig. 2A). The main right-hand peak represents full-length CFO-1 whereas the immediate metabolite ladder (processive n-1 shortmers) indicates the presence in the serum of 3'-exonucleolytic activity. The corresponding end product is a 54-mer fluorescent oligonucleotide metabolite that lacks the "GC" clamp and one of the T-hairpin loops as compared with the full-length chimeraplast. Another feature of the CFO-1 degradation pattern was the absence of degradation peaks in an intermediate region of about 25 nucleotides. This nuclease-resistant region coincides with the strand of CFO-1 holding the two 10-mer 2'-O-methyl-RNA domains and the intermediate 5-mer mutator region (Fig. 1A). It has been shown that oligonucleotides bearing alkyl modifications in the 2'-position of the β -D-ribofuranosyl moiety are strongly protected against nuclease degradation (9). Simultaneous study of the activity patterns corresponding to 5'- and 3'-exonucleases should also be possible by labeling both ends of the chimeraplast molecule with two different fluorescent dyes of nonoverlapping spectra.

Additionally, the electrophoretogram shown in Fig. 2A revealed the appearance of metabolite peaks that migrated earlier, resulting from cleavage after the 2'-O-methyl-RNA protected region. This discontinuous pattern of metabolite production appeared to be the result of additional CFO-1 degradation by endonucleolytic activity. It has been suggested that modifying oligonucleotide chemistry may also alter the types of nucleolytic activity involved in oligonucleotide metabolism (12). Concomitant with the loss of full-length CFO-1, shortmers were subjected to additional degradation in a time-dependent fashion (data not shown). Moreover, both thermal treatment for complement inactivation and improper

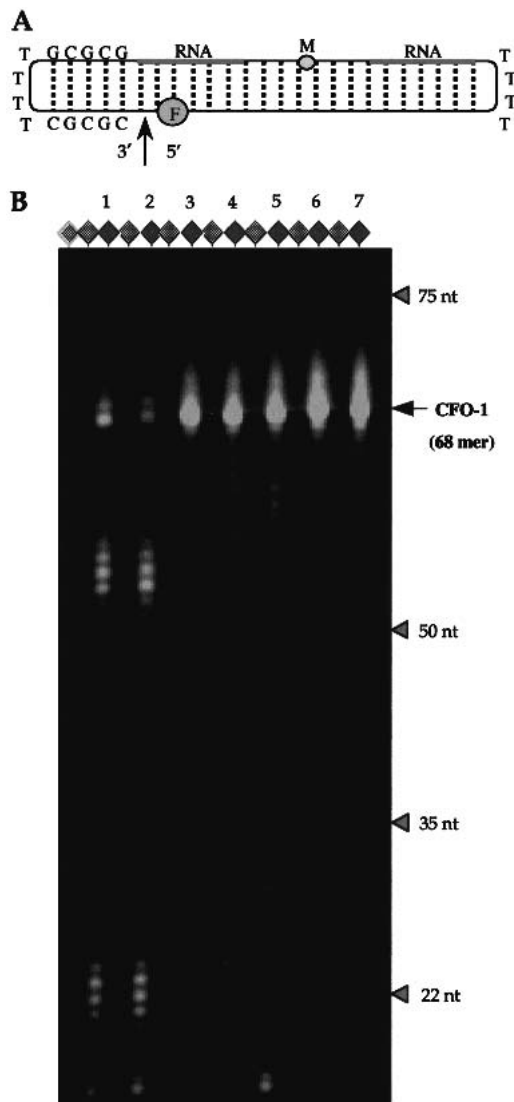


Fig. 1. Schematic representation of a chimeraplast and visualization of CFO-1 chimeraplast degradation patterns. (A) Chimeraplasts are hybrid RNA/DNA oligonucleotides designed for the *in situ* correction of genomic point mutations by specific homologous pairing and mismatch repair stimulation. Two complementary domains of 30 nucleotides, flanked by two T-hairpin loops, which provide stability and prevent concatemerization, compose the original structure of a typical chimeraplast. One of the 30-mer domains carries two 10-mer segments with a 2'-O-methyl RNA backbone flanking the mutator region (5 nucleotides). This intermediate DNA region is completely homologous to the genomic sequence holding the mutation except for the mismatched nucleotide (M). RNA-DNA interactions increase the half-life of the chimeraplast/genomic DNA complex within the cells. Moreover, the 2' modification of the RNA residues protects against enzymatic degradation. For tracking purposes, the 5' end of the chimeraplast has been modified to include a fluorescent FITC molecule (F). The arrow indicates the strand break allowing interwinding of the oligonucleotide and its target. (B) Digitized gel image of the CFO-1 chimeraplast fluorescent degradation patterns. Lanes 1 and 2, CFO-1 incubated for 24 h and 48 h, respectively, in medium containing 5% fresh FCS; lanes 3 and 4, CFO-1 incubated for 24 h and 48 h, respectively, in medium containing 5% old FCS; lane 5, CFO-1 incubated for 24 h in medium containing 5% inactivated FCS; lane 6, CFO-1 incubated for 24 h in medium without FCS; lane 7, CFO-1 oligonucleotide control. TAMRA-labeled GeneScan-500 size standards are marked on the right. The arrow indicates the position of the 68-mer full-length CFO-1 chimeraplast.

long-term storage of fetal calf serum seemed to abrogate exo- and endonuclease activities to a great extent (Fig. 2B and Table I). Santana *et al.* (13) studied intracellular chimeraplast stability in different epithelial cell lines and showed about the same amount of intact and degraded ^{32}P end-labeled RNA/DNA oligonucleotide at 24–48 h posttransfection. However, a true quantitative analysis of chimeraplast metabolism was lacking in their analysis. This was likely due to the poor resolution of the radiolabeled gel obtained, which also made impossible the assessment of the corresponding nuclease degradation patterns.

Our results indicate that the CFO-1 chimeraplast is unstable in contact with serum, contrarily to what has been reported (10). Thus, the possibility of significant chimeraplast metabolism should be taken into account to assess the efficiency and efficacy of these chimeric RNA/DNA molecules in targeted gene correction assays, either *in vitro* or *in vivo*. The source and condition of the serum component in the culture medium that Yoon *et al.* (10) used in the *in vitro* experiments clearly could have influenced the degree of metabolism of the chimeraplasts, as we have shown by incubation of CFO-1 either with fresh, old, or complement-inactivated serum (Table I). Alternatively, considering the model structure of chimeraplasts as a double hairpin A-form helix (14), the close proximity of their 5'- and 3'-ends and the rather bulky fluorescein label attached to the 5'-end of CFO-1 could have destabilized the chimeraplast, making its 3'-end more accessible to exonuclease degradation. Nevertheless, the CFO-1 oligonucleotide proved to be useful in analyzing different cell culture conditions for susceptibility to chimeraplast degradation.

Additionally, we noted that complexing the chimeraplasts either with PEI or with the cationic lipid cytofectin, which have been used previously in chimeraplast-mediated correction experiments (7), resulted in partial CFO-1 protection against serum nucleases only when presented in the form of PEI polyplexes (Table I). The CFO-1 degradation pattern obtained when complexed with the nonviral vectors was similar to that obtained if incubated naked (data not shown). It is well-known that nonviral carrier systems can confer some degree of nucleic acid protection against nuclease degradation. Biophysical and biochemical parameters influencing cytofectin/chimeraplast and PEI/chimeraplast complex assembly, compactation, aggregation, size, and charge distribution are likely playing an important role in chimeraplast stability toward biological fluids. Indeed, a recent study suggested that PEI but not cationic lipid improved both stability and antisense activity of 3'-capped phosphodiester oligonucleotides (15).

Thus, avoiding as much as possible the nuclease activity present in the serum (e.g., by complement inactivation) or using serum-free media should be desirable in *in vitro* experiments aimed to test uptake and *in situ* mutation repair efficacy of different chimeraplast structures. Further chimeraplast protection, especially for *in vivo* assays, could be conferred by improved galenics, either using novel nonviral vectors with full protection capabilities or by modifying the oligonucleotide chemistry.

All together, these results confirm the validity of our approach for the study of oligonucleotide stability in biological fluids. Additional features make this method more suitable than conventional radioactivity-labeling protocols to assess oligo-

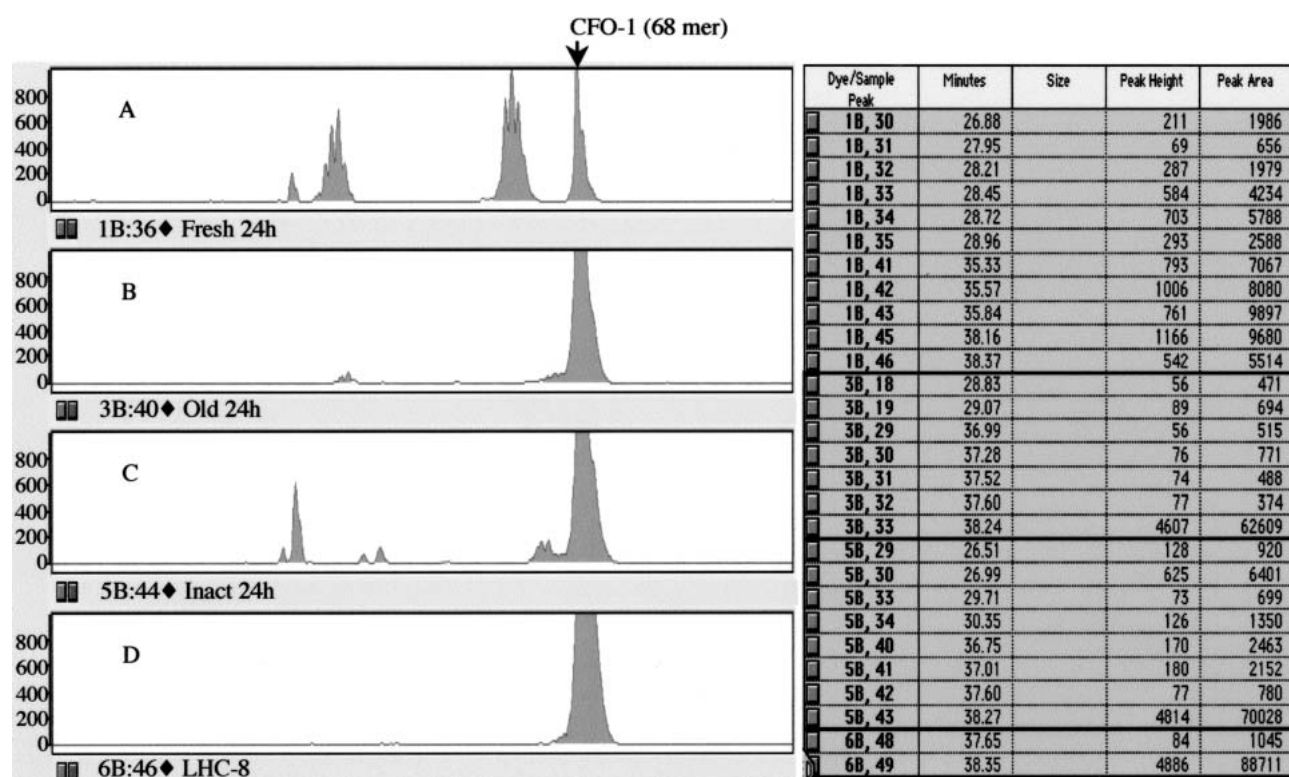


Fig. 2. Quantitative assessment of CFO-1 chimera degradation by GeneScan analysis. GeneScan expanded view of single-lane electrophoretograms for automatic determination of CFO-1 chimera degradation. Results shown in tabular form include elution time and amount of fluorescence signal in peak height and peak area. Internal-lane size standards have been omitted in the electrophoreses to avoid the possibility of cross-talk between dyes, which could interfere in the quantitative analysis. Electrophoretograms displayed correspond to some of the samples run on the Fig. 1 gel: (A) CFO-1 after 24-h incubation in medium containing 5% fresh FCS; (B) CFO-1 after 24-h incubation in medium containing 5% old FCS; (C) CFO-1 after 24-h incubation in medium containing 5% inactivated FCS; (D) CFO-1 after 24-h incubation in medium without FCS. For each of the sample profiles, all peak height values below 50 were considered background and therefore were not included in the relative quantification analyses.

nucleotide degradation. Fluorescence-labeled oligonucleotides are usually more stable than radiolabeled oligonucleotides, which makes the former more economic, safer, and less bothersome for repeated use. Moreover, GeneScan automated fluorescent analysis enables the simultaneous study of up to four different oligonucleotide structures in the same sample without interference by labeling them with four different fluorescent labels, visualized as blue, green, yellow, and red.

In conclusion, our method combines the excellent per-

formance of slab gel electrophoresis, downward to single-nucleotide resolution, with a broad linear dynamic range of fluorescence laser detection and the analytical power of GeneScan software for quantitative assessment of oligonucleotide degradation, without the need for radioactivity and autoradiography. The reliability and simplicity of this approach should be valuable in a variety of pharmacokinetic experiments directed to the development of more efficacious oligonucleotide-based therapeutics.

Table I. CFO-1 Chimera Stability in Culture Medium under Different Serum Conditions

Sample	% CFO-1 oligo degradation ^a	
	24 h	48 h
CFO-1 + LHC-8 with 5% fresh FCS	73 (± 5)	89 (± 3)
CFO-1 + LHC-8 with 5% old FCS	8 (± 7)	11 (± 10)
CFO-1 + LHC-8 with 5% inactivated FCS	19 (± 7)	n.d.
CFO-1 + LHC-8 without FCS	1 (± 1)	n.d.
CFO-1/PEI + LHC-8 with 5% fresh FCS	47 (± 6)	80 (± 9)
CFO-1/cytofectin + LHC-8 with 5% fresh FCS	77 (± 6)	89 (± 9)

Note: n.d.: not determined; SD: standard deviation.

^a CFO-1 oligonucleotide degradation was calculated as the sum of all fluorescent peaks of a given electrophoretogram sample excluding the peak from full-length CFO-1, divided by the sum of all fluorescent peaks from the sample including the peak from full-length CFO-1, and given as a percentage mean (\pm SD) of three different experiments.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grant 98/1610 from Fundació La Marató de TV3 and by Associació Catalana de Fibrosi Quística.

REFERENCES

1. R. Schlingensiepen, W. Brysch, and K.-H. Schlingensiepen. *Antisense—From Technology to Therapy*, Blackwell Science, Berlin, 1997.
2. A. Webb, D. Cunningham, F. Cotter, P. A. Clarke, F. di Stefano, P. Ross, M. Corbo, and Z. Dziewanowska. BCL-2 antisense therapy in patients with non-Hodgkin lymphoma. *Lancet* **349**: 1137–1141 (1997).
3. F. Wong-Staal, E. M. Poeschla, and D. J. Looney. A controlled, Phase 1 clinical trial to evaluate the safety and effects in HIV-1 infected humans of autologous lymphocytes transduced with a ribozyme that cleaves HIV-1 RNA. *Hum. Gene Ther.* **9**:2407–2425 (1998).
4. S. T. Crooke. Vitravene—another piece in the mosaic. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* **8**:vii–viii (1998).
5. P. P. Chan and P. M. Glazer. Triplex DNA: Fundamentals, advances, and potential applications for gene therapy. *J. Mol. Med.* **75**:267–282 (1997).
6. T. M. Woolf. Therapeutic repair of mutated nucleic acid sequences. *Nat. Biotechnol.* **16**:341–344 (1998).
7. M. C. Rice, K. Czymmek, and E. B. Kmiec. The potential of nucleic acid repair in functional genomics. *Nat. Biotechnol.* **19**: 321–326 (2001).
8. S. M. Gryaznov. Oligonucleotide N3'→P5' phosphoramidates as potential therapeutic agents. *Biochim. Biophys. Acta* **1489**:131–140 (1999).
9. S. Agrawal and E. R. Kandimalla. Antisense therapeutics: Is it as simple as complementary base recognition? *Molec. Med. Today* **6**:72–80 (2000).
10. K. Yoon, A. Cole-Strauss, and E. B. Kmiec. Targeted gene correction of episomal DNA in mammalian cells mediated by a chimeric RNA-DNA oligonucleotide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **93**:2071–2076 (1996).
11. P. Verspiere, A. W. C. A. Cornelissen, N. T. Thuong, C. Hélène, and J. J. Toulmé. An acridine-linked oligodeoxynucleotide targeted to the common 5' end of trypanosome mRNAs kills cultured parasites. *Gene* **61**:307–315 (1987).
12. R. M. Crooke, M. J. Graham, M. J. Martin, K. M. Lemonidis, T. Wyrzykiewicz, and L. L. Cummins. Metabolism of antisense oligonucleotides in rat liver homogenates. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **292**:140–149 (2000).
13. E. Santana, A. E. Peritz, S. Iyer, J. Uitto, and K. Yoon. Different frequency of gene targeting events by the RNA-DNA oligonucleotide among epithelial cells. *J. Invest. Dermatol.* **111**:1172–1177 (1998).
14. S. Ye, A. Cole-Strauss, B. Frank, and E. B. Kmiec. Targeted gene correction: A new strategy for molecular medicine. *Molec. Med. Today* **4**:431–437 (1998).
15. S. Dheur, N. Dias, A. van Aerschot, P. Herdewijn, T. Bettinger, J. S. Remy, C. Helene, and E. T. Saison-Behmoaras. Polyethylenimine but not cationic lipid improves antisense activity of 3'-capped phosphodiester oligonucleotides. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* **9**:515–525 (1999).

Non-viral vector-mediated uptake, distribution, and stability of chimeraplasts in human airway epithelial cells

David de Semir¹
Jordi Petriz^{2†}
Anna Avinyó^{1‡}
Sara Larriba¹
Virginia Nunes¹
Teresa Casals¹
Xavier Estivill¹
Josep M. Aran^{1*}

¹*Centre de Genètica Mèdica i Molecular, Institut de Recerca Oncològica, Hospital Duran i Reynals, 08907 L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain*

²*Departament de Criobiologia i Teràpia Cel·lular, Institut de Recerca Oncològica, Hospital Duran i Reynals, 08907 L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain*

*Correspondence to: Dr J. M. Aran, Centre de Genètica Mèdica i Molecular, Institut de Recerca Oncològica (IRO), Hospital Duran i Reynals, Gran Vía s/n, 08907 L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain.
E-mail: jaran@iro.es

†Current address: Servei d'Hemoteràpia i Hemostàsia, IDIBAPS, Hosp. Clinic, Univ. Barcelona, Villarroel, 170, 08036 Barcelona, Spain.

‡Current address: Institut de Biologia Molecular de Barcelona, CID, CSIC, Jordi Girona, 18–26, 08034 Barcelona, Spain.

Received: 1 October 2001
Revised: 7 January 2002
Accepted: 9 January 2002

Abstract

Background Chimeraplasty is a novel methodology that uses chimeric RNA/DNA oligonucleotides (chimeraplasts) to stimulate genomic DNA repair. Efficient uptake and nuclear localization of intact chimeraplasts are key parameters to achieve optimal correction of mutation defects into specific cell types.

Methods A 5'-end FITC-labeled 68-mer RNA/DNA oligonucleotide was complexed with the polycation polyethylenimine (PEI) and the cationic lipids Cytofectin and GenePorter. Flow cytometry was employed to evaluate chimeraplast uptake under different conditions. Intracellular chimeraplast distribution and co-localization with endocytosis markers were assessed by confocal microscopy. Relative quantification of chimeraplast metabolism was performed by denaturing PAGE and GeneScan[™] analysis.

Results In airway epithelial cells, optimized chimeraplast uptake reached near 100% efficiency with the carriers tested. However, chimeraplast nuclear localization could only be achieved using PEI or Cytofectin. Chimeraplast/GenePorter lipoplexes were retained in the cytoplasm. PEI polyplexes and Cytofectin lipoplexes displayed different uptake rates and internalization mechanisms. Chimeraplast/PEI polyplexes were internalized at least partially by fluid-phase endocytosis. In contrast, phagocytosis may have contributed to the internalization process of large-sized chimeraplast/Cytofectin lipoplexes. Moreover, significant chimeraplast degradation was detected 24 h after transfection with both PEI polyplexes and Cytofectin lipoplexes, although the latter seemed to confer a higher degree of protection against nuclease degradation.

Conclusion Both Cytofectin and PEI are efficient for chimeraplast nuclear uptake into airway epithelial cells. However, despite the distinct structures and trafficking pathways of the corresponding complexes, none of them could prevent nuclease-mediated metabolism of the chimeric oligonucleotides. These findings should be taken into account for future investigations of chimeraplast-mediated gene repair in airway epithelial cells. Copyright © 2002 John Wiley & Sons, Ltd.

Keywords chimeraplast; uptake; fluorescence analysis; bronchial epithelial cells

Introduction

Current gene therapy approaches for the treatment of genetic diseases are based on the addition of an intact copy of a therapeutically relevant gene to supply the abnormal function from the corresponding endogenous mutated gene. However, initiation of pre-clinical and clinical assays using this modality have revealed important hurdles, such as the potential for insertional mutagenesis into an unwanted locus, unreliable persistence of transgene expression, and lack of physiological gene regulation [1,2]. To overcome these limitations, novel strategies for *in situ* mutation correction have emerged recently, based on the principles of homologous recombination and gene repair [3–5]. Among them, chimeraplasty, the use of hybrid RNA/DNA oligonucleotides for *in situ* repair of both point mutations and single base-pair insertions and deletions at the genomic DNA level, has become the most frequently used and successful strategy for phenotypic reversion of hereditary defects [6–11]. But although a proof-of-principle for chimeraplast performance has been established for a variety of diseases, the ultimate mechanism underlying chimera-mediated repair is still unknown. Moreover, chimeraplasty has been charged with lack of consistency and general applicability to different cell types [12]. Finally, many technical challenges, such as further optimization of chimeraplast structure and quality, and the improvement of its nuclear uptake to increase the frequency of gene repair, must be overcome before this promising technology can move from bench to bedside.

Non-viral vectors, such as polycations and cationic lipids, are being employed to deliver recombinant and synthetic nucleic acids to different cell types, both *in vitro* and *in vivo* [13]. Improved galenics and novel non-viral vector formulations are capable of increasing the efficiency of nucleic acid delivery with reduced toxicity for specific cell types. Still a major hurdle of this technology is the limited nuclear uptake of intact DNA (and/or oligonucleotides), which prevents their full performance [14,15]. This aspect is essential for chimeraplasty, because a critical oligonucleotide concentration in the nucleus of the target cells must be reached for homologous pairing and further stimulation of the endogenous gene repair mechanisms [16]. Non-viral vectors have been used for chimera-directed gene repair [6–11]; however, there is no detailed analysis of the behavior and optimization of chimeraplast uptake, distribution, and stability using these carriers.

In this study, we have examined the above parameters in human airway epithelial cells, which are relevant for several hereditary diseases affecting the lung, such as cystic fibrosis and α_1 -antitrypsin deficiency. Epithelial cells have been successfully corrected in previous chimeraplast studies [10,17,18]. Knowledge of the internalization mechanism and intracellular fate of chimeric oligonucleotide-containing polyplexes and lipoplexes is

a prerequisite for the further development of efficient chimeraplast-based gene repair protocols.

Materials and methods

Chimeraplast synthesis

The fluorescent chimeraplast SFO-1 (68-mer), FITC-5'-TTTGCAACAGTGGAGGAAAGCCTTTTTTTTaaaggcuuucCTCCAcuguugcaaaGCGCGTTTTTCGCGC-3', where the lower case letters indicate 2'-O-methyl ribonucleosides, was synthesized on a 1.0 μ mol scale using the 1000-Å-wide-pore CPG support on an ABI 392 DNA/RNA synthesizer (Perkin Elmer, Foster City, CA, USA) by the standard phosphoramidite procedure. The coupling time was increased to 5 min for the 2'-O-methyl RNA phosphoramidites (Cruachem Ltd., Glasgow, UK). Fluorescein phosphoramidite was incorporated at the 5'-end with a coupling time of 5 min. Finally, the crude chimeric RNA/DNA oligonucleotide was electrophoresed on a 15% polyacrylamide gel containing 7 M urea. The fractionated chimeraplast was visualized using ultraviolet shadowing, sliced from the gel, and eluted overnight in TE buffer (10 mM Tris-HCl/1 mM EDTA, pH 7.5) with shaking. The eluant was separated from the crushed gel pieces by centrifugation through a spin filter (SPIN-X; Corning, NY, USA) and desalted with a G-25 column (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden). The aqueous fractions containing the purified oligonucleotide were pooled, lyophilized, resuspended in water, and stored at -20°C until its use. More than 98% of the purified oligonucleotide was full length. Oligonucleotide concentrations were determined spectrophotometrically using a conversion factor of 33 $\mu\text{g}/\text{ml}$ per $A_{260\text{ nm}}$ unit.

Cell culture and chimeraplast transfections

The cystic fibrosis bronchial epithelial cell line IB3.1 [19] was cultured in 'CF medium': LHC-8 basal medium (Biofluids, Rockville, MD, USA) containing 100 U/ml penicillin/streptomycin (Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA), 0.2 mg/ml imipenem (Merck, West Point, PA, USA), 80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ tobramycin (Eli Lilly, Indianapolis, IN, USA), 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ fungizone (Life Technologies), and 5% fetal calf serum (FCS).

Chimeraplast-containing polyplexes were generated by diluting both the SFO-1 oligonucleotide and ExGen 500[®] [22 kD linear polyethylenimine (PEI)] (Euro-medex, Souffelweyersheim, France) with 5% dextrose in separate polystyrene tubes up to a volume of 50 μl each. Complexes were formed after adding the PEI vector solution to the SFO-1 oligonucleotide solution, immediate vortexing to mix, and further incubation for 10 min at room temperature. The generation of chimeraplast-containing lipoplexes was similar to that for the polyplexes, except that the SFO-1 oligonucleotide and either Cytofectin GSV[®] (GS 3815/DOPE; 2:1 molar ratio)

(Glen Research, Sterling, VA, USA) or GenePorter[®] (XG 40/DOPE; 2 : 1 molar ratio) (Gene Therapy Systems, San Diego, CA, USA) were diluted in LHC-8 basal medium before complex formation.

For polyplex- or lipoplex-mediated chimeraplast transfection, the IB3.1 cells were grown to 60–70% confluency in a six-well plate. Prior to PEI- and Cytofectin-mediated transfection, the medium from the cells was replaced with 900 μ l of fresh medium with FCS. Complexes (100 μ l) were added dropwise to the cells with gentle swirling of the plate. For GenePorter transfection, both the lipid and the chimeraplast were diluted separately up to 500 μ l each with LHC-8 basal medium. These dilutions were mixed and incubated for 10 min at room temperature. Finally, the cell supernatant was replaced by the chimeraplast/GenePorter lipoplex solution.

Subsequently, in all cases the plates were centrifuged for 5 min at 280 g and returned to the CO₂ incubator. Two hours after transfection, the wells were each filled with 2 ml of serum-containing medium, unless otherwise indicated (for GenePorter transfected cells, the transfection medium was also supplemented with 5% FCS). Finally, at 16 h post-transfection, the cell supernatants were replaced with fresh CF medium.

Flow cytometry

Multi-parameter flow cytometry analysis is a sensitive and quantitative method for cellular uptake assessment of fluorescence-labeled oligonucleotide complexes under different conditions [20,21]. Thus, flow cytometric assays were performed on an EPICS XL-MCL (Coulter Electronics, Hialeah, FL, USA), using an air-cooled 15 mW argon laser (Cyomics, Hialeah, FL, USA) operating at a wavelength of 488 nm. Briefly, cells were trypsinized, rinsed three times with PBS without Ca²⁺ and Mg²⁺, resuspended at 5 \times 10⁵ per ml in cold PBS plus 1% BSA and 0.1% NaN₃, and analyzed directly for fluorescent oligonucleotide content. Simultaneous staining with the non-permeable dye propidium iodide (5 μ g/ml, added to the cells 10 min prior to acquisition) ensured the gating of viable cells and gave us a good estimate of the toxicity of different non-viral vector/chimeraplast combinations. Forward scatter and side-scatter were collected on a linear scale and were used to exclude dead cells and cell aggregates. Green fluorescence was measured through a band pass (BP) 525 nm filter, and red fluorescence through a BP 620 nm filter. Analyses were carried out using EPICS XL-MCL Workstation Software Ver. 2.0 (Coulter Electronics) and CellQuest Software (Becton-Dickinson, Research Triangle Park, NC, USA).

Confocal microscopy

To analyze the localization and trafficking of fluorescent non-viral vector/chimeraplast complexes, the IB3.1 cells were grown at 60–70% confluency on glass coverslips

introduced into wells of six-well plates and transfected as described in the previous section. At the end of the uptake schedule, the cells were washed twice with PBS and fixed for 10 min in 4% paraformaldehyde at 4°C to avoid cell shrinkage and distortion by the laser beam. This fixative has been shown to preserve intracellular oligonucleotide localization over other strong fixatives, such as methanol or acetone, giving a labeling distribution analogous to that observed on living cells [22]. Next, cells were washed again with PBS and incubated with 1 μ M of the nuclear dye TO-PRO-3 (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) for 30 min at room temperature. Finally, cells were washed twice more with PBS and mounted in water-soluble glycerol gelatin mounting medium (Merck, Darmstadt, Germany).

Receptor-mediated endocytosis was assessed by marker co-localization, treating the cells in 'pre-incubation medium' (LHC-8 basal medium plus 1 mg/ml BSA) for 1 h before transfection. SFO-1 transfection was performed as described in the previous section, using the above 'pre-incubation medium'. Immediately after the addition of the polyplexes or the lipoplexes to the cells and before the centrifugation step, TRITC-transferrin (200 nM) (Molecular Probes) was added to each time-point well. Fluid-phase marker co-localization was assessed by adding TRITC-dextran (M_r ~30,000) (Molecular Probes) at 0.4 mg/ml in the transfection supernatant of each time-point well just before the centrifugation step. In the co-localization experiments, TO-PRO-3 nuclear staining was avoided because of its spectral overlap with TRITC.

Confocal microscopy was performed in a Leica DMRB microscope, using a Leica TCS-NT scanning module (Leica Microsystems Heidelberg GmbH, Germany) equipped with a 488 nm krypton-argon laser and coupled to a computerized imaging system.

Oligonucleotide stability analysis

The stability of SFO-1 (260 nM) was determined in both supernatants and cell extracts at 24 h and 48 h post-transfection. Cells were harvested by trypsinization, washed in PBS, and lysed in 100 μ l of 'oligo lysis medium' (10 mM Tris-HCl, pH 7.5; 0.5 mM MgCl₂; 0.5% Triton X-100). Cell extracts were obtained after two rounds of freeze-thawing plus centrifugation at 12 000 rpm for 5 min. Both supernatants and cell extracts were deproteinized by performing two rounds of phenol/isoamyl alcohol/chloroform (24:1:24) organic extraction. A 1:5 aqueous dilution of the resulting samples was fractionated directly by slab gel electrophoresis under denaturing conditions (5% polyacrylamide/6 M urea gel) on an ABI PRISM 377 DNA sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The fluorescent oligonucleotide metabolites separated on the gel were analyzed and relatively quantified by GeneScan[™] software, v. 2.1 (Applied Biosystems).

Results

Optimization of chimeraplast uptake into IB3.1 cells

To achieve maximum cellular uptake of a 5'-end FITC-labeled SFO-1 chimeric oligonucleotide into the human bronchial epithelial cell line IB3.1, we tested the performance of three non-viral vectors: the cationic lipid vesicles XG 40/DOPE (GenePorter) and GS 3815/DOPE (Cytofectin), and the polycation linear polyethylenimine (PEI) of 22 kD (ExGen 500). To quantify the uptake of this chimeric oligonucleotide mediated by the corresponding lipoplexes and polyplexes, we carried out a flow cytometry analysis on the treated IB3.1 cells. Optimization of SFO-1 cellular uptake started by assaying different vector to chimeraplast ratios for increased FITC fluorescence and decreased PI fluorescence present on the transfected cells. Figure 1 shows the performance of

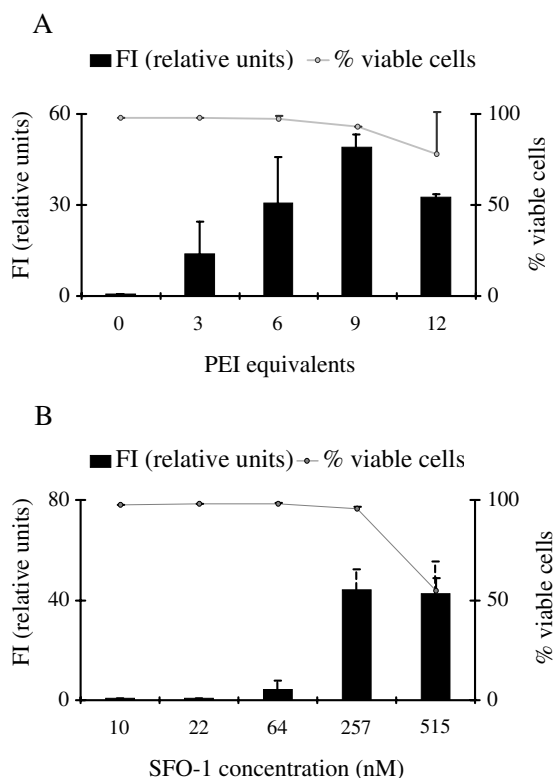


Figure 1. The chimeraplast/PEI ratio influences both polyplex uptake and viability on IB3.1 cells. Fluorescent SFO-1 chimeraplast uptake into IB3.1 cells was analyzed by flow cytometry 24 h after transfection, as indicated in the Materials and methods section. Simultaneous treatment of the transfected cells with the red dye propidium iodide allowed the assessment of the cytotoxicity produced by polyplex treatment. Polyplex compositions were achieved by complexing (A) increasing amounts of PEI, given in equivalents of PEI nitrogen per chimeraplast phosphate, with 260 nM SFO-1. The column indicating 0 equivalents of PEI refers to the uptake of 260 nM naked SFO-1 chimeraplast; and (B) increasing concentrations of SFO-1, with 9 equivalents of PEI. Values shown are the means \pm SD from three independent experiments. FI = green fluorescence intensity from the SFO-1 chimeraplast

SFO-1/PEI polyplexes on IB3.1 cells. Thus, 260 pmol of SFO-1 complexed with 9 PEI equivalents in a volume of 1 ml gave the maximum chimeraplast incorporation (enhancement of about 50-fold compared with the uptake of SFO-1 alone) with minimal toxicity. An analogous analysis performed with the cationic lipids Cytofectin and GenePorter also gave optimized ratios of SFO-1 (260 nM) to lipidic vector (2.5 μ g/ml, corresponding to a charge ratio of 0.12 for Cytofectin; 5 μ l, corresponding to a charge ratio of 1.3 for GenePorter). More than 95% of the IB3.1 cells incorporated the SFO-1 chimeraplast using both PEI and GenePorter, whereas only 70–80% of the cells incorporated SFO-1 using Cytofectin (Figure 2).

We also analyzed the influence of the serum towards the non-viral vector-mediated uptake of the SFO-1 chimeraplast on IB3.1 cells. While the uptake of GenePorter lipoplexes was improved in the absence of serum, the lipoplexes of Cytofectin behaved similarly either with or without serum and the PEI polyplexes clearly showed an increased SFO-1 uptake in medium with 5% fetal calf serum (Figure 3). Therefore, the last two vectors may be more suitable for *in vivo* chimeraplast systemic administration.

Kinetics of chimeraplast incorporation into IB3.1 cells

A key factor for the efficiency of chimeraplast performance is the speed of polyplex and lipoplex incorporation into IB3.1 cells, which influences both cell toxicity and chimeraplast stability. We used flow cytometry to assess the relative amount of cell-associated SFO-1 at different times post-transfection, when delivered with the different non-viral vectors. In all cases, chimeraplast uptake into IB3.1 cells followed Michaelis–Menten-like progress curves (Figure 4). However, both lipoplexes were incorporated faster (half saturation time of \sim 52 min for Cytofectin and \sim 60 min for GenePorter), displaying a similar time course of uptake to that obtained for DMRIE/DOPE-mediated DNA entry into COS cells [14], or for polyaminolipid-mediated oligonucleotide entry into Vero cells [23]. Polyplexes of PEI showed a slower SFO-1 uptake (half saturation time of \sim 121 min).

Intracellular distribution of chimeraplast into IB3.1 cells

To assess the intracellular distribution of fluorescently labeled chimeraplast on transfected IB3.1 cells, we used laser scanning confocal microscopy. The nucleus is the ultimate subcellular target for chimeraplast performance; therefore the fairly good lipoplex- and polyplex-mediated SFO-1 cellular incorporation assessed by flow cytometry should be translated into appreciable nuclear accumulation of the chimeraplast. To unequivocally determine non-viral vector-mediated intranuclear localization of the chimeraplast, the nuclei of the treated cells were

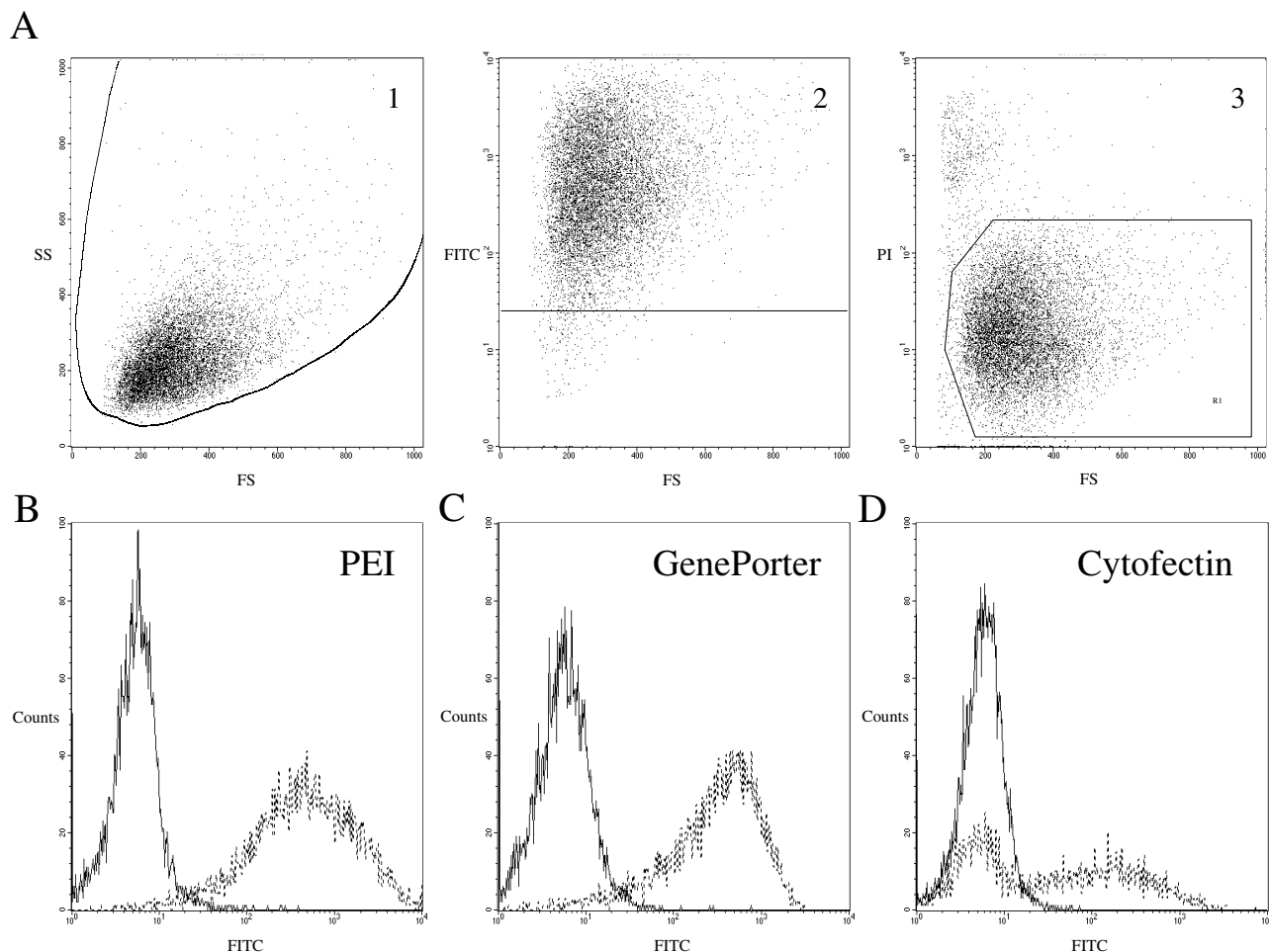


Figure 2. Efficient non-viral vector-mediated uptake of the SFO-1 chimeraplast into IB3.1 cells. Determination of SFO-1 uptake (260 nM) using optimized non-viral vector ratios. (A) As an example, flow cytometric analysis of PEI polyplex-transfected IB3.1 cells included (1) dot plot diagrams indicating cell gating with forward (FS) and side-scatter (SS) morphology parameters, (2) cell-associated green fluorescence indicating chimeraplast uptake (FITC vs. FS), and (3) propidium iodide red fluorescence exclusion indicating cell viability (PI vs. FS). (B–D) A representative experiment showing histograms from IB3.1 cells obtained after 24 h transfection with (B) polyplexes containing 0.2 μ M PEI (9 equivalents), (C) lipoplexes containing 2.3 μ M GenePorter, and (D) lipoplexes containing 1.1 μ M Cytofectin GSV. In each section, continuous histograms denote the autofluorescence of untransfected IB3.1 cells

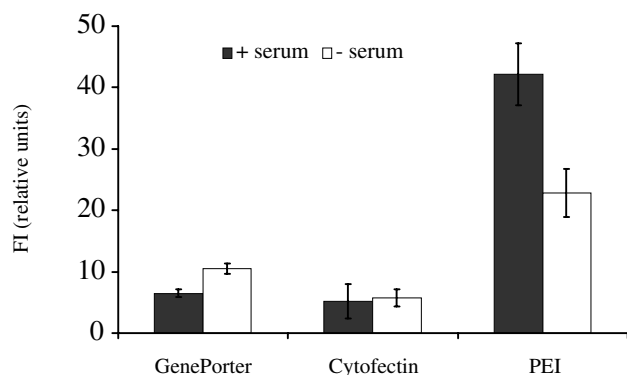


Figure 3. Influence of the serum on non-viral vector-mediated SFO-1 uptake into IB3.1 cells. Non-viral vector-mediated SFO-1 chimeraplast uptake by IB3.1 cells was performed for 6 h in LHC-8 basal medium without FCS (–serum) or with 5% FCS (+serum), as indicated in the Materials and methods section. The diagram displays average values \pm SD from three independent flow cytometry experiments

counterstained by nucleic acid labeling and visualized by laser scanning confocal microscopy of cell sections. After testing several red fluorescent dyes for nuclear contrast, including propidium iodide, ethidium bromide, TO-PRO-3, and LDS751, we selected the red-emitting cyanine fluorophore TO-PRO-3 [24]. This intercalating dye (642/661 nm) gave the highest specificity and brightest red staining of the cell nuclei without cytoplasmic interference, which allowed optimal co-localization of chimeraplasts with nuclear structures (Figure 5A). Next, we wanted to assess the chimeraplast distribution on IB3.1 cells at different times post-transfection. Figure 5B shows representative sections of IB3.1 cells taken at 30 min and 24 h after transfection with the indicated non-viral vectors. Significant differences between the different non-viral vector complexes were already seen early after transfection. The size of both the PEI polyplexes and the GenePorter lipoplexes was small, whereas the Cytofectin lipoplexes were larger and more heterogeneous.

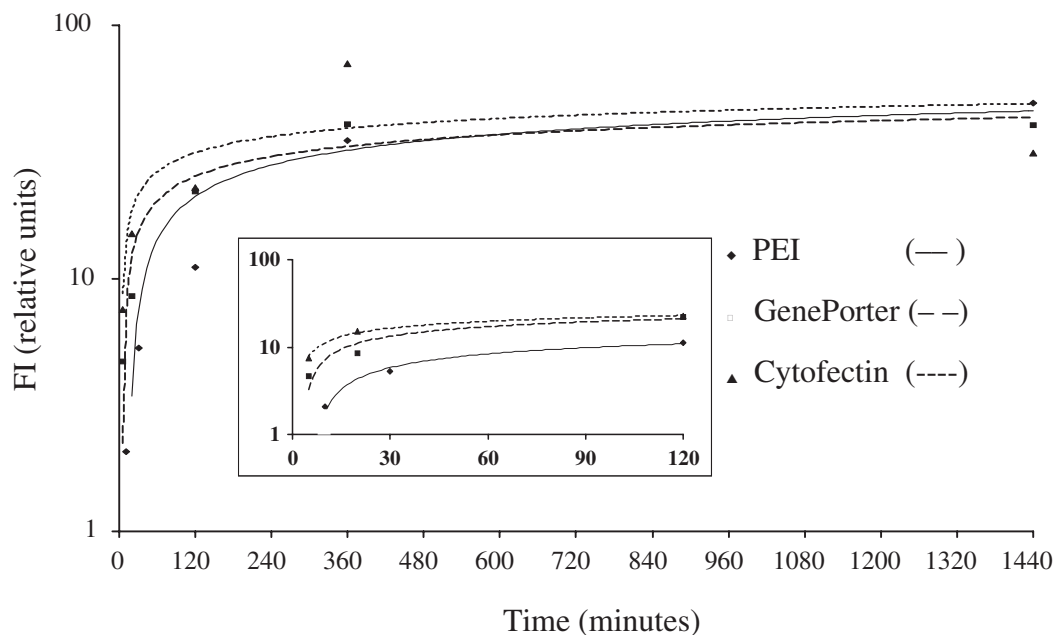


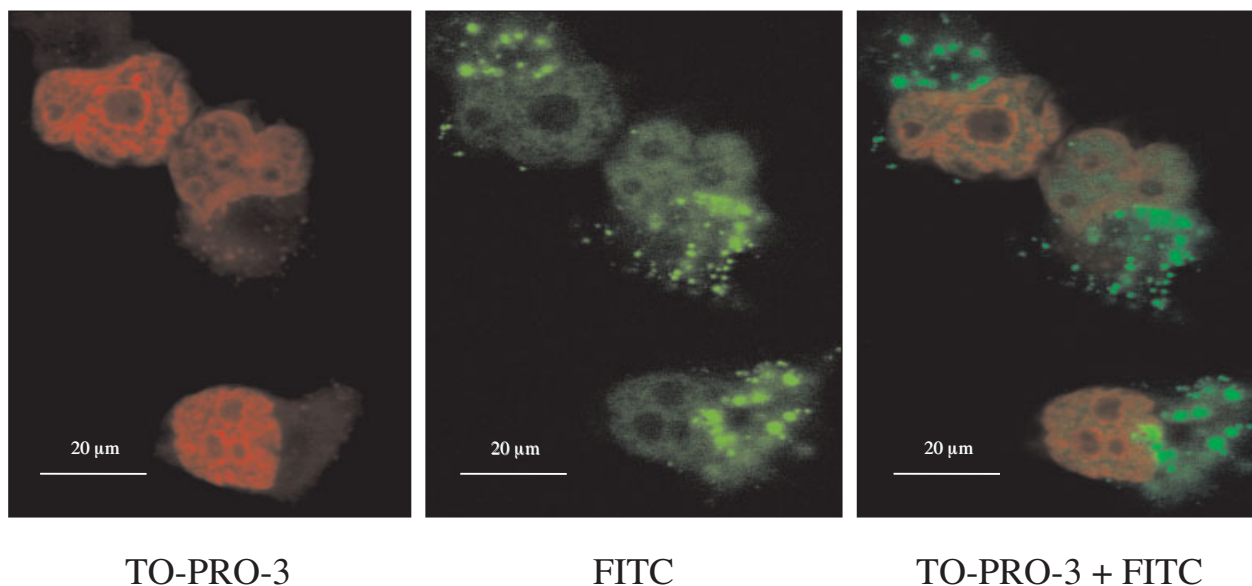
Figure 4. Time course of SFO-1 chimeraplast uptake by IB3.1 cells. Cellular content of SFO-1 was determined by flow cytometry after incubating the IB3.1 cells with PEI polyplexes or cationic lipid (GenePorter and Cytofectin) lipoplexes at different times, from 5 min to 24 h. An inset has been included for better visualization of the shortest time points. For each time point, the mean of two separate experiments is plotted

Nevertheless, these last lipoplexes were the only ones capable of delivering the SFO-1 chimeraplast to the nucleus of several IB3.1 cells as early as 30 min after transfection. Accordingly, the delay in intranuclear accumulation of chimeraplasts delivered by PEI polyplexes was expected, taking into account their slower uptake (Figure 4). Indeed, Kren *et al.* [25] reported the presence of fluorescent chimeraplasts in the nucleus of HuH-7 cells at 3 h after transfection when delivered through PEI polyplexes. More important, when the same analysis was performed up to 24 h post-transfection, only the polyplexes of PEI and the lipoplexes of Cytofectin clearly facilitated nuclear uptake of the SFO-1 chimeraplast. In contrast to the bright punctuate fluorescent pattern of SFO-1 present in the cytoplasm of the epithelial cells regardless of the carrier employed, their nuclear fluorescence was more diffuse and homogeneously distributed throughout the nucleus, except for the nucleoli, which were barely stained, if at all. Moreover, although the cytoplasm of IB3.1 cells treated with GenePorter lipoplexes appeared loaded with fluorescent vesicles, nuclear localization of the fluorescent SFO-1 chimeraplast was absent at all times in these cells. A further confocal microscopy study confirmed full co-localization of GenePorter/SFO-1 lipoplexes and the lysosomal marker TRITC-dextran incubated simultaneously over IB3.1 cells for 24 h (result not shown). This evidence suggests that SFO-1, delivered in the form of GenePorter lipoplexes, was unable to escape from the endosomal/lysosomal compartment of the IB3.1 cells and remained in the cytoplasm. Therefore, the cationic lipid GenePorter seems unsuitable as a chimeraplast carrier in human bronchial epithelial cells.

Uptake specificity and intracellular trafficking of non-viral vector/SFO-1 complexes into IB3.1 cells

While it is accepted that cellular uptake of DNA molecules mediated by either cationic liposomes or polycations occurs by endocytosis [14,26], little is known about the fate of PEI/SFO-1 and Cytofectin/SFO-1 complexes towards the different endocytic pathways. To gain insight into the pathway of polyplex- and lipoplex-mediated chimeraplast uptake into human epithelial cells, we intended to track down simultaneously the internalization of fluorescent SFO-1 complexes and either the receptor-mediated endocytosis marker TRITC-transferrin or the fluid-phase marker TRITC-dextran. Confocal microscopy analysis of cell sections at different times post-incubation demonstrated a lack of co-localization between TRITC-transferrin and SFO-1, regardless of the non-viral vector utilized (Figure 6A). This eliminated receptor-mediated endocytosis as the mechanism of non-viral vector-mediated chimeraplast entry into IB3.1 cells. On the other hand, there was at least partial co-localization between the fluid-phase marker TRITC-dextran and PEI/SFO-1 polyplexes at all times tested, indicating that non-specific fluid-phase endocytosis contributes significantly, but not exclusively, to PEI-mediated chimeraplast entry. In contrast, Cytofectin/SFO-1 lipoplexes did not co-localize at any time with TRITC-dextran (Figure 6B), suggesting that fluid-phase endocytosis is not the mechanism of Cytofectin-mediated chimeraplast entry into IB3.1 cells either.

A



B

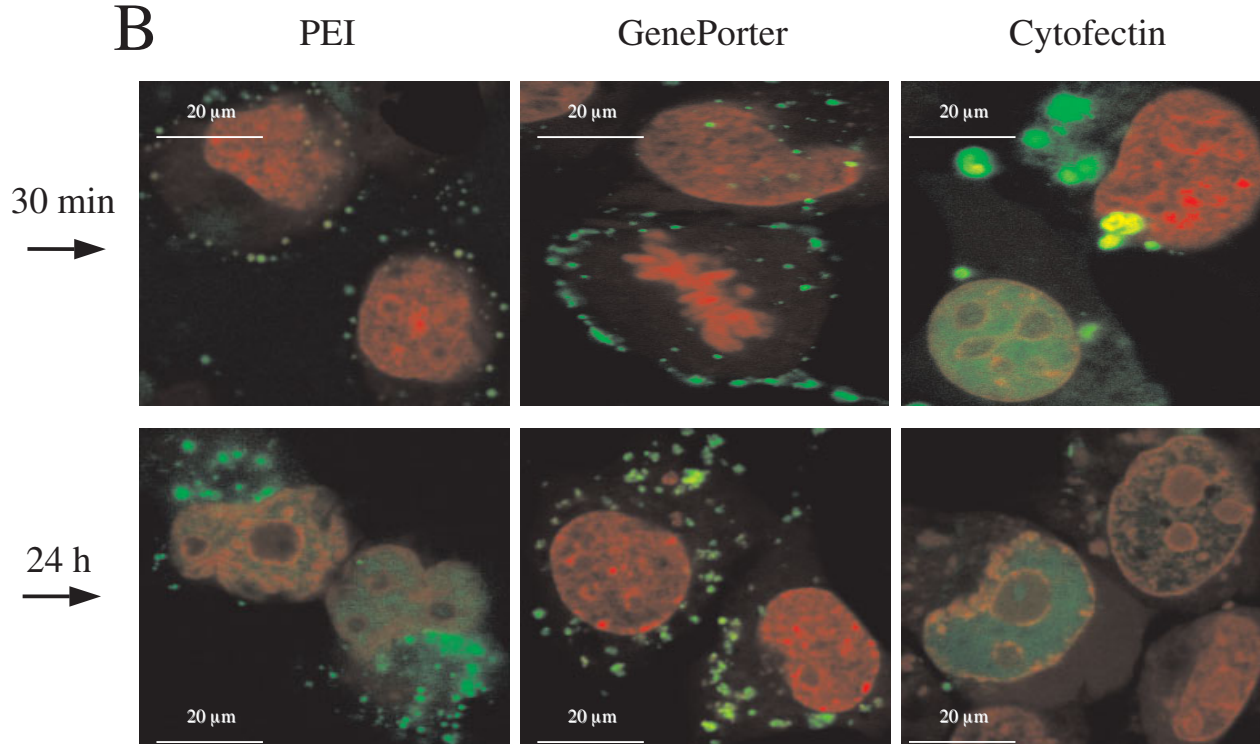


Figure 5. Non-viral vectors show different efficiencies of SFO-1 nuclear uptake in IB3.1 cells. Human bronchial epithelial cells were transfected with polyplexes or lipoplexes containing the SFO-1 chimeraplast and analyzed by confocal microscopy. (A) Intermediate confocal microscopy section (1 μm) of IB3.1 cells transfected with SFO-1/PEI polyplexes for 24 h, showing nuclear SFO-1 co-localization with the red marker TO-PRO-3. (B) Representative confocal microscopy intermediate sections (1 μm) of non-viral vector-mediated SFO-1 chimeraplast uptake into IB3.1 cells, taken at 30 min and 24 h. Scale bars = 20 μm

Physical, chemical, and biological factors influencing chimeraplast uptake on IB3.1 cells

To take full advantage of the *in situ* gene repair stimulation capability of chimeraplasts, we tested the

effect of several factors known to affect their cellular penetration and/or trafficking.

Cell density

While PEI polyplex-mediated SFO-1 uptake was little affected by the density of plated IB3.1 cells, Cytofectin

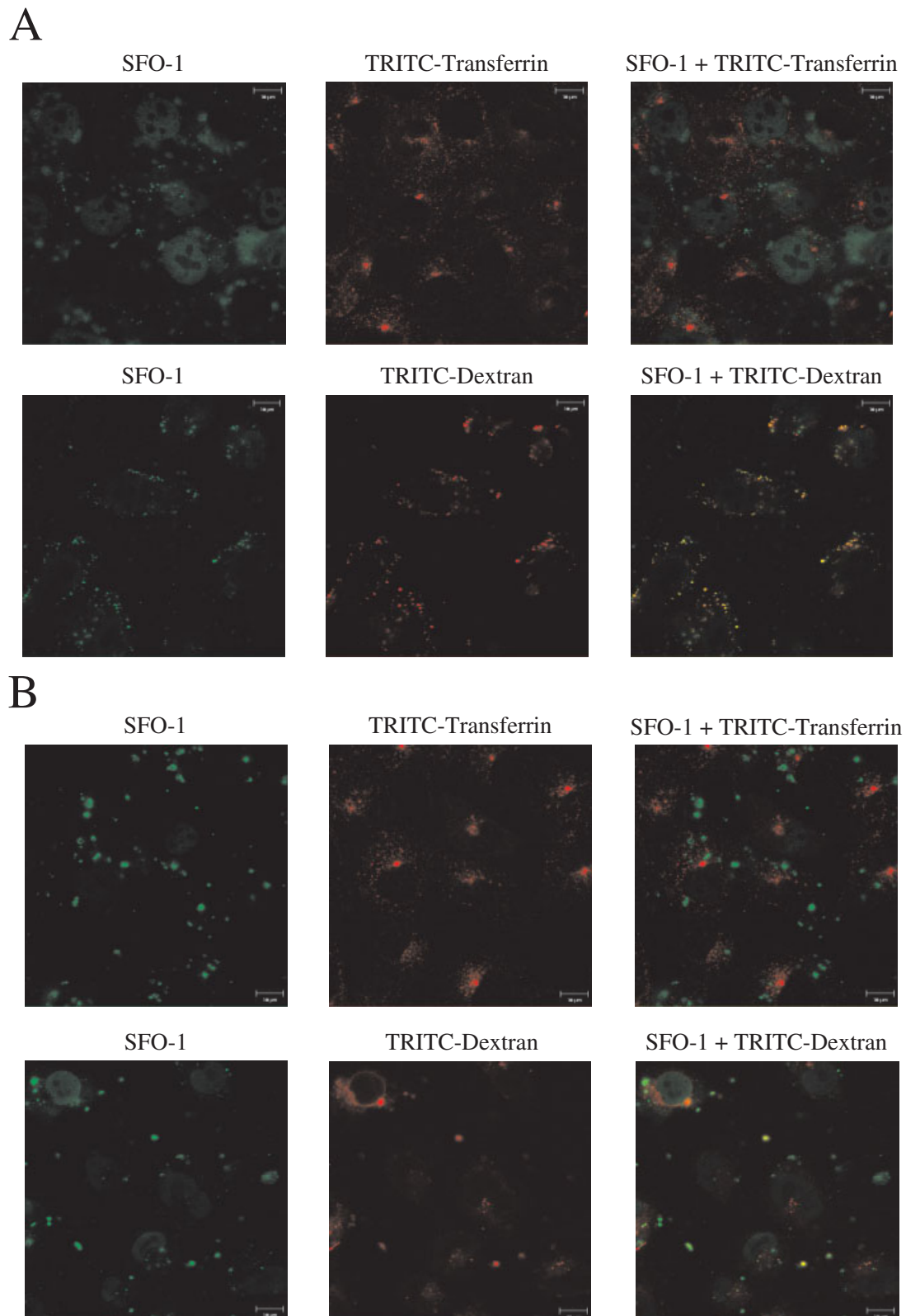


Figure 6. Non-viral vector-mediated internalization and trafficking of SFO-1 into IB3.1 cells. The intracellular distribution and co-localization of fluorescent SFO-1 (260 nM) and two endocytic markers, TRITC-transferrin (receptor-mediated endocytosis) and TRITC-dextran (fluid-phase endocytosis), on IB3.1 cells were followed by confocal microscopy. (A) Visualization of SFO-1/PEI polyplexes (green) co-internalized with either TRITC-transferrin or TRITC-dextran (red). (B) Visualization of SFO-1/Cytofectin lipoplexes (green) co-internalized with either TRITC-transferrin or TRITC-dextran (red). All figures represent intermediate confocal microscopy sections of different cell fields taken at 2 h post-transfection. Scale bars = 10 μ m

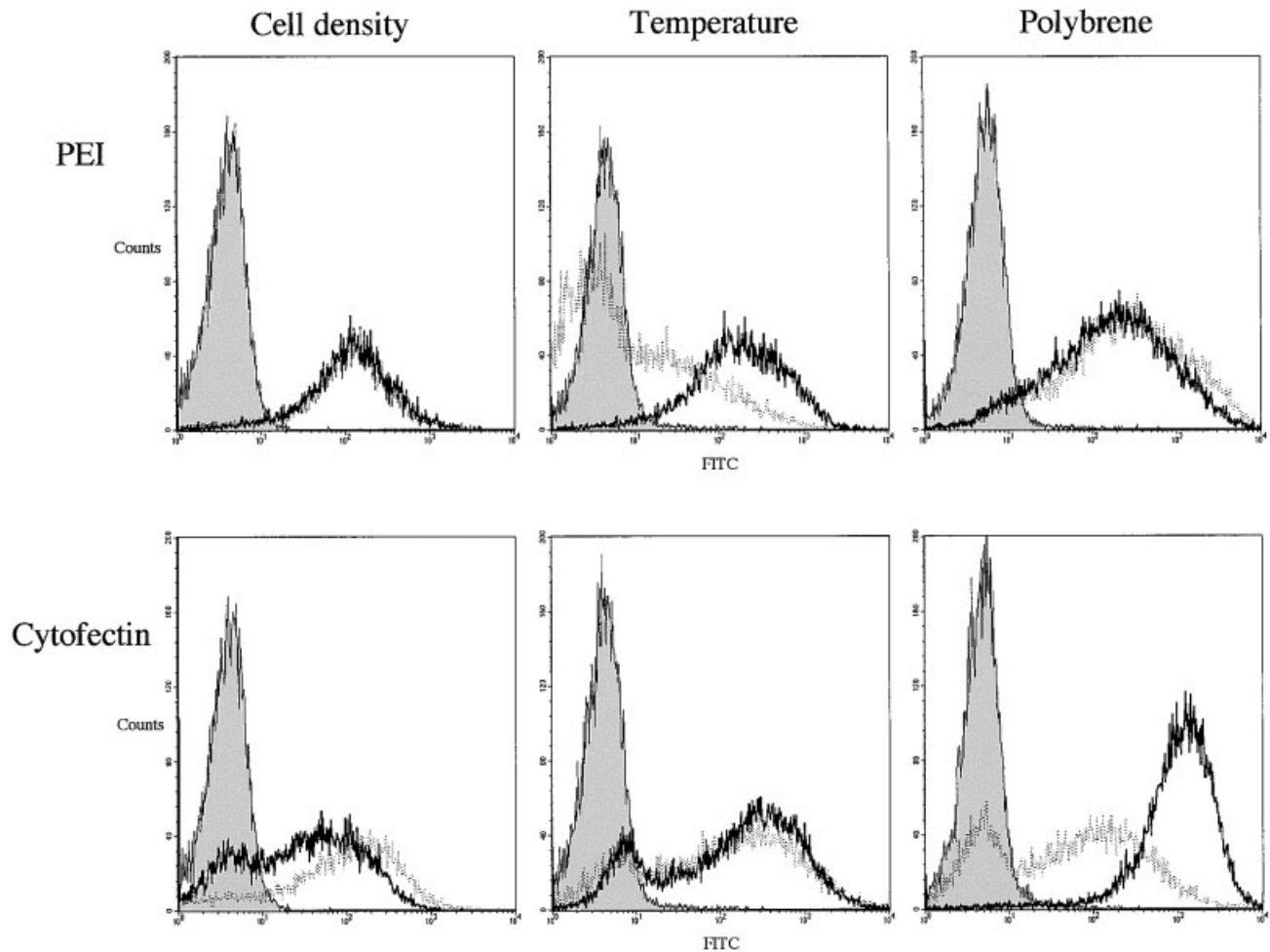


Figure 7. Characteristics of polyplex/lipoplex-mediated uptake of SFO-1 by IB3.1 cells. The influence of cell density, temperature, and polybrene on the SFO-1/PEI and SFO-1/Cytofectin complex uptake by IB3.1 cells was analyzed by flow cytometry at 24 h post-transfection, unless otherwise indicated. Results are displayed as histogram plots of viable cell-associated SFO-1 fluorescence from a representative experiment. All experiments were performed in duplicate. Cell density: IB3.1 cells were set up to reach 30–40% confluency (clear histograms) or 90–100% confluency (dark histograms), and were transfected with the optimized polyplexes and lipoplexes as indicated in the Materials and methods section. Temperature: IB3.1 cells were incubated at 37°C (dark histograms) or 4°C (clear histograms) for 1 h before transfection and maintained at this temperature throughout the transfection procedure, which lasted 3 h. Polybrene: IB3.1 cells were incubated with 8 µg/ml polybrene for 1 h before transfection and maintained in the presence of the same drug concentration throughout the transfection procedure (dark histograms), or transfected in the absence of polybrene (clear histograms). In all cases, background fluorescence is indicated by the gray-filled histograms

performance decreased significantly by increasing cell density (Figure 7). Nevertheless, the toxicity induced by the non-viral vectors was also higher at low cell density.

Temperature

Cold shock (4°C) prevented cellular uptake of PEI polyplexes into IB3.1 cells. Moreover, this thermal stress significantly increased their toxicity in human epithelial cells. In contrast, the same treatment did not affect SFO-1 uptake by Cytofectin or GenePorter lipoplexes and did not result in remarkable cell death (Figure 7).

Polycations

We tested the influence of several polycations added to the culture medium on polyplex- and lipoplex-mediated chimeraplast uptake by IB3.1 cells. Among them, only polybrene increased more than six-fold Cytofectin

lipoplex-mediated uptake of SFO-1 in a dose-dependent manner, with no significant toxicity at the optimized concentration of 8 µg/ml (Figure 7). Moreover, protamine sulfate in the range 8–200 µg/ml had no effect on the GSV-mediated chimeraplast uptake; poly-L-lysine at 10 µg/ml was extremely toxic; and CaCl₂ (60 mM) increased two-fold the GSV-mediated chimeraplast uptake, although it was quite toxic (data not shown). In contrast, PEI polyplex-mediated chimeraplast uptake was unaffected by the presence of polycations in the cell supernatant.

Determination of chimeraplast stability from Cytofectin/SFO-1 and PEI/SFO-1 complexes delivered into IB3.1 cells

Similarly to other therapeutic oligonucleotides, chimeraplasts must reach the cell nuclei non-degraded to achieve

full corrective efficacy. To investigate this aspect, we analyzed both the extracellular and the intracellular stability of the SFO-1 chimeraplast complexed with PEI or Cytofectin at different time points. SFO-1 metabolism was assessed by slab gel electrophoresis and GeneScan[™] analysis, which enabled quantitative determination of the percentages of SFO-1 degradation at different times and conditions. Figure 8A shows the degradation patterns of the SFO-1 chimeraplast, in the form of PEI polyplexes or Cytofectin lipoplexes, incubated with IB3.1 cells for 2, 24, and 48 h. Significant SFO-1 degradation in both the extracellular and the intracellular environments is evident from the presence of ladder-like fluorescent patterns downstream of the main spot corresponding to non-degraded SFO-1 (68-mer). This indicates the presence of 3'-exonucleolytic activity in these compartments. Remarkably, the ladder-like metabolite patterns are interrupted by an intermediate nuclease-resistant region of about 25 nucleotides, a consequence of the 2'-O-methyl-RNA composition of one of the chimeraplast strands. It has been shown that oligonucleotides bearing alkyl modifications in the 2'-position of the β -D-ribofuranosyl moiety are strongly protected against nuclease degradation [27]. Moreover, the appearance of additional fluorescent shortmers below the 2'-O-methyl-RNA protected region in most of the samples resulted from endonucleolytic cleavage. A detailed fluorescence analysis of the individual electropherogram samples by GeneScan[™] software allowed quantification of the percentage of SFO-1 degradation at different times and conditions (Figure 8B). It is noteworthy that in all instances, chimeraplast degradation was less than 50% at 48 h post-transfection, indicating some structural stability of the chimeraplasts. Loss of full-length SFO-1 was time-dependent, but saturable. Indeed, regardless of the non-viral vector used, extracellular degradation at 48 h increased about two-fold respect to that at 24 h, whereas SFO-1 intracellular degradation remained essentially unaltered after 24 h transfection. Also, in both cell lysates and supernatants, a similar percentage of chimeraplast degradation was reached at 48 h post-transfection. This saturation effect has also been reported by Santana *et al.* [18], who studied chimeraplast degradation in HeLa cells. Moreover, our results suggest an increased IB3.1 intracellular metabolic activity with respect to that of the growth medium. Finally, Cytofectin lipoplexes seemed to confer better protection against SFO-1 degradation than PEI polyplexes. Thus, the possibility of significant chimeraplast metabolism should be taken into account to assess the efficacy of these chimeric RNA/DNA molecules in targeted gene correction assays.

Discussion

Gene repair mediated by chimeric RNA/DNA oligonucleotides, also termed chimeraplasty, has recently been developed for the *in situ* repair of single base mutations and small deletions/insertions, and holds great promise in

gene therapy and functional genomics [5,28]. Although successful gene correction through the use of chimeraplasts is being progressively documented in the literature, in most cases a variable to low efficiency of gene correction has been achieved, obviating the need for a clearer understanding of its mechanism of action. Nevertheless, one of the necessary conditions to achieve therapeutically relevant repair efficiencies using chimeraplasts is a careful study and optimization of delivery methodologies to overcome both extracellular and intracellular barriers that preclude their efficient and intact nuclear localization.

In this study, we have examined the uptake, trafficking, and stability of different non-viral vector/oligonucleotide complexes by fluorescence analysis on a cellular model of human bronchial epithelium, the IB3.1 cells [19]. It has been shown very recently that the gene transfer efficiency of an immortalized cystic fibrosis airway epithelial cell line is similar to that in airway epithelial cells in primary culture [29]. Although previous reports have addressed the cellular incorporation of nucleic acids through non-viral vectors [15], we centered our study on the special features of chimeraplasts as particularly long and structured oligonucleotides [28]. Indeed, in several of the previously published chimeraplast studies, non-viral vector-assisted fluorescent chimeraplast incorporation into the cytoplasm and nucleus of the target cells has been analyzed in some detail only by microscopy [7,10,17,18,25,30–32]. In other studies, there is no mention of the behavior or fate of chimeraplasts delivered either naked [8] or through non-viral carriers [6,9,11]. Our goal was to assess the conditions for optimal delivery, minimal cytotoxicity, and transfection reproducibility of chimeraplasts through the use of non-viral vectors, and to examine their distribution and stability as a preliminary step to achieve efficient chimeraplast-mediated repair in airway epithelial cells.

Non-viral vector-mediated chimeraplast internalization is efficient in bronchial epithelial cells

It is known that the plasma membrane acts as a significant barrier to gene transfer in cultured airway cells [33]. Indeed, optimization of cationic lipids to transfer genes to airway epithelial cells has been reported [34] and it has also been shown recently that PEI is a good vehicle for polynucleotide delivery to lung epithelial cells *in vitro* and *in vivo* [35]. Moreover, both non-viral carrier types have been used in several chimeraplast-mediated correction studies [7,10,11,17,25,30].

We achieved near to 100% efficiency of chimeraplast uptake on IB3.1 cells using GenePorter and PEI, and 70–80% using Cytofectin. Our transfection methodology has been adapted from that already optimized for gene transfer with transfectam and PEI [36]. Thus, mild centrifugation of the chimeraplast complexes seems to allow their sedimentation onto the target cells, thereby

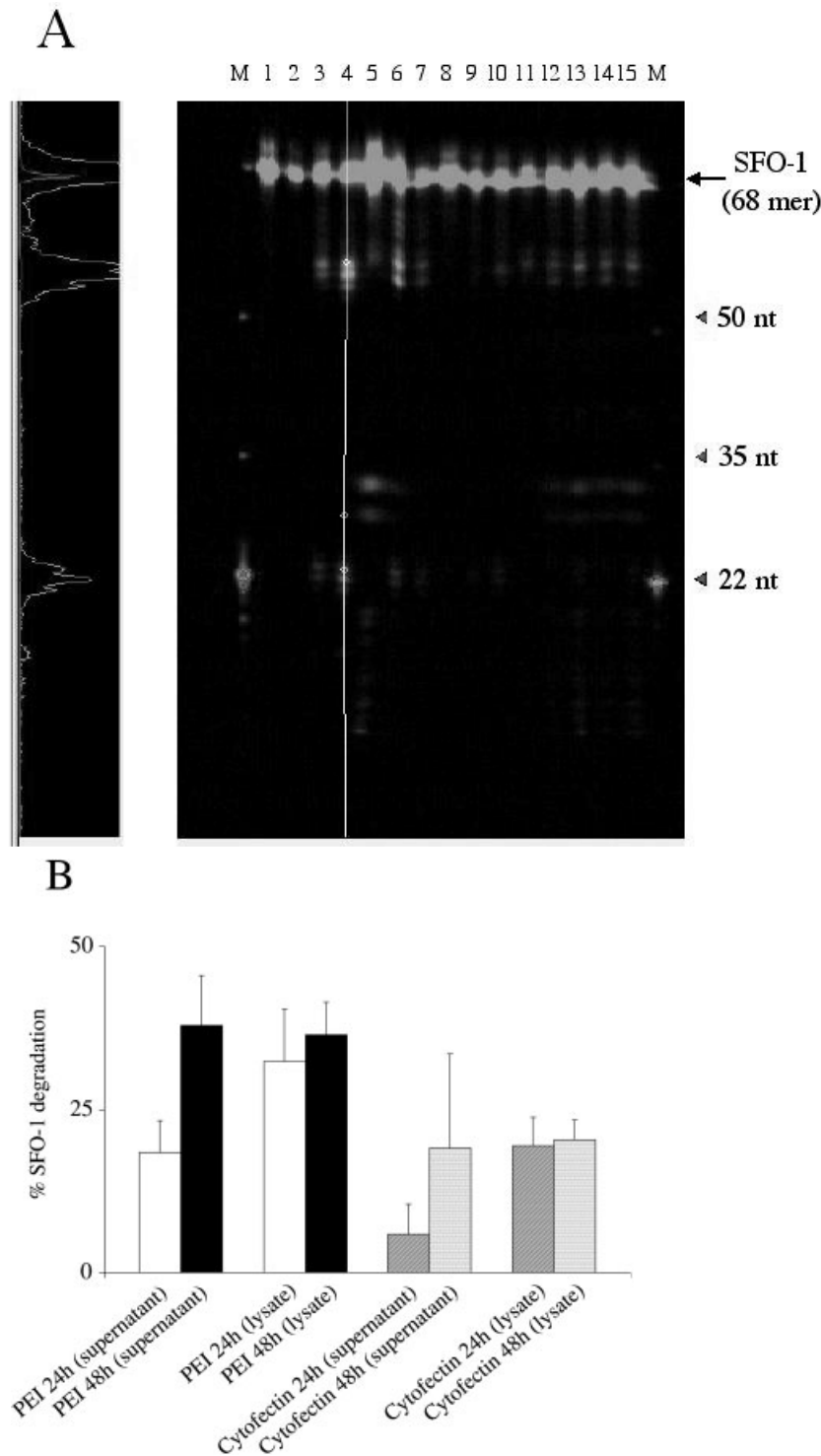


Figure 8. The SFO-1 chimera is metabolized in the presence of IB3.1 cells. The relative stability of SFO-1 when administered through PEI or Cytofectin complexes was measured in supernatants and extracts of IB3.1 cells at 2, 24, and 48 h. Deproteinized samples were visualized by denaturing 5% PAGE using ABI 377 GeneScan[®] software. (A) Digitized gel image of the SFO-1 chimera fluorescent degradation patterns. Lane 1, SFO-1 oligonucleotide control; lanes 2–4, SFO-1 metabolism in the supernatants after 2 h, 24 h, and 48 h administration as a PEI polyplex; lanes 5–7, SFO-1 metabolism in whole cell lysates after 2 h, 24 h, and 48 h administration as a PEI polyplex; lanes 8–10, SFO-1 metabolism in the supernatants after 2 h, 24 h, and 48 h administration as a Cytofectin lipoplex; lanes 11–13, SFO-1 metabolism in whole cell lysates after 2 h, 24 h, and 48 h administration as a Cytofectin lipoplex. Lanes 14 and 15, replicate samples from lanes 12 and 13. Lanes M, TAMRA-labeled GeneScan[®]-500 size standards. The position of the 68-mer full-length SFO-1 chimera is also indicated. An expanded view of a single-lane electropherogram (e.g. sample from lane 4, marked with a vertical white line within the gel) for automatic determination of SFO-1 chimera degradation, which includes metabolite elution time and amount of fluorescence signal in peak height and peak area, is shown on the left of the gel image. (B) Quantitative assessment of SFO-1 chimera degradation in the presence of IB3.1 cells at 24 and 48 h by GeneScan[®] analysis. The relative quantification of SFO-1 degradation was calculated as the sum of all fluorescent peaks of a given electropherogram sample excluding the peak from full-length SFO-1, divided by the sum of all fluorescent peaks from the sample including the peak from full-length SFO-1, and given as a percentage mean (\pm SD) of three different experiments

achieving an increased local interaction with the cell surface and favoring the internalization process. The difference on uptake efficiency between Cytofectin and the other two cationic vectors could be related to the final charge ratio achieved by the corresponding complexes. Transfection appears to be efficient when there is a net positive charge on the cytofectin–DNA complex [37]. It is also believed that increased transfection efficiencies arise from enhanced electrostatic interactions between the anionic cell surface proteoglycans and the cationic carriers [38].

Moreover, the degree of compaction and aggregation status of these complexes could also be an influencing factor. Cytofectin complexes were heterogeneous and larger than the GenePorter and PEI complexes. Chimeraplasts are much smaller than plasmid DNA and cannot condense the cationic vesicles into small particles; instead they are adsorbed onto lipoplexes, which eventually leads to their aggregation and fusion, depending on the cationic lipid formulation. In contrast, chimeraplast/PEI complexes, formulated in 5% dextrose, yielded a homogeneous population of smaller size than the Cytofectin lipoplexes. It has been shown that when plasmid DNA is formulated with 22 kD PEI in 5% glucose, a homogeneous population of complexes is also produced, with mean diameters ranging from 30 to 100 nm, according to the amount of PEI used [39]. Moreover, chimeraplast/lactosylated-PEI complexes prepared in 5% dextrose appeared as small discrete particles with a mean diameter of 20 nm [32]. Transfection in the presence of serum also affected the uptake of the different cationic vector/chimeraplast complexes. While GenePorter complexes, like the first generation of cationic lipid carriers, had reduced uptake efficiency in the presence of serum, the uptake of Cytofectin complexes was not affected by the serum added to the growth medium. This has already been reported in previous studies [40,41]. However, the uptake of PEI complexes was even increased in the presence of serum. It is possible that the aggregation status of chimeraplast/PEI complexes in the presence of serum is favorable for transfection [42]. Indeed, it has been shown that N/P charge ratios higher than 6, mixing of DNA and PEI at low ionic strength, and FCS prevent the aggregation of polyplexes [43].

Cytofectin and PEI, but not GenePorter, are good carriers for nuclear accumulation of chimeraplasts into bronchial epithelial cells

After internalization, both cytoplasmic release of the chimeraplast from the complex and its further trafficking and nuclear accumulation are likely important parameters governing chimeraplast-mediated gene repair. Using this methodology, chimeraplasts were found unequivocally localized into the nuclei of IB3.1 cells, starting at about 2 h post-transfection, when delivered through PEI and Cytofectin complexes, but lack of nuclear

localization was evident when the chimeraplast was delivered through GenePorter complexes. Both PEI and Cytofectin have been shown to efficiently deliver not only oligonucleotides [41,44], but also chimeraplasts [10,17, 25,30] into the nucleus of different cell types. All non-viral vectors used in our study were competent, incorporating the chimeraplast into the cytoplasm of IB3.1 cells. Thus, the limiting step for nuclear delivery, at least for GenePorter lipoplexes, should be an efficient release of the chimeraplast from the endocytic vesicles, because it has been suggested that oligonucleotides display an active 'nuclear tropism' once released from the endosomal and/or lysosomal compartment [14]. The mechanism of efficient endosomal release of PEI/DNA complexes has been postulated to be intrinsic of PEI. This organic macromolecule has the highest cationic-charge-density potential and acting through a proton-sponge effect, produces endosome buffering, osmotic swelling, and endosome/lysosome disruption [44–46]. However, in contrast to that reported for the delivery of PEI/plasmid DNA complexes [26], the nuclear fluorescence obtained after the delivery of chimeraplast/PEI polyplexes did not form an ordered structure, but was faint and homogeneously detected throughout the nuclei. This difference could be due to the small size of the chimeraplasts, which may readily pass through nuclear pores, with a diffusion limit of approximately 40 kD [47]. In a previous study using lactosylated-PEI complexed with fluorescent chimeraplasts, it has also been suggested that PEI does not enter the nucleus of primary rat hepatocytes [32].

On the other hand, both lipoplex types in our study contained DOPE as the neutral fusogenic lipid, at identical molar ratio. Therefore, differences in the chemical structures of the two cationic lipids GS 3815 (Cytofectin) and XG 40 (GenePorter) must have accounted for their ability to release the chimeraplast from the complexes and/or to disrupt the endosomal vesicles by lateral diffusion of the anionic lipids from the endosomal membrane [48]. Moreover, structure–activity relationship studies evaluated the dialkyl chain length and suggested that decreased bilayer stiffness and phase-transition temperatures may result for the C₁₄ chain length (Cytofectin), compared with C₁₈, and may lead to more favorable fusion with endosomal membranes [49]. Thus, dissociation rather than particle size represents a rate-limiting step in chimeraplast delivery. Lappalainen *et al.* [50], using electron microscopy of digoxigenin-labeled ODNs, also found differences in their intracellular distribution when delivered through complexes of two different cationic lipids, DOSPA and DDAB, formulated with DOPE as a helper lipid. Similarly to our GenePorter vector, DOSPA/DOPE could also efficiently deliver ODNs into the cytosol, but no ODNs were found in the nucleoplasm, while the oligo-DDAB/DOPE complex, having a positive net charge, was able to deliver some ODNs into the nucleoplasm. Nevertheless, because the target of chimeraplasts for repair stimulation is genomic DNA, we have clearly shown that GenePorter is not useful as a chimeraplast carrier in human bronchial epithelial cells.

Chimeraplast/PEI polyplexes and chimeraplast/Cytfectin lipoplexes are internalized by different mechanisms in bronchial epithelial cells

Because the chimeraplast-competent carriers PEI and Cytfectin showed differences in cellular uptake, the first being much more efficient than the second, we wanted to shed some light on their uptake and trafficking mechanisms and to further optimize the uptake of chimeraplast/Cytfectin lipoplexes. Lipoplex size does not seem to be a crucial factor affecting its cellular incorporation [51]. Moreover, it has been shown that formulations that increase the size of lipoplexes prevent serum-associated inhibition of transfection [52].

Regarding the mechanism of chimeraplast/PEI complex internalization into IB3.1 cells, we have shown that it is unaffected by changes in cell density and by the presence of polycations such as polybrene in the culture medium. However, cold shock (4°C) treatment of the cells dramatically reduced the uptake of the polyplexes and also increased their toxicity. This result indicates active transport by endocytosis to be the main mechanism of PEI-mediated chimeraplast entry. Moreover, the confocal microscopy analysis revealed partial co-localization of TRITC-dextran with chimeraplast/PEI complexes. This suggests that non-specific fluid-phase endocytosis of polyplexes dissolved in the extracellular fluid accounts for part of their internalization into IB3.1 cells. A recent study also indicated that adsorptive endocytosis after the binding of polyplexes to cell surface anionic sites could be the complementary mechanism of PEI-mediated uptake [45].

As for the mechanism of chimeraplast/Cytfectin complex entry into IB3.1 cells, faster uptake kinetics than that of PEI-mediated chimeraplast uptake has already suggested a different internalization mechanism. Also, we have shown that Cytfectin-mediated lipoplex internalization is negatively affected by the cell density. White *et al.* [53] have recently reported a higher internalization efficiency of cationic liposome-ODN complexes on subconfluent (dividing) compared with confluent (non dividing) cultured keratinocytes. It is interesting to note that after nocodazole-mediated mitosis arrest of IB3.1 cells, we were able to increase chimeraplast/Cytfectin complex uptake from 75% to 90% (data not shown). Thus, according to our results, the cell-cycle status may be considered an influencing factor not only for intracellular oligonucleotide distribution, as has recently been suggested [54], but also for lipoplex uptake on IB3.1 cells. More striking and in contrast to PEI-mediated uptake, chimeraplast/Cytfectin complex internalization was virtually identical at 4°C and at 37°C. This result seemed to question uptake through the endosome pathway as a major contributor to chimeraplast/Cytfectin complex internalization, at least at 4°C, and instead indicated a direct membrane fusion process as the explanation for its uptake. Oligonucleotide delivery by cationic lipids has already been suggested to be due to

the fusion of cationic lipids with plasma membrane [55]. Moreover, the confocal microscopy analyses revealed no co-localization of the fluorescent chimeraplast either with transferrin or with dextran at any time. A similar result has recently been obtained by Kitson *et al.* [56], who studied the uptake of DNA-lipid complexes on Cos7 cells. In contrast, fluorescent vesicles were present in the cytoplasm of chimeraplast/Cytfectin-treated cells. Thus, adapted to this highly heterogeneous lipoplex size, one possibility indicates phagocytosis as a significant contributor of chimeraplast/Cytfectin lipoplex entry at physiological temperature. Indeed, Matsui *et al.* [33] recently demonstrated lipoplex internalization into airway epithelial cells by phagocytosis involving clathrin-coated pits. Alternatively, a charge-related (adsorptive) endocytic process could also contribute significantly to lipoplex-mediated uptake into the IB3.1 cells [56].

Regardless of the internalization mechanism of chimeraplast/Cytfectin complexes, we were able to increase the efficiency of this lipofection process from near 60% to 100% of successfully transfected cells by polybrene treatment. This polycation is used routinely to enhance the efficiency of gene transfer mediated by recombinant retrovirus. It has been reported recently that protamine sulfate enhanced the *in vivo* gene transfer of DNA-lipid complexes [57]. Moreover, the addition of polybrene to the culture medium significantly enhanced gene transfer by lipofection and also abrogated the serum-mediated decrease of lipofection efficiency in some cell lines [58]. Although the precise mechanism of the polycation-mediated enhancement of lipofection is not known, compensation of the unfavorable charge ratio of chimeraplast/Cytfectin lipoplexes and their physical concentration at the cell surface via electrostatic interactions could be the cause of this effect.

Chimeraplasts complexed with PEI and Cytfectin are significantly degraded in the bronchial epithelial cells

Regardless of the mechanism of chimeraplast-mediated gene repair, its integrity in the nuclei of the target cells is a fundamental prerequisite for efficient site-specific changes in genomic templates. Given the structural features of chimeraplasts [28], it has been assumed that these molecules possess intrinsic stability against nuclease degradation. Indeed, only two studies have examined in some detail the intra- and extra-cellular behavior of chimeraplasts incubated with the target cells at different times [18,59]. Both studies used trace amounts of a ³²P end-labeled 68-mer chimeraplast and PAGE fractionation to qualitatively assess its susceptibility to extra- and/or intra-cellular nuclease degradation. The authors concluded that the stability of chimeraplasts did not appear to be a limiting factor in gene targeting events under their experimental conditions. Although quite sensitive, the low resolution of their radioactive methodology prevented

a more precise quantification and analysis of chimeraplast degradation.

We have developed an easy, fast, sensitive, resolvent, and reproducible technique to assess chimeraplast degradation of a FITC-labeled chimeraplast and laser-mediated detection using GeneScan[®] software. The fluorescent chimeraplast was incubated with IB3.1 cells at a concentration relevant for mismatch repair. Thus, we were able to assess both the percentage of chimeraplast degradation in both supernatants and total cell extracts, and its overall metabolism at different time intervals when delivered through both PEI polyplexes and Cytofectin lipoplexes. Using this technique, we have demonstrated several facts: first, consistent and significant chimeraplast degradation in the presence of IB3.1 cells. Second, the degradation patterns obtained indicate the presence of both exonuclease and endonuclease activities in the cells and growth medium. The degradation profiles correspond to nuclease action through the DNA domains of the chimeraplast, while the 2'-O-methyl RNA domains appear non-degraded, consistent with their superior protection against nuclease degradation [27]. Third, in any case, the chimeraplast degradation when delivered through PEI polyplexes is around 40% at 48 h after transfection. Cytofectin lipoplexes appear to confer higher protection against nuclease degradation than PEI polyplexes (around 20% degradation at 48 h after transfection). It has been shown that a desirable feature of nucleic acid lipoplexes is to protect against nuclease degradation [23,60]. Moreover, there seems to be stabilization in the levels of chimeraplast degradation (between 24 and 48 h) when analyzing IB3.1 cell lysates but not cell supernatants, regardless of the non-viral vector used. This intracellular 'saturation' effect has already been reported for other oligonucleotide types [60] and has been attributed to the sequestration of the oligonucleotide in nuclease-deficient compartments of the cell, where it is no longer prone to degradation. In fact, Santana *et al.* [18] have indicated a superior stability of the chimeraplast fraction reaching the nucleus. Thus, at least qualitatively, our results are in agreement with those obtained by these authors. However, in contrast to their view, we suggest that in addition to cell type-specific recombination and DNA repair activities, limited chimeraplast stability may represent a key factor influencing its performance by undermining the nuclear concentration of intact chimeraplast necessary for promoting efficient mismatch repair activity.

In summary, we have set up the parameters for optimal chimeraplast transfection and for understanding its uptake, distribution, and stability in airway epithelial cells. It is conceivable that some *in vivo* chimeraplast-mediated repair assays will need to readjust polyplex or lipoplex formulations to achieve maximal chimeraplast incorporation to specific cell types by systemic administration (e.g. by incorporating targeting ligand molecules to reach hepatocytes [7,30,31]). However, both *in vitro* proof-of-concept experiments [11,17,25] and *in vivo* assays of chimeraplast-directed repair requiring localized

administration [10], or even systemic administration for specific cell types such as pulmonary cells [61,62], will continue to make use of the rather non-specific, but very efficient non-viral vectors reported in this study. Certainly, a complete evaluation of chimeraplast pharmacokinetics and carrier optimization in airway epithelial cells may help in the design of efficient experimental and/or clinical assays for *in situ* correction of genetic diseases affecting the lung, such as cystic fibrosis, acute respiratory distress syndrome, and pulmonary emphysema.

Acknowledgements

We thank Dr Pamela Zeitlin (Johns Hopkins University, Baltimore, MD, USA) for kindly supplying the IB3.1 human bronchial epithelial cell line. We are grateful to Anna Bosch (Serveis Científico-Tècnics, University of Barcelona) for her assistance with confocal microscopy. This work was supported by grants from Fundació La Marató de TV3 (No. 98/1610) and Associació Catalana de Fibrosi Quística.

References

- Mulligan RC. The basic science of gene therapy. *Science* 1993; **260**: 926–932.
- Crystal RG. Transfer of genes to humans: early lessons and obstacles to success. *Science* 1995; **270**: 404–410.
- Woolf TM. Therapeutic repair of mutated nucleic acid sequences. *Nature Biotechnol* 1998; **16**: 341–344.
- Yañez RJ, Porter AC. Therapeutic gene targeting. *Gene Ther* 1998; **5**: 149–159.
- Rice MC, Czymmek K, Kmiec EB. The potential of nucleic acid repair in functional genomics. *Nature Biotechnol* 2001; **19**: 321–326.
- Cole-Strauss A, Yoon K, Xiang Y, *et al.* Correction of the mutation responsible for sickle cell anemia by an RNA–DNA oligonucleotide. *Science* 1996; **273**: 1386–1389.
- Kren BT, Parashar B, Bandyopadhyay P, Chowdhury NR, Chowdhury JR, Steer CJ. Correction of the UDP-glucuronosyltransferase gene defect in the Gunn rat model of Crigler–Najjar syndrome type I with a chimeric oligonucleotide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; **96**: 10349–10354.
- Rando TA, Disatnik MH, Zhou LZ. Rescue of dystrophin expression in mdx mouse muscle by RNA/DNA oligonucleotides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; **97**: 5363–5368.
- Bartlett RJ, Stockinger S, Denis MM, *et al.* *In vivo* targeted repair of a point mutation in the canine dystrophin gene by a chimeric RNA/DNA oligonucleotide. *Nature Biotechnol* 2000; **18**: 615–622.
- Alexeev V, Igoucheva O, Domashenko A, Cotsarelis G, Yoon K. Localized *in vivo* genotypic and phenotypic correction of the albino mutation in skin by RNA–DNA oligonucleotide. *Nature Biotechnol* 2000; **18**: 43–47.
- Tagalakis AD, Graham IR, Riddell DR, Dickson JG, Owen JS. Gene correction of the apolipoprotein (Apo) E2 phenotype to wild-type ApoE3 by *in situ* chimeraplasty. *J Biol Chem* 2001; **276**: 13226–13230.
- van der Steege G, Schuilenga-Hut PH, Buys CH, Scheffer H, Pas HH, Jonkman MF. Persistent failures in gene repair. *Nature Biotechnol* 2001; **19**: 305–306.
- Luo D, Saltzman WM. Synthetic DNA delivery systems. *Nature Biotechnol* 2000; **18**: 33–37.
- Zabner J, Fasbender AJ, Moninger T, Poellinger KA, Welsh MJ. Cellular and molecular barriers to gene transfer by a cationic lipid. *J Biol Chem* 1995; **270**: 18997–19007.
- Li S, Huang L. Nonviral gene therapy: promises and challenges. *Gene Ther* 2000; **7**: 31–34.
- Kmiec EB. Targeted gene repair. *Gene Ther* 1999; **6**: 1–3.
- Alexeev V, Yoon K. Stable and inheritable changes in genotype and phenotype of albino melanocytes induced by an RNA–DNA oligonucleotide. *Nature Biotechnol* 1998; **16**: 1343–1346.

18. Santana E, Peritz AE, Iyer S, Uitto J, Yoon K. Different frequency of gene targeting events by the RNA–DNA oligonucleotide among epithelial cells. *J Invest Dermatol* 1998; **111**: 1172–1177.
19. Zeitlin PL, Lu L, Rhim J, *et al.* A cystic fibrosis bronchial epithelial cell line: immortalization by adeno-12-SV40 infection. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1991; **4**: 313–319.
20. Hartmann G, Krug A, Bidlingmaier M, *et al.* Spontaneous and cationic lipid-mediated uptake of antisense oligonucleotides in human monocytes and lymphocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 1998; **285**: 920–928.
21. Wiggins M, van Hooijdonk CA, de Jongh GJ, Schalkwijk J, van Erp PE. Flow cytometric and microscopic characterization of the uptake and distribution of phosphorothioate oligonucleotides in human keratinocytes. *Arch Dermatol Res* 1998; **290**: 119–125.
22. Pichon C, Monsigny M, Roche AC. Intracellular localization of oligonucleotides: influence of fixative protocols. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 1999; **9**: 89–93.
23. Guy-Caffey JK, Bodepudi V, Bishop JS, Jayaraman K, Chaudhary N. Novel polyaminolipids enhance the cellular uptake of oligonucleotides. *J Biol Chem* 1995; **270**: 31391–31396.
24. Suzuki T, Fujikura K, Higashiyama T, Takata K. DNA staining for fluorescence and laser confocal microscopy. *J Histochem Cytochem* 1997; **45**: 49–53.
25. Kren BT, Cole-Strauss A, Kmiec EB, Steer CJ. Targeted nucleotide exchange in the alkaline phosphatase gene of Huh-7 cells mediated by a chimeric RNA/DNA oligonucleotide. *Hepatology* 1997; **25**: 1462–1468.
26. Godbey WT, Wu KK, Mikos AG. Tracking the intracellular path of poly(ethyleneimine)/DNA complexes for gene delivery. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; **96**: 5177–5181.
27. Agrawal S, Kandimalla ER. Antisense therapeutics: is it as simple as complementary base recognition? *Mol Med Today* 2000; **6**: 72–81.
28. Ye S, Cole-Strauss A, Frank B, Kmiec EB. Targeted gene correction: a new strategy for molecular medicine. *Mol Med Today* 1998; **4**: 431–437.
29. Klink DT, Chao S, Glick MC, Scanlin TF. Nuclear translocation of lactosylated poly-L-lysine/cDNA complex in cystic fibrosis airway epithelial cells. *Mol Ther* 2001; **3**: 831–841.
30. Kren BT, Bandyopadhyay P, Steer CJ. *In vivo* site-directed mutagenesis of the factor IX gene by chimeric RNA/DNA oligonucleotides. *Nature Med* 1998; **4**: 285–290.
31. Bandyopadhyay P, Kren BT, Ma X, Steer CJ. Enhanced gene transfer into HuH-7 cells and primary rat hepatocytes using targeted liposomes and polyethyleneimine. *Biotechniques* 1998; **25**: 282–292.
32. Bandyopadhyay P, Ma X, Linehan-Stieers C, Kren BT, Steer CJ. Nucleotide exchange in genomic DNA of rat hepatocytes using RNA/DNA oligonucleotides. Targeted delivery of liposomes and polyethyleneimine to the asialoglycoprotein receptor. *J Biol Chem* 1999; **274**: 10163–10172.
33. Matsui H, Johnson LG, Randell SH, Boucher RC. Loss of binding and entry of liposome–DNA complexes decreases transfection efficiency in differentiated airway epithelial cells. *J Biol Chem* 1997; **272**: 1117–1126.
34. Fasbender AJ, Zabner J, Welsh MJ. Optimization of cationic lipid-mediated gene transfer to airway epithelia. *Am J Physiol* 1995; **269**: L45–L51.
35. Ferrari S, Moro E, Pettenazzo A, Behr JP, Zacchello F, Scarpa M. ExGen 500 is an efficient vector for gene delivery to lung epithelial cells *in vitro* and *in vivo*. *Gene Ther* 1997; **4**: 1100–1106.
36. Boussif O, Zanta MA, Behr JP. Optimized galenics improve *in vitro* gene transfer with cationic molecules up to 1000-fold. *Gene Ther* 1996; **3**: 1074–1080.
37. Behr JP, Demeneix B, Loeffler JP, Perez-Mutul J. Efficient gene transfer into mammalian primary endocrine cells with lipopolyamine-coated DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; **86**: 6982–6986.
38. Mounkes LC, Zhong W, Cipres-Palacin G, Heath TD, Debs RJ. Proteoglycans mediate cationic liposome–DNA complex-based gene delivery *in vitro* and *in vivo*. *J Biol Chem* 1998; **273**: 26164–26170.
39. Goula D, Remy JS, Erbacher P, *et al.* Size, diffusibility and transfection performance of linear PEI/DNA complexes in the mouse central nervous system. *Gene Ther* 1998; **5**: 712–717.
40. Felgner PL, Gadek TR, Holm M, *et al.* Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; **84**: 7413–7417.
41. Lewis JG, Lin KY, Kothavale A, *et al.* A serum-resistant cytofectin for cellular delivery of antisense oligodeoxynucleotides and plasmid DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; **93**: 3176–3181.
42. Yamazaki Y, Nango M, Matsuura M, Hasegawa Y, Hasegawa M, Oku N. Polycation liposomes, a novel nonviral gene transfer system, constructed from cetylated polyethyleneimine. *Gene Ther* 2000; **7**: 1148–1155.
43. Ogris M, Steinlein P, Kursa M, Mechtler K, Kircheis R, Wagner E. The size of DNA/transferrin–PEI complexes is an important factor for gene expression in cultured cells. *Gene Ther* 1998; **5**: 1425–1433.
44. Boussif O, Lezoualc'h F, Zanta MA, *et al.* A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and *in vivo*: polyethyleneimine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; **92**: 7297–72301.
45. Klemm AR, Young D, Lloyd JB. Effects of polyethyleneimine on endocytosis and lysosome stability. *Biochem Pharmacol* 1998; **56**: 41–46.
46. Kichler A, Leborgne C, Coeytaux E, Danos O. Polyethyleneimine-mediated gene delivery: a mechanistic study. *J Gene Med* 2001; **3**: 135–144.
47. Lang I, Scholz M, Peters R. Molecular mobility and nucleocytoplasmic flux in hepatoma cells. *J Cell Biol* 1986; **102**: 1183–1190.
48. Zelphati O, Szoka FC Jr. Mechanism of oligonucleotide release from cationic liposomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; **93**: 11493–11498.
49. Felgner JH, Kumar R, Sridhar CN, *et al.* Enhanced gene delivery and mechanism studies with a novel series of cationic lipid formulations. *J Biol Chem* 1994; **269**: 2550–2561.
50. Lappalainen K, Miettinen R, Kellokoski J, Jaaskelainen I, Syrjanen S. Intracellular distribution of oligonucleotides delivered by cationic liposomes: light and electron microscopic study. *J Histochem Cytochem* 1997; **45**: 265–274.
51. Densmore CL, Giddings TH, Waldrep JC, Kinsey BM, Knight V. Gene transfer by guanidinium-cholesterol: dioleoylphosphatidyl-ethanolamine liposome–DNA complexes in aerosol. *J Gene Med* 1999; **1**: 251–264.
52. Turek J, Dubertret C, Jaslin G, Antonakis K, Scherman D, Pitard B. Formulations which increase the size of lipoplexes prevent serum-associated inhibition of transfection. *J Gene Med* 2000; **2**: 32–40.
53. White PJ, Fogarty RD, McKean SC, Venables DJ, Werther GA, Wraight CJ. Oligonucleotide uptake in cultured keratinocytes: influence of confluence, cationic liposomes, and keratinocyte cell type. *J Invest Dermatol* 1999; **112**: 699–705.
54. Helin V, Gottikh M, Mishal Z, Subra F, Malvy C, Lavignon M. Cell cycle-dependent distribution and specific inhibitory effect of vectorized antisense oligonucleotides in cell culture. *Biochem Pharmacol* 1999; **58**: 95–107.
55. Bennett CF, Chiang MY, Chan H, Shoemaker JE, Mirabelli CK. Cationic lipids enhance cellular uptake and activity of phosphorothioate antisense oligonucleotides. *Mol Pharmacol* 1992; **41**: 1023–1033.
56. Kitson C, Angel B, Judd D, *et al.* The extra- and intracellular barriers to lipid and adenovirus-mediated pulmonary gene transfer in native sheep airway epithelium. *Gene Ther* 1999; **6**: 534–546.
57. Li S, Huang L. *In vivo* gene transfer via intravenous administration of cationic lipid–protamine–DNA (LPD) complexes. *Gene Ther* 1997; **4**: 891–900.
58. Abe A, Miyanojara A, Friedmann T. Polybrene increases the efficiency of gene transfer by lipofection. *Gene Ther* 1998; **5**: 708–711.
59. Yoon K, Cole-Strauss A, Kmiec EB. Targeted gene correction of episomal DNA in mammalian cells mediated by a chimeric RNA/DNA oligonucleotide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; **93**: 2071–2076.
60. Prasmickaite L, Hogset A, Maelandsmo G, *et al.* Intracellular metabolism of a 2'-O-methyl-stabilized ribozyme after uptake by DOTAP transfection or as free ribozyme. A study by capillary electrophoresis. *Nucleic Acids Res* 1998; **26**: 4241–4248.
61. Goula D, Becker N, Lemkine GF, *et al.* Rapid crossing of the pulmonary endothelial barrier by polyethyleneimine/DNA complexes. *Gene Ther* 2000; **7**: 499–504.
62. Zou SM, Erbacher P, Remy JS, Behr JP. Systemic linear polyethyleneimine (L-PEI)-mediated gene delivery in the mouse. *J Gene Med* 2000; **2**: 128–134.

Suitability of oligonucleotide-mediated cystic fibrosis gene repair in airway epithelial cells

David de Semir¹
Marga Nadal¹
Juan R. González²
Sara Larriba¹
Anna Avinyó^{1†}
Virginia Nunes¹
Teresa Casals¹
Xavier Estivill^{1‡}
Josep M. Aran^{1*}

¹Centre de Genètica Mèdica i Molecular, Institut de Recerca Oncològica, Hospital Duran i Reynals, 08907 L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain

²Institut Català d'Oncologia, Hospital Duran i Reynals, 08907 L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain

*Correspondence to: Josep M. Aran, Centre de Genètica Mèdica i Molecular, Institut de Recerca Oncològica (IRO), Hospital Duran i Reynals, Gran Vía s/n km 2,7, 08907 L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain. E-mail: jaran@iro.es

†Current address: Inst. de Biologia Molecular de Barcelona, CID, CSIC, Jordi Girona, 18-26, 08034 Barcelona, Spain.

‡Current address: Centre de Regulació Genòmica, Programa gens i malaltia, Passeig Marítim 37-49, 08003 Barcelona, Spain.

Abstract

Background Non-viral vector-mediated targeted gene repair could become a useful alternative to classical gene addition strategies. The methodology guarantees a physiologically regulated and persistent expression of the repaired gene, with reported gene conversion and phenotypic correction efficiencies approaching 40–50% in some *in vitro* and *in vivo* models of disease. This is particularly important for cystic fibrosis (CF) because of its complex pathophysiology and the cellular heterogeneity of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (*CFTR*) gene expression and function in the lung.

Methods A cell-free biochemical assay was applied to assess the ability of CF airway epithelial cells to support chimeraplast-mediated repair. In addition, a methodology allowing the relative quantification of the percentage of W1282X mutation repair in a heterozygous background using the PCR/oligonucleotide ligation assay (PCR/OLA) was developed. The performance of different chimeraplast and short single-stranded oligonucleotide structures delivered by non-viral vectors and electroporation was evaluated.

Results Chimeraplast-mediated repair competency was corroborated in CF airway epithelial cells. However, their repair activity was about 5-fold lower than that found in liver cells. Moreover, regardless of the corrector oligonucleotide structure applied to our CF bronchial epithelial cells, of compound heterozygous genotype (F508del/W1282X), the percentage of their resulting wild-type allele in the W1282X (exon 20) locus of the *CFTR* gene was not significantly different from that of the control untreated cells by our PCR/OLA assay (confidence interval at 95% ± 4 allele wild-type).

Conclusions Oligonucleotide-mediated *CFTR* gene repair is an inefficient process in CF airway epithelial cells. Further improvements in oligonucleotide structure, nuclear delivery and/or the capability for mismatch repair stimulation will be necessary to achieve therapeutic levels of mutation correction in these cells. Copyright © 2003 John Wiley & Sons, Ltd.

Keywords W1282X mutation correction; chimeraplasts; non-viral vectors; PCR/OLA

Introduction

Cystic fibrosis (CF) is the most common autosomal recessive inherited disease in Caucasian populations. Although the severity and clinical manifestations of CF are variable, the primordial cause of these complex phenotypes relies

Received: 11 October 2002
Revised: 28 November 2002
Accepted: 29 November 2002

on mutations within the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (*CFTR*) gene affecting the epithelial cells [1]. Since its identification in 1989 by positional cloning, more than 1000 CF mutations distributed throughout the *CFTR* gene have been identified worldwide in genetic screens, the F508del being the most prevalent (~70%). However, other minority pathologic mutations may occur at higher frequencies in selected populations, as exemplified by the W1282X mutation on 60% of Ashkenazic CF chromosomes. The *CFTR* gene encodes an ATP-dependent, cAMP-regulated chloride channel localized in the apical epithelial membranes [2]. Malfunction of mutated *CFTR* in airway epithelia leads to electrolyte imbalance and abnormal fluid secretion, which induces pulmonary obstruction and infection, the most life-threatening clinical features of CF. Pharmacological and physical therapies, including lung transplantation, have greatly improved the prognosis of CF patients, although no definitive cure has yet been established for this lethal disorder.

With the *CFTR* gene available, it was reasonable to infer that somatic gene therapy could be a promising alternative to revert at least the most serious manifestations of CF [3]. However, the experience accumulated from the CF gene therapy clinical trials performed up to date, attempting addition of correct *CFTR* cDNA copies into airway epithelia through both viral and non-viral vectors, has been somewhat disappointing [4]. Obviating the low gene transfer efficiency into airway epithelial cells achieved with the actual vectors, partial correction of the electrophysiological defect has been detected in the nasal epithelia and bronchia of some treated CF individuals, although this effect has been transient [5–7]. Besides these hurdles, another important limitation of *CFTR* gene addition strategies relate to the lack of physiological regulation of transgenic *CFTR* expression in the lung.

In recent years, several novel approaches based on targeted gene repair have emerged, which show promising therapeutic value [8–12]. At the DNA level, chimeraplasty, the use of structured chimeric RNA/DNA oligonucleotides for repairing single-nucleotide mutations by stimulation of the endogenous mismatch repair machinery of the target cells, has prompted special interest due to the high frequency of gene conversion achieved on different cell types, approaching 40–50%, in both *in vitro* and *in vivo* models [12,13]. Moreover, these genotype conversions seemed persistent and led to a newly synthesized and physiologically regulated gene product, capable of fully reverting the abnormal phenotype of a variety of hereditary disorders such as sickle cell anemia, Crigler-Najjar syndrome, atherosclerosis, Duchenne muscular dystrophy, and albinism [14–19]. However, this evolving technology has also been charged with inconsistency and lack of reproducibility for different genes and cell types [20,21]. Nevertheless, the experience gained from the reported experimental applications suggest two necessary factors determining the maximal frequency of chimeraplast-directed gene repair: the purity of the synthesized chimeric RNA/DNA oligonucleotides, and their

easiness to reach undegraded the nucleus of the target cells.

In a previous study, we optimized polyplex- and lipoplex-mediated chimeraplast uptake, and analyzed its subcellular distribution and stability, in airway epithelial cells [22]. In this study, we further sought to validate the chimeraplasty and the use of short single-stranded oligonucleotide technologies for the correction of the W1282X nonsense mutation in CF airway epithelial cells.

Materials and methods

Oligonucleotides

Syntheses of the different chimeraplast structures (Figure 1) were performed using commercially available phosphoramidites on 1000 Å CPG supports, and were purified by denaturing polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) according to procedures already described [22]. All other modified oligonucleotides were synthesized and HPLC purified by Cruachem (Cruachem Ltd, Glasgow, UK). Lyophilized oligonucleotides were dissolved in distilled water, and their concentrations were determined spectrophotometrically (33 µg/ml per A₂₆₀ unit).

Cells and transfections

The CF bronchial epithelial cell line IB3.1 [23] was cultured in 'CF medium': LHC-8 basal medium (Biofluids, Rockville, MD, USA) containing 100 U/ml penicillin/streptomycin (Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA), 0.2 mg/ml imipenem (Merck, West Point, PA, USA), 80 µg/ml tobramycin (Eli Lilly, Indianapolis, IN, USA), 2.5 µg/ml fungizone (Life Technologies), and 5% fetal bovine serum (FBS). The human T lymphoblastoid cell line Jurkat (ATCC) was cultured in RPMI 1640 medium, and the human hepatoma cell line HepG2 (ATCC) was cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (both from Life Technologies). Both culture media were supplemented with 10% FBS, L-glutamine, and penicillin/streptomycin. All cells were maintained at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere, and their extracts used in the biochemical gene repair assay described below.

Optimization of non-viral vector-mediated oligonucleotide uptake into the IB3.1 cells using either PEI polyplexes or Cytosfectin lipoplexes has been thoroughly described in a previous study [22]. Briefly, oligonucleotide-containing polyplexes were generated by mixing 5% dextrose solutions of both the corresponding oligonucleotide at the indicated concentration and ExGen 500™ (22-kD linear polyethylenimine (PEI); Euromedex, Souffelweyersheim, France) at a ratio of 9 equivalents of PEI nitrogen per oligonucleotide phosphate. Generation of oligonucleotide-containing lipoplexes was similar to that for the polyplexes, except that both the corresponding oligonucleotide and Cytosfectin GSV™ (GS 3815/DOPE; 2:1 molar ratio; Glen Research, Sterling, VA, USA) at

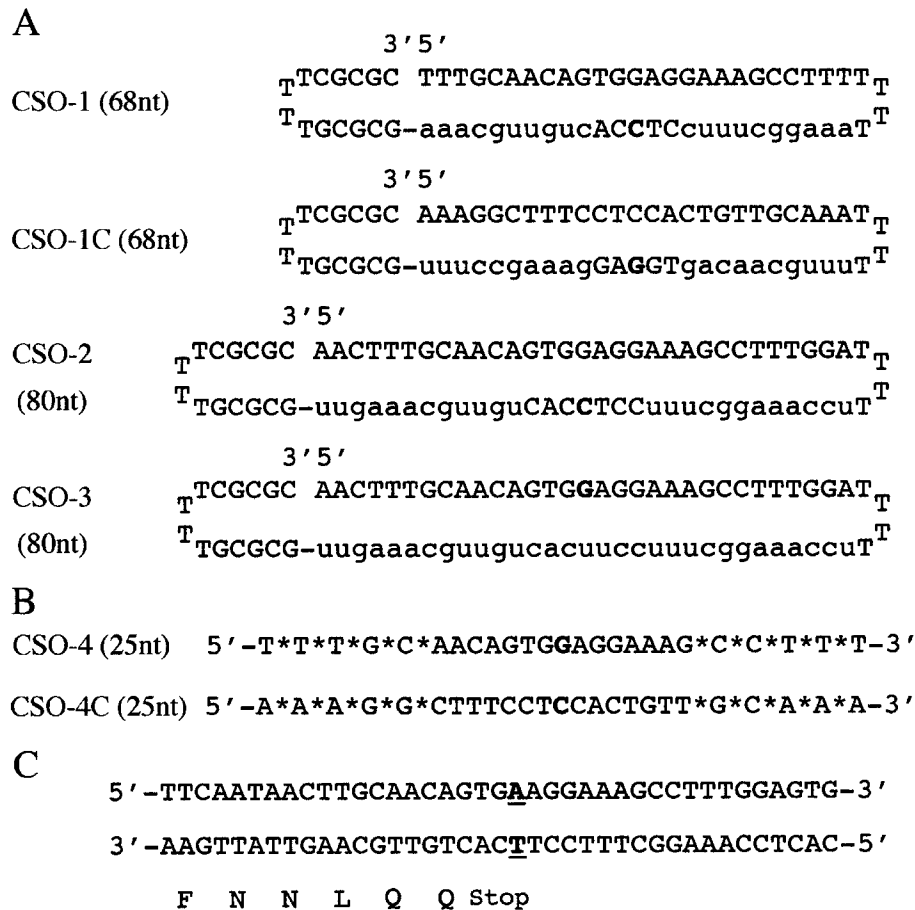


Figure 1. Sequences of the chimeraplasts and short single-stranded oligonucleotides used in this study. Chimeric RNA/DNA oligonucleotides (CSO-1, CSO-1C, CSO-2 and CSO-3) (A) and short single-stranded oligonucleotides (CSO-4 and CSO-4C) (B) were designed to target either the transcribed or the non-transcribed strand of the W1282X mutation locus within exon 20 of the *CFTR* gene (C). Correction of the point mutation W1282X requires replacement of the mutant A residue with a G residue in the transcribed strand, or of the corresponding complementary residues in the non-transcribed strand. The duplex chimeric structures in (A) are shown with the 2'-O-methyl RNA residues depicted by lower case. The phosphorothioate linkages within the oligonucleotides, located at both 3' and 5' termini, are marked with asterisks in (B). DNA residues are shown in capital letters with the center mismatched nucleotide indicated in bold

2.5 µg/ml were diluted in LHC-8 basal medium previously to complex formation.

For polyplex- or lipoplex-mediated chimeraplast transfection, the IB3.1 cells were grown to 60–70% confluency in a 6-well plate. Previously to PEI- and Cytofectin-mediated transfection, the medium from the cells was replaced with 900 µl of fresh medium with FBS. Complexes (100 µl) were added dropwise to the cells with gentle swirling of the plate.

Subsequently, the plates were centrifuged for 5 min at 280 g and returned to the CO₂ incubator. Two hours post-transfection, the wells were filled with 2 ml/each of serum-containing medium. To increase the efficiency of lipoplex-mediated oligonucleotide uptake, lipofection of the IB3.1 cells was performed in the presence of 8 µg/ml polybrene [22]. Finally, at 16 h post-transfection, the cell supernatants were replaced with fresh CF medium.

Oligonucleotides were also introduced into the IB3.1 cells by electroporation. Thus, these cells grown to semiconfluency were trypsinized and resuspended in PBS at 10⁷ cells/ml. A volume of 500 µl of this

cell suspension was then mixed with the appropriate amount of oligonucleotide and placed on ice for 10 min. Electroporation was performed in 0.4-cm cuvettes, at 260 V and 950 µF, in a Gene Pulser electroporator (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). These electroporation parameters were previously optimized by assessing both the uptake efficiency of a fluorescent oligonucleotide [22] and the percentage of expression of the reporter plasmid pEGFP-N1 (Clontech Laboratories Inc., Palo Alto, CA, USA) in the IB3.1 cells, both analyzed by flow cytometry (data not shown). Immediately after the electrical pulse, cells were transferred into an Eppendorf tube, centrifuged at 12 000 rpm for 20 s, and left at room temperature for 20 min. Finally, the PBS supernatant containing cell debris from lysed cells was discarded, and the cell pellet was resuspended and plated in 'CF medium'.

Cytogenetic analysis

To assess the karyotype of the IB3.1 cells, a 10-cm² culture plate containing 10⁶ cells was harvested to obtain

metaphasic chromosomes. Briefly, 0.4 ml of Colcemid (Life Technologies) was added to the cells and incubated at 37 °C for 20 min. Then, cells were lysed by adding 10 ml of hypotonic solution (75 mM KCl) and fixed in methanol/acetic acid (3:1). Slides were dropped and stained with DAPI (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

To analyze the number of chromosomes 7 per cell containing the *CFTR* gene a fluorescence *in situ* hybridization (FISH) study was performed using the cNX.6d *CFTR* gene-specific cosmid as probe [24]. This probe (2 µg) was labeled with biotin 16-dUTP (Roche, Basel, Switzerland) by a standard nick translation reaction. A portion of it (400 ng) was co-precipitated with 1 µg of human Cot1 DNA (Life Technologies) and 1 µg of salmon sperm DNA (Sigma-Aldrich), and resuspended in a hybridization mix containing 12xSSC in 20% dextran sulfate plus 50% deionized formamide. After heat denaturation of the probe and the chromosomal preparations, slides were incubated overnight with 10 µl of the hybridization mix in a humid chamber at 37 °C. Posthybridization washes were performed by soaking the slides three times in 2xSSC/formamide (1:1), and three times in 2xSSC, all at 42 °C. For signal detection, slides were incubated at 37 °C with avidin-FITC (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) for 20 min, and further washed three times in 4xSSC plus 0.1% Tween 20 at 37 °C. Signal amplification was achieved by incubating the slides with biotinylated anti-avidin (Vector Laboratories), washing as above, and reincubating with avidin-FITC. Finally, slides were mounted in 40 µl of Vectashield antifade solution (Vector Laboratories) containing 150 ng/ml of DAPI stain.

All preparations were scored under a fluorescence microscope (Olympus AH3) equipped with the appropriate filter set, and images were captured with a Cytovision image analyzer (Applied Imaging International Ltd., UK).

RNA isolation and RT-PCR expression analysis

For transcript expression studies, total RNA was extracted from the IB3.1 cells using the RNeasy miniprep kit (Qiagen, Valencia, CA, USA). The RNA was reverse transcribed with MMLV reverse transcriptase and random primers, and expression of the genes involved in mismatch repair (MSH2, MSH6, MLH1 and PMS2), and homologous recombination (RAD51, RAD52 and RPA) was assessed by PCR amplification of specific gene fragments from primer pairs designed according to the respective GeneBank published gene sequences, using the Primer3 software [25]. Output primer pair sequences are given for MSH2 (MSH2-F: 5'-cgaccagccatttggagaaa-3'; MSH2-R: 5'-tgggttgcaaacatgcaaaa-3'), MSH6 (MSH6-F: 5'-tcgaggggtgatggtccta-3'; MSH6-R: 5'-ttgctattgccgtccatca-3'), MLH1 (MLH1-F: 5'-ccagcaccgctctttgacct-3'; MLH1-R:

5'-gcaggttagcaagctgcagga-3'), PMS2 (PMS2-F: 5'-gaaagcgctgaaactgacga-3'; PMS2-R: 5'-cgtggcatgctggtccacta-3'), RAD51 (RAD51-F: 5'-tgggaagaccagatctgtca-3'; RAD51-R: 5'-ttgatgcatggcgatgata-3'), RAD52 (RAD52-F: 5'-aggtgacctcccctccaga-3'; RAD52-R: 5'-tggaggtcccaaatccaga-3'), RPA (RPA-F: 5'-ccggcatgctagctcaattc-3'; RPA-R: 5'-caatcattgcaaatcccta-3'). The amplification reactions were performed in a total volume of 50 µl, using 1 µl of cDNA, 150 µM dNTPs, 15 pmol of the respective primers, 5 µl of *Taq* DNA polymerase buffer, and 0.25 µl of *Taq* DNA polymerase (5 U/µl; Roche), in a GeneAmp® PCR system 2400 DNA thermocycler (Perkin-Elmer, Shelton, CT, USA). An initial denaturation of the PCR reactions at 95 °C for 1 min was followed by 35 cycles of amplification 95 °C, 30 s, annealing at 55 °C (for MSH2, MSH6, MLH1, and PMS2), or at 62 °C (for RAD51, RAD52, and RPA) 40 s, and 72 °C, 1 min, and a final extension step at 72 °C, 7 min.

DNA isolation and genotyping

Genomic DNA was extracted either from freshly grown or from frozen IB3.1 cell pellets according to standard procedures. Briefly, IB3.1 cell pellets were resuspended in proteinase K digestion buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% SDS, and 250 µg/ml proteinase K), and incubated for 3 h at 50 °C, with occasional mixing. DNA was precipitated with isopropanol, washed with 70% ethanol, air-dried, and resuspended in a small volume of TE, pH 8.0.

A 473-bp DNA fragment including the exon 20 of the *CFTR* gene was amplified from genomic DNA isolated from IB3.1 cells, using primers I19D: 5'-ggtcaggattgaaagtgtgcaacaaggttgatgaataag-3', and I20R: 5'-ctatgagaaaactgactggagaaaaaagacagcaatg-3'. The PCR reactions were carried out in a 50-µl volume containing 500 ng of genomic DNA, 150 µM dNTPs, 15 pmol of the above primers, 5 µl of *Taq* DNA polymerase buffer, and 0.25 µl of *Taq* DNA polymerase (5 U/µl) (Roche) in a GeneAmp® PCR system 2400 DNA thermocycler (Perkin-Elmer). A control PCR reaction containing no DNA was included in each PCR reaction to monitor for contamination of PCR reagents. Amplification conditions consisted of an initial 5 min denaturation step at 95 °C, followed by 30 cycles (94 °C for 30 s, 72 °C for 90 s), and a final extension of 10 min at 72 °C. A 20-µl aliquot of the PCR reaction from cycle 25 (exponential phase of amplification) was retrieved for the oligonucleotide ligation assay (OLA). Finally, a 10-µl aliquot of the PCR reaction mixture from cycle 30 was analyzed by electrophoresis in a 1% agarose gel in 0.5 × TBE buffer to verify specific amplification of the PCR product.

Three oligonucleotide probes were used for the analysis of the W1282X mutation in the IB3.1 cells. A combination of two upstream (allelic) probes: WT (5'-TATCACTCCAAAGGCTTTCCTC-3') for detection of the wild-type allele, and M (5'-TATCACTCCAAAGGCTTTCCTT-3') for detection of the W1282X allele,

in which non-complementary 5'-poly(A) extensions (ranging from none to 8A) were added for sizing, plus one common, downstream, 5'-phosphorylated and 3'-FAM-labeled reporter probe: W1282X-CR (5'-CACTGTTGCAAAGTTATTGAATCC-3'). All oligonucleotide ligation reactions were carried out in a 20- μ l reaction volume containing 4 μ l of the previously amplified DNA sample from cycle 25, 10 μ l of distilled sterile water, 1 μ l of either *Taq* DNA ligase (40 U/ μ l; New England Biolabs, Beverly, MA, USA), or *Tsc* DNA ligase (5 U/ μ l; Roche), 2 μ l of DNA ligase buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.6, 25 mM potassium acetate, 10 mM magnesium acetate, 10 mM DTT, 1 mM NAD, and 0.1% Triton X-100), and 0.4 pmol of each primer, in a GeneAmp[®] PCR system 2400 DNA thermocycler (Perkin-Elmer). The optimized OLA conditions were as follows: initial denaturation at 98 °C for 3 min, followed by 25 cycles at 94 °C for 30 s and 55 °C for 2 min. A portion of the OLA reaction was run on an ABI PRISM[™] 310 genetic analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), and the fluorescent OLA products from W1282X or wild-type alleles were automatically quantified by recording the corresponding peak areas or peak heights of the electropherograms with the GeneScan[™] software, v. 2.1 (Applied Biosystems).

Biochemical gene repair assay using cell-free extracts

To assess the chimeraplast-mediated *in vitro* DNA repair activity of IB3.1 cells, we used the cell-free extract system developed by Cole-Strauss *et al.* [26]. Briefly, 30 μ g of cell extract prepared as described by these authors were mixed with 1 μ g of pK^Sm4021 plasmid DNA and 2 μ g of the chimeric oligonucleotide Kan 4021C, in 20 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4, containing 15 mM MgCl₂, 1 mM ATP, and 0.4 mM DTT in a total volume of 100 μ l. The kanamycin-sensitive pK^Sm4021 plasmid contains a functional ampicillin resistance gene (*amp*) and a single base change (T \rightarrow G) at base 4021 that creates a stop codon within the kanamycin resistance gene (*kan*). The 68 nt chimeric RNA/DNA oligonucleotide Kan 4021C was specifically designed to modify the above transversion to G \rightarrow C. The resultant TAC codon in the *kan* gene specifies Tyr like the wild-type TAT codon, allowing discrimination between corrected plasmids from contaminating wild-type plasmids. The above reaction mixture was incubated at 37 °C for 45 min and the plasmid was recovered by performing two rounds of phenol/chloroform (1 : 1) extraction followed by ethanol precipitation.

The resulting plasmid DNA was resuspended in 50 μ l distilled water. Aliquots (2 μ l) of diluted plasmid (1 : 5) were electroporated into 50 μ l of recA1⁻ ElectroMAX DH10B electrocompetent *E. coli* cells (Life Technologies) using 0.2-cm cuvettes and the Gene Pulser electroporator (Bio-Rad; 2.5 kV, 25 μ F, 200 W). The *E. coli* bacteria were recovered at 37 °C for 1 h. An aliquot was diluted to 10⁴–10⁵, and plated on 100 μ g/ml ampicillin plates to determine transformation frequency. Another aliquot

was plated undiluted on 50 μ g/ml kanamycin plates. Gene conversion frequency was expressed as the ratio of kan-resistant colonies per 10⁵ amp-resistant colonies after overnight incubation at 37 °C. Selected colonies were verified by 1% agarose gel electrophoresis following PCR amplification and *Bfal* digestion and/or automated sequencing.

Statistical analysis

General linear models were used to estimate the relationship between peak areas corresponding to wild-type and W1282X mutant alleles and the percentage of wild-type allele within exon 20 of the *CFTR* gene from IB3.1 cells. Expected values derived from the model fitted to the data, and its confidence interval at 95%, were used to plot this relationship.

The significance of the differences between the different chimeraplasts and short single-stranded oligonucleotides and the corresponding mock-transfected controls was determined using Student's t-test. Kolmogorov-Smirnov and chi-square tests were performed to validate the normality of the data. All analyses were done with S-PLUS functions [27]. Unless otherwise indicated, mean values were at least from three independent experiments. Differences with $p < 0.05$ were considered statistically significant.

Results

Genetic characterization of IB3.1 CF airway epithelial cells

To validate the chimeraplasty technology for the *in situ* correction of nonsense mutations within the *CFTR* gene we employed the IB3.1 cells [23]. This widely used and physiologically relevant human CF bronchial epithelial cell line has been well characterized at the molecular level as a compound heterozygote with genotype F508del/W1282X. Our initial genetic screening of the *CFTR* gene confirmed the above genotype but revealed a consistent imbalance between both alleles, the F508del allele being slightly more frequent than the W1282X allele (Figure 2A). This was not unexpected, since the IB3.1 cells were immortalized by infection with an SV40/Adeno hybrid virus [23]. Chromosome number was assessed in the IB3.1 cell stock preserved for the correction experiments. In a total of 40 metaphase spreads, the mean number of chromosomes found was 61, ranging from 53 to 70. A more thorough examination of these cells by FISH analysis using the *CFTR* gene-specific cNX.6d cosmid as a probe revealed the presence of two copies of the *CFTR* gene in 90% of the cell population, whereas the remaining 10% of the cells had three copies of the *CFTR* gene because of a rearranged chromosome 7 with two long arms (iso (7q)) (Figure 2B). This result is consistent with the genotypic imbalance found by genetic analysis, and

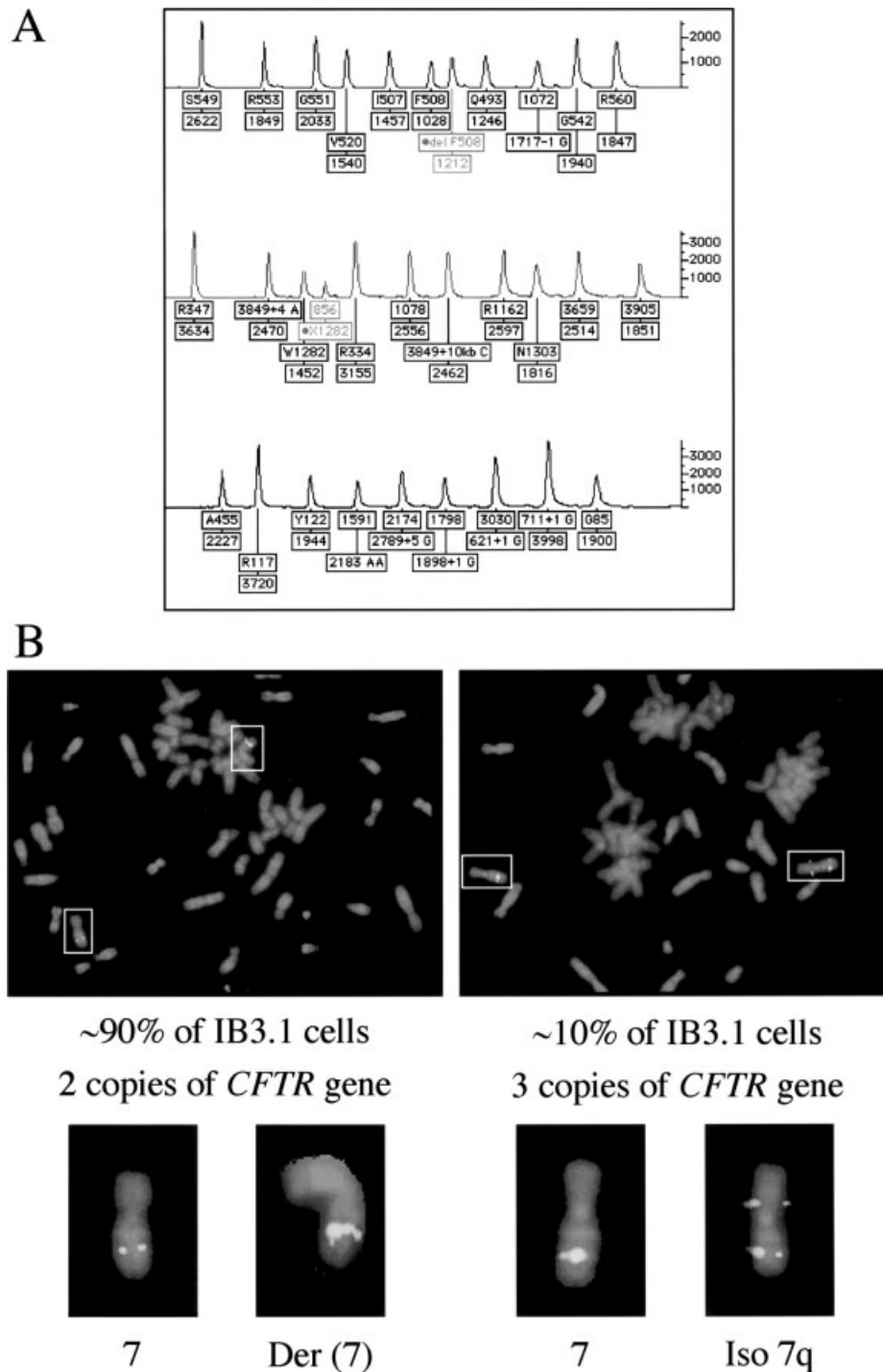


Figure 2. Genetic characterization of the CF bronchial epithelial cell line IB3.1. (A) Genomic DNA isolated from IB3.1 cells was screened for 31 of the most common *CFTR* gene mutations (together accounting for 77% of the CF chromosomes worldwide), including the deletion F508 (within exon 10), and the transversion W1282X (within exon 20), by multiplex PCR/OLA and sequence-coded separation using the Genotyper[®] software (CF multiplex PCR/OLA kit from PE Applied Biosystems). The unbalanced heterozygous nature of the F508del and W1282X mutations is clearly visible in the *CFTR* gene fingerprint from IB3.1 cells. (B) Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) analysis using the probe cNX.6d localized the *CFTR* gene on IB3.1 metaphase spreads. The images indicate the identification and approximate frequency of the chromosome 7 variants containing the *CFTR* gene in the IB3.1 cells

suggests that the rearranged allele contains the F508del mutation. Thus, the above findings are relevant when attempting to undertake and quantify oligonucleotide-mediated correction of the W1282X nonsense mutation in our cellular model.

Ability of IB3.1 CF airway epithelial cells for chimeraplast-directed repair

Several steps were taken to assess the capability of IB3.1 cells to support mismatch repair. Generalized

microsatellite instability is the consequence of DNA mismatch repair deficiency. However, we have found no evidence of microsatellite instability in these cells (data not shown). Moreover, we have analyzed the expression of the genes involved in the MMR complex (MSH2, MSH6, MLH1, PMS2) and of other genes involved in homologous recombination and mismatch recognition (RAD 51, RAD 52, RPA) by RT-PCR, using RNA isolated from IB3.1 cells. All the genes analyzed were expressed (Figure 3). Therefore, the above results suggest the integrity of the MMR and homologous recombination systems in our CF bronchial epithelial cell line IB3.1. Finally, to

directly prove the ability of IB3.1 cells to catalyze site-directed genetic alterations induced by chimeric oligonucleotides, we have utilized an *in vitro* biochemical assay [26], which uses cell-free extracts and a genetic readout in *E. coli*. Applying this methodology, we have demonstrated that IB3.1 cell extracts, when incubated with the appropriate corrector chimeraplast, can promote a single base change (G → C) conversion in a plasmid containing an inactivated kanamycin resistance (*kan^r*) gene, which reverts it to the wild-type genotype, and therefore to the antibiotic resistance phenotype. We found that the ratio of *kan^r*/*amp^r* bacterial colonies using the

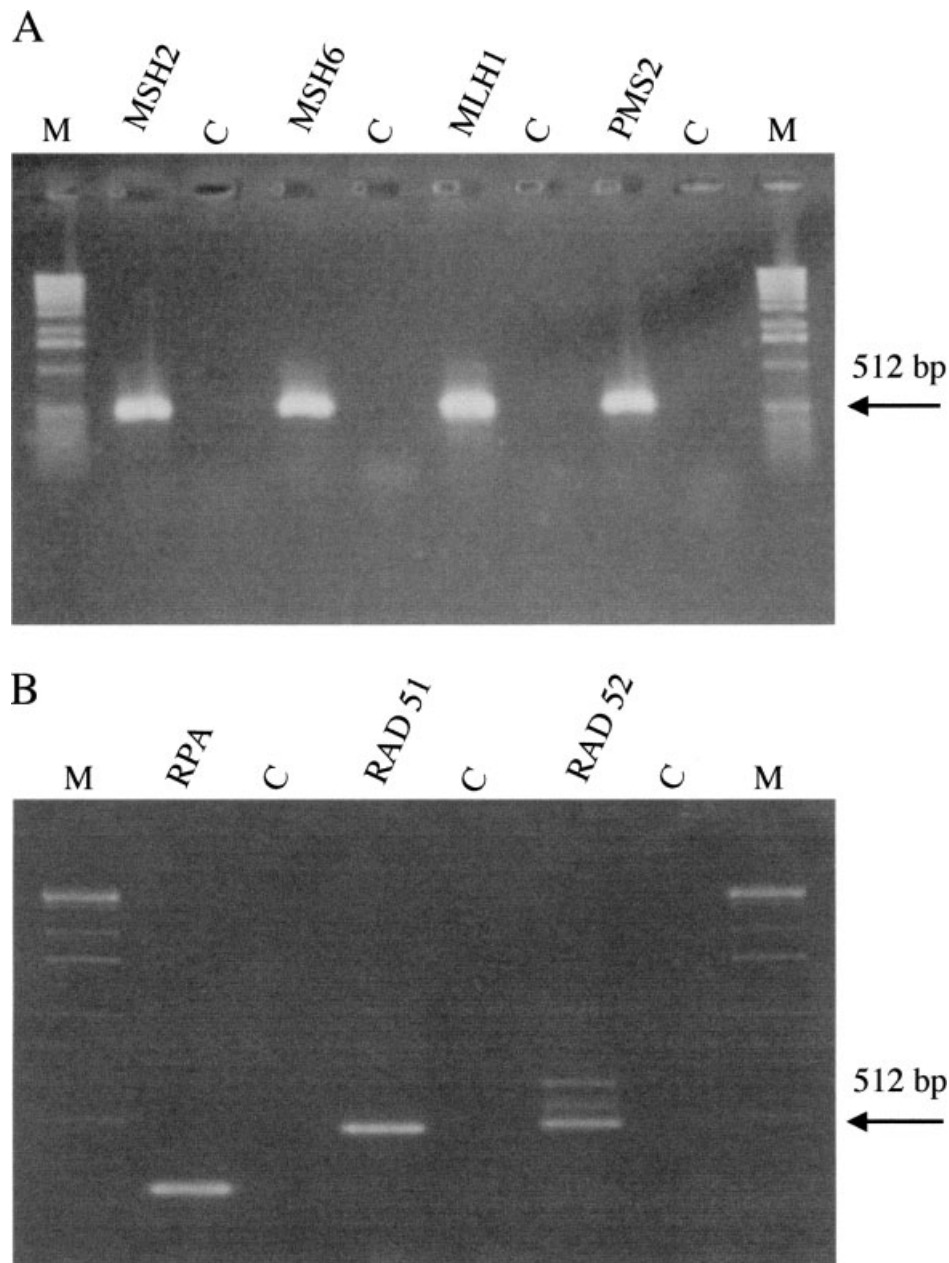


Figure 3. Expression analysis of genes involved in mismatch repair and homologous recombination in IB3.1 airway epithelial cells. Isolated mRNA from IB3.1 cells was reverse transcribed and the corresponding cDNA was amplified with primers specific for genes involved in mismatch repair (A) and homologous recombination (B). The expected sizes of the amplified gene products were as follows: MSH2 gene, 488 bp; MSH6 gene, 485 bp; MLH1 gene, 505 bp; PMS2 gene, 499 bp; RPA gene, 325 bp; RAD 51 gene, 497 bp; RAD 52 gene, 505 bp. M, 1-kb molecular weight marker; the arrows indicate the 512-bp size from one of the marker bands. C, control gene-specific RT-PCR amplification omitting the reverse transcriptase enzyme

IB3.1 cell extract was about 3-fold above that obtained using a cell-free extract from the T cell leukemia line Jurkat, which is MSH2 (−/−), but nearly 5-fold lower than that obtained from the hepatoblastoma HepG2 cells (Table 1). Taken together, these results indicate the competency of the IB3.1 CF epithelial cells to catalyze chimeraplast-mediated mismatch repair.

Adaptation of the PCR/OLA assay for the assessment of the W1282X mutation correction frequency on IB3.1 cells

To assess the percentage of oligonucleotide-directed W1282X mutation correction in the IB3.1 cells, of heterozygous genotype in that locus, we adapted a molecular diagnostic assay, previously employed for the analysis of *CFTR* gene mutations [28,29], which uses fluorescence-based oligonucleotide ligation technology (OLA). As a first step, we optimized the detection of allelic W1282X (G-3978 → A) or wild-type variants within exon 20 of the *CFTR* gene from genomic DNA of IB3.1 cells, on the exponential phase of their amplification. Thus, the designed allelic (upstream) OLA probes had their 3' terminal base (G or A) homologous to either the normal or the mutated sequences, and the common oligonucleotide probe, hybridizing immediately downstream of the allelic probes, was 5'-phosphorylated and modified by addition of the fluorescent dye FAM to its 3' end (see 'Material and Methods' section for details).

Table 1. Targeted repair in cell-free extracts mediated by RNA/DNA oligonucleotides

Plasmid (1 μg)	RNA/DNA ODN (2 μg)	Protein extract (30 μg)	Kan ^r colonies/10 ⁵ Amp ^r colonies
pK ^m 4021	Kan 4021C	IB3.1	0
	–	IB3.1	0
	Kan 4021C	–	0.6
	Kan 4021C	IB3.1	3.5
	–	HepG2	0
	Kan 4021C	HepG2	18.6
	–	Jurkat	0
	Kan 4021C	Jurkat	1.2

Genetic readout utilized *E. coli* DH10B (recA1[−]) cells. Colony counts reflect an average of three independent experiments (standard deviation usually less than ±15%).

Adjustment of two parameters was found to be essential to allow a reliable quantification of the OLA products reflecting the percentage of W1282X and wild-type alleles from the exon 20 locus of the *CFTR* gene in the treated and untreated IB3.1 DNA samples: the nature of the thermostable DNA ligase and the size of the allelic OLA probes.

Specificity of the ligation reaction proved to be critical for a correct quantification of the relative percentage of both the wild-type and the W1282X alleles in a given IB3.1 DNA sample. When using *Thermus aquaticus* (*Taq*) DNA ligase, a significant level of incorrect cross-ligation of mismatched mutant probe hybridized to wild-type target DNA (Figure 4). The same was true when the analysis was performed using opposite strand probes for the

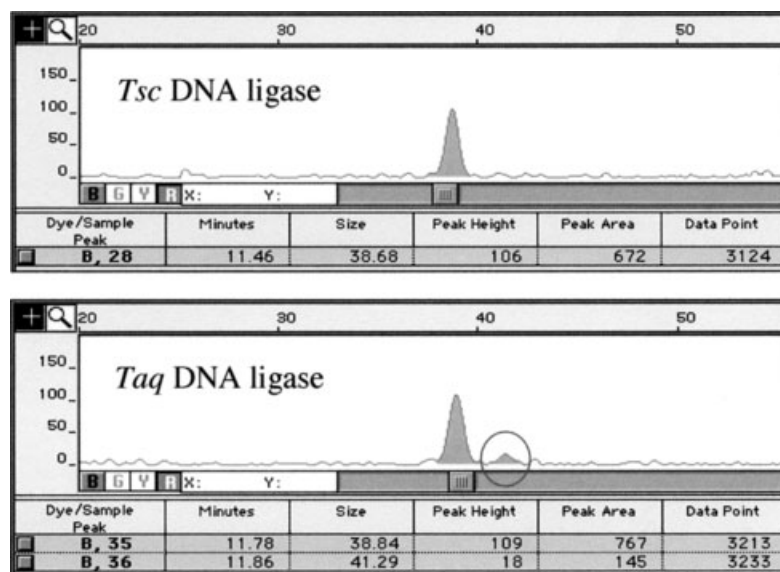


Figure 4. Optimization of the PCR/OLA assay for the relative quantification of the W1282X mutation repair in IB3.1 airway epithelial cells (I). Assessment of DNA ligase specificity. Electropherogram displays represent fluorescence detection of oligonucleotide ligation products (single signal, or dual signal with peaks differing at least 2 bp, depending on the poly-A tails appended to the discriminating allelic probes) formed after hybridization over normal or W1282X mutant *CFTR* target sequences, and analyzed by capillary electrophoresis in an entangled polymer network in 8 M urea. The y-axis displays peak heights/areas measured by fluorescence intensity in arbitrary units, and the x-axis represents migration of the PCR/OLA products according to size, estimated by simultaneous, in-lane running of 29 to 928 bp long marker DNA fragments labeled with the fluorochrome ROX (ROX-GeneScan 1000 size standard; not shown). The figure shows OLA-derived electropherograms from a normal non-CF individual using *Taq* DNA ligase or *Tsc* DNA ligase. Up to 16% of non-specific OLA product resulting from cross-hybridization ligation was detected using *Taq* DNA ligase but not *Tsc* DNA ligase

W1282X mutation (data not shown). Thus, we tested in our PCR/OLA assay the specificity of an alternative commercially available thermostable DNA ligase, the *Thermus scodoductus* (*Tsc*) DNA ligase. This DNA ligase proved to be highly specific for discriminating the wild-type and the W1282X alleles and gave no or insignificant cross-ligation background of mutant allele when a normal DNA from a non-CF individual was tested (Figure 4).

To analyze whether the above PCR/OLA assay could be used for an accurate assessment of the proportion of either W1282X or wild-type allele present in the exon 20 locus of the *CFTR* gene from a DNA sample, we mixed different ratios of genomic DNA isolated from a normal non-CF individual, and from a CF homozygous patient for the W1282X mutation. We analyzed the correlation of these DNA ratios, with the ratio:peak area from the wild-type allele versus the sum of peak areas from both wild-type and mutant alleles, obtained from the GeneScan analysis (Figure 5). In the OLA system, the competing wild-type and mutant allelic probes have to be sized differently so that, upon ligation to the fluorescently labeled common probe, each ligation product has a characteristic electrophoretic mobility [29]. We found that for an accurate quantification at least a 2A base extension difference between the discriminating probes was necessary to yield non-overlapping peak areas for both allelic variants from the corresponding electropherograms (Figure 5A). Furthermore, analysis of different 5'-poly(A) extension combinations revealed that, again, their optimization was needed to achieve a minimal deviation in the estimation of the relative proportion of normal and mutant alleles (Figure 5B). The optimized extensions "5'-AAAA" for the wild-type discriminating OLA probe (WT + 4A), and "5'-AAAAAA" for the W1282X mutant discriminating OLA probe (M + 6A), gave the best regression ($R^2 = 0.996$) in our PCR/OLA assay. Thus, this optimized methodology proved to be suitable for the assessment of the W1282X mutation correction frequency on IB3.1 cells.

Lack of appreciable oligonucleotide-mediated repair on IB3.1 CF airway epithelial cells

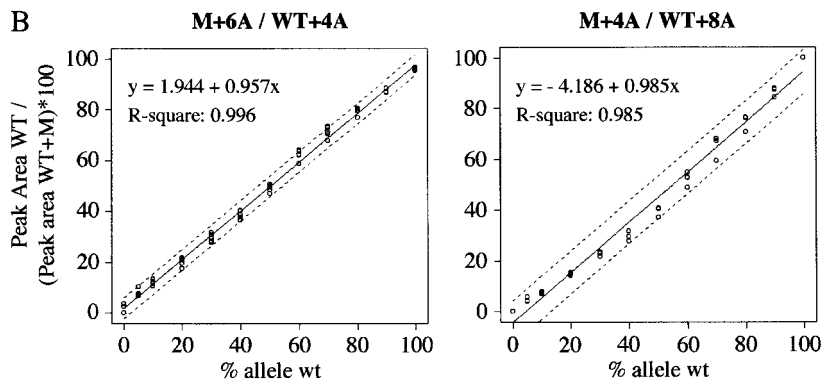
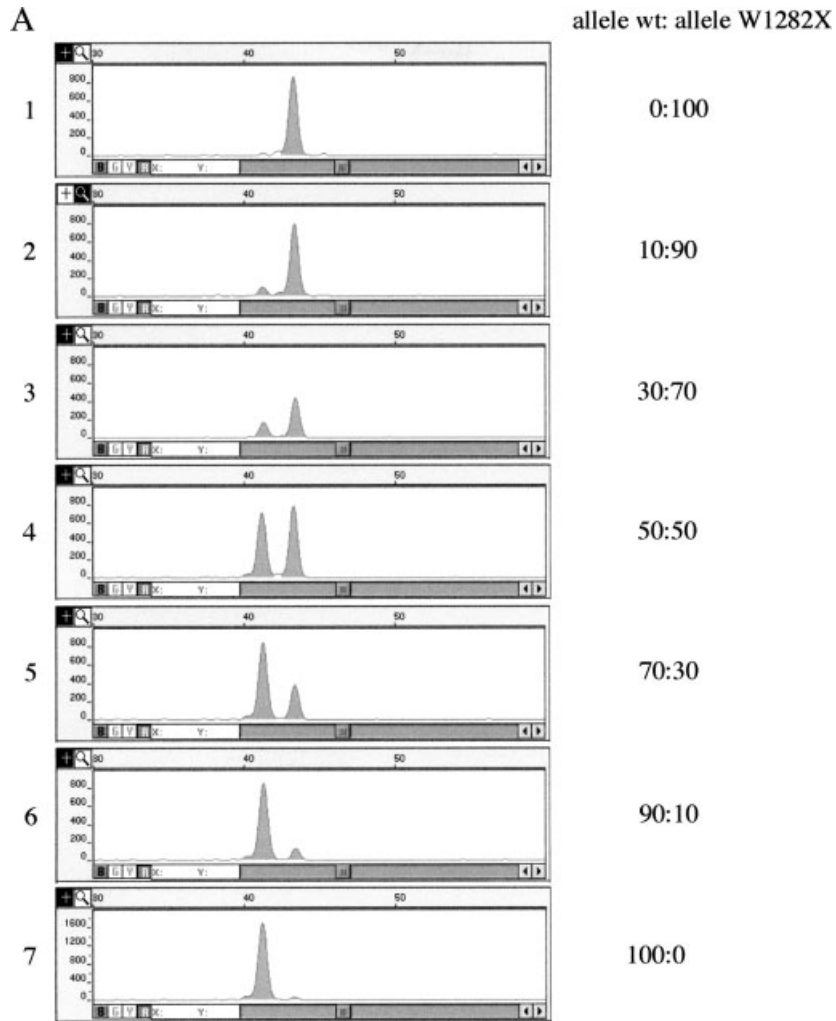
To ascertain whether chimeraplasts and/or short single-stranded oligonucleotides would mediate the permanent correction of the W1282X mutation at physiologically relevant frequencies, capable of yielding a measurable reversion of the CF phenotype [30], we investigated the percentage of oligonucleotide-mediated wild-type allele augmentation on chimeraplast- or short single-stranded oligonucleotide-treated IB3.1 cells with respect to the background wild-type allele already present in the heterozygous untreated IB3.1 cells. We tested different chimeraplast structures (see Figure 1), ranging from the standard 68 nt initial design (CSO-1) [31], and its homologous counterpart targeting the complementary strand of the W1282X DNA locus (CSO-1C), to a 80 nt,

CSO-1-related, chimeraplast with an extended targeting region comprising two runs of 12nt of 2'-O-methyl RNA, separated by a 7 nt stretch of DNA (CSO-2). Moreover, a second generation 80 nt chimeraplast (CSO-3) analogous to CSO-2 was designed and tested taking into account recent structure-activity studies [32]. These authors suggested that making the targeting strand of the chimera entirely of 2'-O-methyl RNA, complementary to the genome, and the DNA strand holding a mismatch to the targeted gene would improve its performance. PEI- and Cytfectin-mediated transfection of these synthetic oligonucleotide structures at 260 nM and 500 nM into IB3.1 cells, evaluated by the parallel incorporation of an irrelevant 68 nt fluorescent chimeraplast under the same conditions [22], was performed with high efficiency (90–100% of the cells incorporated the fluorescent oligonucleotide), and minimal toxicity (>90% viable cells by propidium iodide staining). However, none of the above chimeraplast designs seemed to elicit targeted W1282X point mutation repair on the IB3.1 chromosomes, at least at a level above the sensitivity of our PCR/OLA method of detection (see standard curve from Figure 5B), because, in all cases, the difference between the percentage of the wild-type allele in the transfected IB3.1 cells and that of the wild-type allele present in either untransfected cells or transfected with an irrelevant chimeraplast was not statistically significant (Table 2, and see Figure 6 as an example). Interestingly, a recent study suggested that short single-stranded oligonucleotides, thioate backbone-modified at their ends for protection against nuclease attack, were more active than the original chimera structures in the process of gene repair [33]. Therefore, we tested two additional 25 nt single-stranded oligonucleotide structures (CSO-4 and CSO-4C) complementary to both template strands of the W1282X locus, to discriminate any strand bias for gene correction. These short single-stranded oligonucleotides were synthesized holding five phosphorothioate linkages on their 3' and 5' ends. The non-viral-mediated transfection of CSO-4 and CSO-4C at 260 and 500 nM into IB3.1 cells was analogous to that performed with the different chimeraplasts. In addition, we optimized electroporation as an alternative system for efficient delivery of even increasing amounts of modified oligonucleotides (2.5 μ M for CSO-3; 5 μ M for CSO-4 and CSO-4C) into IB3.1 cells. Again, no significant W1282X mutation correction in the IB3.1 cells was obtained using CSO-3, CSO-4 or CSO-4C oligonucleotides under the different conditions tested (Table 2).

We conclude that the oligonucleotide-mediated targeted repair of the W1282X nonsense mutation within the *CFTR* gene is an inefficient process in the IB3.1 CF bronchial epithelial cells.

Discussion

In this study, we have attempted to demonstrate proof-of-principle for oligonucleotide-directed targeted gene repair



allele wt: allele W1282X	% allele wt	Confidence interval 95%		allele wt: allele W1282X	% allele wt	Confidence interval 95%	
		Predict value	Lower limit			Upper limit	Predict value
0:100	1.94	0	6.02	0:100	0	0	4.43
10:90	11.51	7.46	15.56	10:90	5.67	0	14.20
20:80	21.08	17.05	25.12	20:80	15.52	7.06	23.99
30:70	30.65	26.62	34.67	30:70	25.38	16.96	33.80
40:60	40.22	36.20	44.24	40:60	35.23	26.83	43.63
50:50	49.79	45.77	53.80	50:50	45.09	36.69	53.48
60:40	59.35	55.33	63.38	60:40	54.94	46.53	63.35
70:30	68.92	64.89	72.95	70:30	64.79	56.34	73.25
80:20	78.49	74.44	82.54	80:20	74.65	66.14	83.16
90:10	88.06	83.99	92.12	90:10	84.50	75.91	93.10
100:0	97.63	93.54	100	100:0	94.36	85.66	100

Table 2. Lack of appreciable oligonucleotide-mediated *CFTR* (W1282X) mutation repair on IB3.1 airway epithelial cells

Treatment	Oligo conc. (nM)	Mean % allele wt	<i>p</i> value
CSO-1			
Control		54.09	
PEI	260	54.30	0.755
	500	51.15	0.014*
Cytosfectin	260	53.99	0.885
	500	45.94	<0.001*
CSO-1C			
Control		50.21	
PEI	260	53.05	0.257
	500	51.38	0.540
Cytosfectin	260	52.05	0.344
	500	49.44	0.710
CSO-2			
Control		52.35	
PEI	260	50.75	0.734
	500	49.11	0.477
Cytosfectin	260	52.16	0.968
	500	51.58	0.866
CSO-3			
Control		53.01	
PEI	260	51.34	0.087
	500	51.32	0.098
Cytosfectin	260	52.35	0.520
	500	52.21	0.419
Electrop	2,500	53.39	0.729
CSO-4			
Control		54.14	
PEI	260	54.91	0.664
	500	52.55	0.379
Cytosfectin	260	53.25	0.526
	500	52.56	0.303
Electrop	5,000	54.82	0.668
CSO-4C			
Control		53.81	
PEI	260	52.94	0.599
	500	53.93	0.948
Cytosfectin	260	53.35	0.696
	500	53.63	0.895
Electrop	5,000	54.96	0.453

*Mean values obtained only from two replicates of a unique experiment.

of the W1282X chromosomal point mutation in CF airway epithelial cells. Regarding the cellular model utilized in our experiments, there are not many easily grown, physiologically relevant, and genetically characterized CF cell lines readily available, and most of these were obtained from homozygous patients for the most frequent CF mutation, the F508 deletion. Moreover, this is not the most suitable mutation for attempting oligonucleotide-mediated

correction strategies. Pre-clinical studies have achieved the highest frequencies of oligonucleotide-mediated gene repair when correcting single nucleotide mutations, in the order: replacement > insertion > deletion [13,34]. Thus, we chose the CF bronchial epithelial cell line IB3.1 for our gene repair experiments [23]. Although these cells have a compound heterozygous genotype for the *CFTR* gene (F508del/W1282X), the presence of a G → A transversion in nearly half of their chromosomes makes them amenable to attempt chimeraplast- and short single-stranded oligonucleotide-directed gene repair. Due to their severe CF phenotype, the IB3.1 cells have proven suitable for either gene-mediated [35–37] or pharmacological [30,38] restoration of wild-type *CFTR* expression and function. Notably, it has been shown in the latter case that aminoglycoside antibiotics were able to suppress the W1282X premature stop mutation from IB3.1 cells because of the reappearance of cAMP-activated chloride currents, restoration of *CFTR* protein at the apical plasma membrane, and increase in the abundance of *CFTR* mRNA levels from the W1282X allele. Thus, oligonucleotide-mediated chromosomal correction of this same mutation should lead to an identical but permanent reversion of the CF phenotype in the IB3.1 cells. However, success in this endeavor would depend on the ability of these cells to support targeted repair.

Although the exact mechanism of nucleotide exchange directed by synthetic oligonucleotides is not known, it has been suggested that genes such as MSH2, involved in mismatch repair (MMR), participate at least in the chimeraplast-mediated conversion process [26]. Absence of microsatellite instability suggests the integrity of the MMR system in our cellular model. Moreover, we have verified the expression of the genes whose products are involved in the formation of the MMR complex [39], and of several eukaryotic recombinases such as Rad51 thought to catalyze joint molecule formation mediated by the corrector oligonucleotide [40–43] in the IB3.1 cells. Nevertheless, direct evidence for the ability of these CF bronchial epithelial cells to support chimeraplast-directed targeted gene repair has come when applying the biochemical assay developed by Kmiec's group [26]. Thus, cell-free extracts from IB3.1 cells proved to be capable of stimulating a single-nucleotide transversion when incubated with a kan^S plasmid and its corresponding corrector chimeraplast, although the efficiency of this process was about 5-fold lower than when using a

Figure 5. Optimization of the PCR/OLA assay for the relative quantification of the W1282X mutation repair in IB3.1 airway epithelial cells (II). Sensitivity assessment of the PCR/OLA methodology for the relative quantification of W1282X mutant and wild-type alleles within exon 20 locus of the *CFTR* gene, from DNA of treated or untreated IB3.1 cells. (A) OLA electropherograms are shown using DNAs from a CF-affected individual homozygous for the W1282X mutation (1), from a normal non-CF individual (7), and from graded mixtures of the above DNAs (2 to 6). (B) Standard curves from these samples using different allelic probe combinations such as those shown allowed optimization of the 5' allelic probe length for the best accurate estimation of the frequency of the W1282X mutation correction as a function of the peak areas from both alleles. The linear equation obtained from the M+6A/WT+4A oligonucleotide pair ($y = 0.957x + 1.944$; $r^2 = 0.996$) was used to interpolate wild-type allele frequencies. Each standard curve displays experimental data points from three (M+4A/WT+8A) or six (M+6A/WT+4A) PCR/OLA assays from the same DNA sample. The tables below the standard curves represent the predicted values of % wild-type allele matching the corresponding ratios of non-CF normal DNA (allele wt) to W1282X homozygous DNA (allele W1282X), according to the linear regression model obtained, and their respective lower and upper limits of confidence

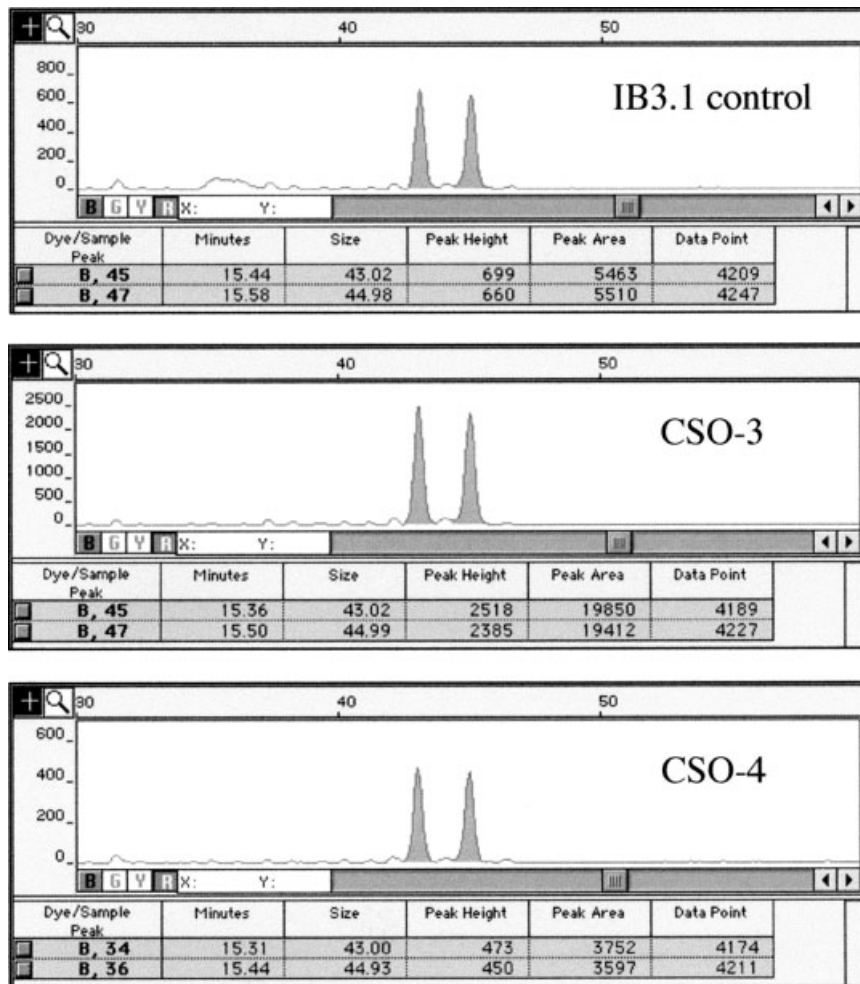


Figure 6. Oligonucleotide-mediated W1282X mutation repair is inefficient in IB3.1 airway epithelial cells. Example of the outcome of the repair experiments performed: genomic DNA from IB3.1 cells either untransfected (control) or transfected with a chimeraplast (CSO-3), or a short single-stranded oligonucleotide (CSO-4), both targeted towards accomplishment of the W1282X *CFTR* A to G transversion, was subjected to the PCR/OLA assay for the relative quantification of the percentage of W1282X mutation correction. The electropherograms obtained show well-defined, independent peaks differing in 2 bp, which correspond to the wild-type and W1282X mutant alleles, respectively. In each case, the percentage of wild-type allele obtained by applying the standard curve from Figure 5 was not statistically different between the control and the oligonucleotide-treated samples

cell-free extract from HepG2 human hepatoblastoma cells. Hepatocytes are the cell type in which the highest chimeraplast-mediated point-mutation repair frequencies have been reported [44]. In contrast, it seems that this process has a lower and variable frequency among epithelial cells [45]. Indeed, Thorpe *et al.* [46] have recently obtained only lower frequencies (0.2–0.6%) of chimeraplast-mediated episomal correction of a reporter gene (GFP W399X) using several epithelial cell lines, when compared with human hepatoma cells (~1.2%).

Thus, our results indicate that CF airway epithelial cells are competent to support chimeraplast-mediated targeted repair, and that it is not inconsistent to attempt *in vivo* oligonucleotide-mediated correction of the W1282X mutation in our cellular model since the limits of targeted gene repair are not yet known.

Clearly, two critical parameters to improve the oligonucleotide-mediated repair frequency are the purity of the synthesized oligonucleotides and the efficiency of their cellular uptake into the target cells [10]. We have

optimized the above parameters for the IB3.1 cells in a previous study [22]. Using both PEI and Cytofectin as non-viral vectors, we have been able to introduce a fluorescence-labeled chimeraplast with high efficiency into the IB3.1 cells. Moreover, in contrast to that reported by Thorpe *et al.* [46], we have detected significant nuclear uptake of the chimeraplast into the nucleus of the CF airway epithelial cells by confocal microscopy, and have evidence that 60–80% of it remains undegraded for at least 48 h post-transfection. Finally, we have also achieved high efficiencies of oligonucleotide uptake and gene expression (using the reporter EGFP) in the IB3.1 cells by electroporation. Thus, it seems that oligonucleotide delivery is not a major limiting factor for targeted gene repair, at least in our epithelial cells.

Given the modest frequencies of correction reported with most of the targeted gene repair experiments, the application of an accurate, sensitive and quantitative technology for detection of mutation repair is essential for the correct estimation of the mutation correction frequencies,

especially in the complex eukaryote cell background. To date, all targeted *in vivo* gene repair studies, either episomal or chromosomal, have been performed against a homozygous background. This facilitates both the probability of correct targeted oligonucleotide-DNA pairing events for a further successful nucleotide conversion process, and the reliable detection of the overall repair efficiencies both qualitatively and quantitatively. The heterozygous nature of our CF airway epithelial cell model for the W1282X mutation required a special effort to optimize a quantitative methodology to determine the frequencies of targeted gene repair. Because our results showed more than 50% of wild-type exon 20 from the F508del-containing chromosomes in the IB3.1 cells, this high background of the 'corrected' allele in the W1282X locus previous to the repair process prevented the use of classical quantitative gene mutation detection such as allele-specific hybridization techniques [14,15,47]. Thus, we took advantage of a powerful DNA diagnostic technology, the fluorescent PCR/OLA, already employed for identification of normal and mutant CF alleles [28,29], to develop an easy, fast, sensitive and specific molecular assay for the relative quantification of the W1282X mutation repair at the genomic level in a diploid setting. Nevertheless, the sensitivity of our relative W1282X single-nucleotide allele discrimination/quantification method (confidence interval at 95% near $\pm 4\%$ allele wild-type) may be lower than that achieved by the above indicated allele-specific hybridization-based assays, although it would allow the reliable detection of the minimum percentage of corrected, wild-type allele in lung epithelial cells (5–10%) that seems to be required for at least partial phenotypic correction of CF, e.g., to favorably increase CFTR-mediated chloride conductance overall [48].

To our knowledge, our adapted PCR/OLA assay is unique in our attempts for a relative quantification of the percentages of the W1282X mutation repair in the heterozygous background of IB3.1 cells. This optimized methodology could also be standardized for a reliable estimation of targeted nonselectable gene repair frequencies for any chromosomal point mutation present either in homozygosis or in heterozygosis.

Although oligonucleotide synthesis and delivery, and the mutation detection assay, have all been optimized for an effective oligonucleotide-mediated repair, we have not been able to detect any significant oligonucleotide-induced *in vivo* repair activity of the W1282X chromosomal mutation in the *CFTR* gene from IB3.1 cells. Another potential limitation of the oligonucleotide-mediated repair process of unknown consequences involves its context specificity. In fact, selection of the repair target (the cell type, the gene, or the specific mutation), and also of the chimeraplast or short single-stranded oligonucleotide structural design, could strongly influence the frequency of targeted gene repair.

Regarding the *CFTR* gene as a repair target, another recently described targeted gene repair technology is based on the use of small DNA fragment homologous replacement (SFHR) to correct mutations by homologous

recombination. Using this technology, a frequency of about 1% efficiency of mutation correction in transformed and primary CF respiratory epithelial cells homozygous for the F508 deletion has been suggested [49]. This low repair efficiency, if attainable by our system, would still be below the limits of confidence of our PCR/OLA detection assay. On the other hand, a preliminary report has indicated that chimeraplasts were able to readily modify the *CFTR* gene in primary rat hepatocytes, but not in human primary epithelial cells [50]. While these studies suggest that the *CFTR* gene is amenable to targeted gene repair, the low or null correction efficiencies obtained up to now with the present gene repair technologies, especially for particular cell types, preclude their use for therapeutic purposes. In addition, it is not known whether different chromosomal loci within a gene will be equally accessible or inducible for oligonucleotide-mediated chromosomal targeted repair.

Finally, it has been demonstrated that the structure of the repair-inducing oligonucleotide influences the frequency of targeted gene repair. We have tested the most relevant chimeraplast structures optimized to date, and also some of the modified single-stranded oligonucleotides reported to be at least as active as chimeraplasts in either bacterial, yeast, and mammalian genetic readout systems [32–34,51]. In addition, we also considered in our study the polarity of the corrective-oligonucleotides. Recent studies have indicated a strand bias for targeted gene repair, with the non-transcribed strand displaying higher level of repair activity than the transcribed strand [34,51,52]. Nevertheless, we have not observed any significant repair activity for the W1282X mutation above the background levels of our detection assay with any of the corrective-oligonucleotides tested. Perhaps using improved corrective-oligonucleotide structures, such as modified short single-stranded oligonucleotides with extended homology (25–100 nucleotides) [34,51], could increase the frequency of targeted gene repair at a level above the detection limit of the PCR/OLA assay in our system.

In summary, we have developed a robust methodology for the relative quantification of point mutation repair in heterozygous individuals employing the PCR/OLA assay. However, using this methodology, we have been unable to validate oligonucleotide-mediated targeted gene repair as an effective approach for the correction of the W1282X mutation within the *CFTR* gene in the repair-competent IB3.1 CF airway epithelial cells. Other authors have also reported persistent failures of gene correction using chimeraplasts [20,21,53] in their systems. Thus, confrontation of negative and positive results will help solve the problem of reproducibility and lack of consistency of oligonucleotide-mediated targeted gene repair strategies. Improvements in each of the factors discussed above, and a thorough knowledge of the precise molecular mechanism of oligonucleotide-mediated targeted gene repair, will be necessary to achieve maximal frequencies of gene conversion.

Notwithstanding, some target cell types, such as airway epithelial cells, or specific chromosomal or genomic regions, may be refractory to oligonucleotide-mediated targeted repair strategies. Extra attention should be paid, whenever possible, to optimize the repair strategies in these difficult systems to achieve therapeutically relevant correction levels [52].

To fulfill its promise for CF gene therapy and bypass some of the mentioned hurdles, oligonucleotide-mediated targeted gene repair could also exploit the exciting possibilities of stem cells, including their *ex vivo* correction and re-implantation in the lung [54,55].

Acknowledgements

We thank Dr Pamela Zeitlin (Johns Hopkins University, Baltimore, MD, USA) for kindly supplying the IB3.1 cell line. We are grateful to Dr Eric Kmiec (University of Delaware, Newark, DE, USA) for providing the pK^Sm4021 plasmid. We also thank M. D. Ramos and F. J. Giménez for their expert technical assistance with the multiplex PCR/OLA CF mutation screening. This work was supported by grant 98/1610 from "Fundació La Marató de TV3", by a research grant from "Fundación Sira Carrasco para ayuda a la fibrosis quística" to JMA, and by a fellowship from "Associació Catalana de Fibrosi Quística" to DS.

References

- Welsh MJ, Ramsey BW, Accurso F, Cutting GR. Cystic fibrosis. In *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, Scriver CR, Beaudet AL, Valle D, Sly WS (eds). McGraw-Hill: New York, 2001; 5121–5188.
- Riordan JR, Rommens JM, Kerem BS, *et al.* Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of the complementary DNA. *Science* 1989; **245**: 1066–1072.
- Welsh MJ. Gene transfer for cystic fibrosis. *J Clin Invest* 1999; **104**: 1165–1166.
- Albelda SM, Wiewrodt R, Zuckerman JB. Gene therapy for lung disease: hype or hope? *Ann Int Med* 2000; **132**: 649–660.
- Harvey BG, Leopold PL, Hackett NR, *et al.* Airway epithelial CFTR mRNA expression in cystic fibrosis patients after repetitive administration of a recombinant adenovirus. *J Clin Invest* 1999; **104**: 1245–1255.
- Noone PG, Hohneker KW, Zhou Z, *et al.* Safety and biological efficacy of a lipid-CFTR complex for gene transfer in the nasal epithelium of adult patients with cystic fibrosis. *Mol Ther* 2000; **1**: 105–114.
- Zeitlin PL. Cystic fibrosis gene therapy trials and tribulations. *Mol Ther* 2000; **1**: 5–6.
- Woolf TM. Therapeutic repair of mutated nucleic acid sequences. *Nat Biotechnol* 1998; **16**: 341–344.
- Yañez RJ, Porter AC. Therapeutic gene targeting. *Gene Ther* 1998; **5**: 149–159.
- Ye S, Cole-Strauss A, Frank B, *et al.* Targeted gene correction: a new strategy for molecular medicine. *Mol Med Today* 1998; **4**: 431–437.
- Gruenert DC. Opportunities and challenges in targeting genes for therapy. *Gene Ther* 1999; **6**: 1347–1348.
- Richardson P, Augustin LB, Kren BT, *et al.* Gene repair and transposon-mediated gene therapy. *Stem Cells* 2002; **20**: 105–118.
- Graham IR, Dixon G. Gene repair and mutagenesis mediated by chimeric RNA-DNA oligonucleotides: chimeraplasty for gene therapy and conversion of single nucleotide polymorphisms (SNPs). *Biochim Biophys Acta* 2002; **1587**: 1–6.
- Cole-Strauss A, Yoon K, Xiang Y, *et al.* Correction of the mutation responsible for sickle cell anemia by an RNA-DNA oligonucleotide. *Science* 1996; **273**: 1386–1389.
- Kren BT, Parashar B, Bandyopadhyay P, *et al.* Correction of the UDP-glucuronosyltransferase gene defect in the Gunn rat model of Crigler-Najjar syndrome type I with a chimeric oligonucleotide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; **96**: 10 349–10 354.
- Tagalakis AD, Graham IR, Riddell DR, *et al.* Gene correction of the apolipoprotein (Apo) E2 phenotype to wild-type ApoE3 by *in situ* chimeraplasty. *J Biol Chem* 2001; **276**: 13226–13230.
- Rando TA, Disatnik MH, Zhou LZ. Rescue of dystrophin expression in mdx mouse muscle by RNA/DNA oligonucleotides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; **97**: 5363–5368.
- Bartlett RJ, Stockinger S, Denis MM, *et al.* *In vivo* targeted repair of a point mutation in the canine dystrophin gene by a chimeric RNA/DNA oligonucleotide. *Nat Biotechnol* 2000; **18**: 615–622.
- Alexeev V, Yoon K. Stable and inheritable changes in genotype and phenotype of albino melanocytes induced by an RNA-DNA oligonucleotide. *Nat Biotechnol* 1998; **16**: 1343–1346.
- Van der Steege G, Schuilenga-Hut PH, Buys CH, *et al.* Persistent failures in gene repair. *Nat Biotechnol* 2001; **19**: 305–306.
- Albuquerque-Silva J, Vassart G, Lavinha J, *et al.* Chimeraplasty validation. *Nat Biotechnol* 2001; **19**: 1011.
- De Semir D, Petriz J, Avinyó A, *et al.* Non-viral vector-mediated uptake, distribution, and stability of chimeraplasts in human airway epithelial cells. *J Gene Med* 2002; **4**: 308–322.
- Zeitlin PL, Lu L, Rhim J, *et al.* A cystic fibrosis bronchial epithelial cell line: immortalization by adeno-12-SV40 infection. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1991; **4**: 313–319.
- Estivill X, McLean C, Nunes V, *et al.* Isolation of a new DNA marker in linkage disequilibrium with cystic fibrosis, situated between J3.II (D7S8) and IRP. *Am J Hum Genet* 1989; **44**: 704–710.
- Available: <http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3.www.cgi>.
- Cole-Strauss A, Gamper H, Holloman WK, *et al.* Targeted gene repair directed by the chimeric RNA/DNA oligonucleotide in a mammalian cell-free extract. *Nucleic Acids Res* 1999; **27**: 1323–1330.
- Venables WN, Ripley BD. *Modern Applied Statistics with S-Plus* (3rd edn). Springer: New York, 1999.
- Grossman PD, Bloch W, Brinson E, *et al.* High-density multiplex detection of nucleic acid sequences: oligonucleotide ligation assay and sequence-coded separation. *Nucleic Acids Res* 1994; **21**: 4527–4534.
- Eggerding FA, Iovannisci DM, Brinson E, *et al.* Fluorescence-based oligonucleotide ligation assay for analysis of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene mutations. *Hum Mut* 1995; **5**: 153–165.
- Bedwell DM, Kaenjak A, Benos DJ, *et al.* Suppression of a CFTR premature stop mutation in a bronchial epithelial cell line. *Nat Med* 1997; **3**: 1280–1284.
- Yoon K, Cole-Strauss A, Kmiec EB. Targeted gene correction of episomal DNA in mammalian cells mediated by a chimeric RNA-DNA oligonucleotide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; **93**: 2071–2076.
- Gamper HB, Cole-Strauss A, Metz R, *et al.* A plausible mechanism for gene correction by chimeric oligonucleotides. *Biochemistry* 2000; **39**: 5808–5816.
- Gamper HB, Parekh H, Rice MC, *et al.* The DNA strand of chimeric RNA/DNA oligonucleotides can direct gene repair/conversion activity in mammalian and plant cell-free extracts. *Nucleic Acids Res* 2000; **28**: 4332–4339.
- Liu L, Rice MC, Kmiec EB. *In vivo* gene repair of point and frameshift mutations directed by chimeric RNA/DNA oligonucleotides and modified single-stranded oligonucleotides. *Nucleic Acids Res* 2001; **29**: 4238–4250.
- Egan ME, Schwiebert EM, Guggino WB. Differential expression of ORCC and CFTR induced by low temperature in CF airway epithelial cells. *Am J Physiol* 1995; **268**: C243–251.
- Kearns WG, Afione SA, Fulmer SB, *et al.* Recombinant adeno-associated virus (AAV-CFTR) vectors do not integrate in a site-specific fashion in an immortalized epithelial cell line. *Gene Ther* 1996; **3**: 748–755.
- Wersto RP, Rosenthal ER, Crystal RG, *et al.* Uptake of fluorescent dyes associated with the functional expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; **93**: 1167–1172.

38. Egan ME, Glockner-Pagel J, Ambrose C, *et al.* Calcium-pump inhibitors induce functional surface expression of DeltaF508-CFTR protein in cystic fibrosis epithelial cells. *Nat Med* 2002; **8**: 485–492.
39. Jiricny J. Mediating mismatch repair. *Nat Genet* 2000; **24**: 6–8.
40. Park MS, Ludwig DL, Stigger E, *et al.* Physical interaction between human RAD52 and RPA is required for homologous recombination in mammalian cells. *J Biol Chem* 1996; **271**: 18 996–19 000.
41. New JH, Sugiyama T, Zaitseva E, *et al.* Rad52 protein stimulates DNA strand exchange by Rad51 and replication protein A. *Nature* 1998; **391**: 407–410.
42. Yañez RJ, Porter AC. Gene targeting is enhanced in human cells overexpressing hRAD51. *Gene Ther* 1999; **6**: 1282–1290.
43. Rice MC, Czymmek K, Kmiec EB. The potential of nucleic acid repair in functional genomics. *Nat Biotechnol* 2001; **19**: 321–326.
44. Richardson PD, Kren BT, Steer CJ. Gene repair in the new age of gene therapy. *Hepatology* 2002; **35**: 512–518.
45. Santana E, Peritz AE, Iyer S, *et al.* Different frequency of gene targeting events by the RNA-DNA oligonucleotide among epithelial cells. *J Invest Dermatol* 1998; **111**: 1172–1177.
46. Thorpe PH, Stevenson BJ, Porteous DJ. Functional correction of episomal mutations with short DNA fragments and RNA-DNA oligonucleotides. *J Gene Med* 2002; **4**: 195–204.
47. Kren BT, Bandyopadhyay P, Steer CJ. *In vivo* site-directed mutagenesis of the factor IX gene by chimeric RNA/DNA oligonucleotides. *Nat Med* 1998; **4**: 285–290.
48. Johnson LG, Olsen JC, Sarkadi B, *et al.* Efficiency of gene transfer for restoration of normal airway epithelial function in cystic fibrosis. *Nat Genet* 1992; **2**: 21–25.
49. Goncz KK, Kunzelmann K, Xu Z, *et al.* Targeted replacement of normal and mutant CFTR sequences in human airway epithelial cells using DNA fragments. *Hum Mol Genet* 1998; **7**: 1913–1919.
50. Griesenbach U, Kren BT, Stern M, *et al.* Conversion of wild-type CFTR to the G551D mutation in primary rat hepatocytes using RNA/DNA oligonucleotides. *Pediatr Pulmonol* 2001; **32**(Suppl. 22): 252.
51. Igoucheva O, Alexeev V, Yoon K. Targeted gene correction by small single-stranded oligonucleotides in mammalian cells. *Gene Ther* 2001; **8**: 391–399.
52. Liu L, Rice MC, Drury M, *et al.* Strand bias in targeted gene repair is influenced by transcriptional activity. *Mol Cell Biol* 2002; **22**: 3852–3863.
53. Strauss M. The site-specific correction of genetic defects. *Nat Med* 1998; **4**: 274–275.
54. Krause DS, Theise ND, Collector MI, *et al.* Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell* 2001; **105**: 369–377.
55. Borthwick DW, Shahbazian M, Krantz QT, *et al.* Evidence for stem-cell niches in the tracheal epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001; **24**: 662–670.

Brief Communication

Misleading Gene Conversion Frequencies Due to a PCR Artifact Using Small Fragment Homologous Replacement

DAVID DE SEMIR and JOSEP M. ARAN

ABSTRACT

Recent studies have reported successful correction of the most common F508del mutation in cystic fibrosis (CF) airway epithelial cells by small fragment homologous replacement (SFHR). We wished to apply the SFHR methodology to our CF bronchial epithelial cells, of compound heterozygous genotype (F508del/W1282X), in which nucleic acid transfer was previously optimized by electroporation. Using a PCR-based detection methodology, with one of the primers located outside the SFHR homology region, we obtained SFHR dose-dependent F508del to wild-type *CFTR* gene conversion frequencies reaching 30%. However, the increased wild-type/F508del *CFTR* allele ratio was transient, vanishing at 5 days posttransfection. Furthermore, we have been unable to reproduce the SFHR-mediated repair of the F508del mutation in our cellular model when both detection primers were located outside the SFHR homology region. A thorough reexamination of our initial detection strategy revealed that a false positive result was originated from a PCR artifact created by the SFHR fragment itself. Thus, nonamplifiable detection methods, such as Southern blotting, protein analysis, or functional assays, should be performed, whenever possible, to correctly assess gene conversion frequencies.

INTRODUCTION

CYSTIC FIBROSIS (CF), caused by mutations within the *CFTR* gene, remains today a lethal respiratory disorder in most of the affected individuals despite significant advances evidenced in both preventive and symptomatic therapies during the last decade (Welsh et al., 2001). Moreover, attempts to develop an effective gene therapy for CF have been disappointing, according to the experience from the 18 *CFTR* gene addition clinical trials performed worldwide since its identification in 1989. Important limitations inherent to both the pathophysiology of the CF airways and the developmental status of viral and nonviral vectors have hindered efficient *CFTR* gene transfer and physiologic and persistent recombinant

CFTR expression in the diseased lungs. Thus, encouraging prospects are progressively being turned on emerging technologies based in the therapeutic repair of mutated nucleic acid sequences (Woolf, 1998; Yañez and Porter, 1998; Richardson et al., 2002). For example, spliceosome-mediated *trans*-splicing (SmaRT) was recently able to generate wild-type *CFTR* mRNA, and 22% of wild-type *CFTR* function could be restored, albeit transiently (Liu et al., 2002).

Alternatively, genomic DNA repair methodologies should be more desirable, obviating their potential long-term effect over the cause of CF lung disease. One of them, the use of chimeric RNA/DNA oligonucleotides to induce targeted mismatch repair in the mutated cells, termed chimeraplasty, seems to be very promising at

least for some tissue types, such as hepatocytes (Ye et al., 1998; Richardson et al., 2002; Graham and Dixon, 2002). However, chimeraplasty has recently spurred controversy regarding its reproducibility and reported efficiency (Van der Steege et al., 2001; Albuquerque-Silva et al., 2001; Taubes, 2002). Another recently described targeted DNA repair strategy, small fragment homologous replacement (SFHR), based in the use of short fragments of single-stranded (ss) DNA of about 500 nt in length, has been able to correct genomic mutations in cultured cells (Gruenert, 1998; 1999, Goncz and Gruenert, 2001; Kapsa et al., 2001; Goncz et al., 2002). Near therapeutic F508del to wild-type *CFTR* reversion efficiencies have been reported mediated by SFHR in CF cell lines and primary cells (Kunzelmann et al., 1996; Goncz et al., 1998). Furthermore, a recent study in mice has described SFHR-mediated wild-type to F508del conversion, albeit at low frequency (Goncz et al., 2001). In all these studies, however, there has been scarce evidence of phenotypic correction, in part due to the complex phenotypic detection of *CFTR* function. The determination of repair frequencies in nonselectable/nonreporter genes, such as *CFTR*, relies mainly on PCR-based methodologies. Although very sensitive, the PCR reactions may generate misleading artifacts, as has been observed in gene conversion mediated by chimeric oligonucleotides, which limits the accuracy of targeting efficiency quantification (Zhang et al., 1998). In this study, we emphasize the problems encountered using a PCR-based approach to assess a reliable repair frequency of the F508del mutation present in CF bronchial epithelial cells using SFHR.

MATERIALS AND METHODS

Generation of ssDNA fragments

A 493-bp DNA fragment including exon 10 of the wild-type *CFTR* gene was amplified from genomic DNA isolated from a non-CF individual using intronic primers 10i5' (5'-GCAGAGTACCTGAAACAGGA-3') and 10i3' (5'-CATTACAGTAGCTTACCCA-3'). The PCR reaction was carried out in a 50 μ l volume containing 500 ng genomic DNA, 150 μ M dNTPs, 15 pmol of the primers, 5 μ l *Taq* DNA polymerase buffer, and 0.25 μ l *Taq* DNA polymerase (5 U/ μ l) (Roche, Basel, Switzerland), in a GeneAmp[®] PCR System 2400 DNA thermocycler (Perkin-Elmer, Shelton, CT). Amplification conditions consisted on an initial 1 minute denaturation step at 95°C, followed by 35 cycles (94°C for 20 seconds, denaturation; 56°C for 30 seconds, annealing; 72°C for 30 seconds, extension) and a final extension of 10 minutes at 72°C. The purified PCR fragment was further cloned into the pGEM T-easy vector (Promega, Madison,

WI) and sequenced. One of the clones sequenced, pGEM-SFHR, incorporating the 493-bp wild-type *CFTR* DNA fragment along with the M470V polymorphism, was used as a template to generate the ssDNA fragment used for transfection. Briefly, the PCR amplifications for that purpose were prepared in 100 μ l aliquots containing 5 μ l of a 1:20,000 dilution of pGEM-SFHR, 200 μ M dNTPs, 30 pmol of primers FF2 (5'-GCAAGTGAATCCTGAGCGTGA-3') and FR2 (5'-CCATTACAGTAGCTTACCCATAGAGG-3'), 10 μ l *Taq* DNA polymerase buffer, and 0.5 μ l *Taq* DNA polymerase (5 U/ μ l) in the GeneAmp PCR System 2400 DNA thermocycler using an initial 1 minute denaturation step at 95°C, followed by 35 cycles (95°C for 1 minute, denaturation; 65°C for 1 minute, annealing; 72°C for 1 minute, extension), and a final extension of 7 minutes at 72°C. The integrity of the resulting 388-bp DNA fragment was analyzed by 1% agarose electrophoresis. This DNA, pooled from several of the described PCR reactions, was purified by phenol:chloroform:isoamyl alcohol extraction, precipitated with 0.5 volumes of 5 M ammonium acetate and 2 volumes of 100% ethanol, and quantified spectrophotometrically. Finally, the ssDNA fragment for SFHR was generated just before transfection by heat denaturation at 98°C for 10 minutes and rapid cooling on ice (Kunzelmann et al., 1996; Goncz et al., 1998; 2001).

Cells and transfections

The CF bronchial epithelial cell line IB3.1 (Zeitlin et al., 1991) was cultured in CF medium—LHC-8 basal medium (Biofluids, Rockville, MD) containing 100 U/ml penicillin/streptomycin (Life Technologies, Gaithersburg, MD), 0.2 mg/ml imipenem (Merck, West Point, PA), 80 μ g/ml tobramycin (Eli Lilly, Indianapolis, IN), 2.5 μ g/ml fungizone (Life Technologies), and 5% fetal bovine serum (FBS)—and maintained at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere.

The ss small DNA fragment was introduced into the IB3.1 cells by electroporation. Thus, these cells grown to 70%–80% confluence were trypsinized and resuspended in cold phosphate-buffered saline (PBS) at 10⁷ cells/ml. A volume of 500 μ l of this cell suspension was then mixed with the appropriate amount of ss small DNA fragment and placed on ice for 10 minutes. Electroporation was performed in 0.4-cm cuvettes, at 260 V and 950 μ F, in a Gene Pulser electroporator (Bio-Rad, Hercules, CA). These electroporation parameters were previously optimized by assessing both the uptake efficiency of a long fluorescent oligonucleotide (De Semir et al., 2002) and the percentage of expression of the reporter plasmid pEGFP-N1 (Clontech Laboratories Inc., Palo Alto, CA) (data not shown), both analyzed by flow cytometry. Immediately after the electrical pulse, cells were transferred into an Eppendorf tube, centrifuged at 12,000g for 20

seconds, and left at ambient temperature for 20 minutes. Finally, the PBS supernatant containing cell debris from lysed cells was discarded, and the cell pellet was resuspended and plated in CF medium.

DNA isolation and genotyping

Genomic DNA was extracted either from freshly grown or from frozen IB3.1 cell pellets according to standard procedures. Briefly, IB3.1 cell pellets were resuspended in proteinase K digestion buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% SDS, and 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ proteinase K) and incubated for 3 hours at 50°C, with occasional mixing. DNA was precipitated with isopropanol, washed with 70% ethanol, air-dried, and resuspended in a small volume (100–200 μl) of TE, pH 8.0.

A 349-bp DNA fragment including the exon 10 of the *CFTR* gene was amplified from genomic DNA isolated from IB3.1 cells, using primers 10i5' (5'-GCAGAG-TACCTGAAACAGGA-3'), and C16D (5'-CTCTTC-TAGTTGGCATGCTTTGATGACGCTTC-3'). For PCR product detection, one primer of the primer pair was fluorescently labeled with FITC. The PCR reactions were carried out in a 50- μl volume containing 500 ng genomic DNA, 150 μM dNTPs, 15 pmol of the primers, 5 μl *Taq* DNA polymerase buffer, and 0.25 μl *Taq* DNA polymerase (5 U/ μl) in a GeneAmp PCR System 2400 DNA thermocycler. A control PCR reaction containing no DNA was included in each PCR reaction to monitor for contamination of PCR reagents. Amplification conditions consisted of an initial 4 minute denaturation step at 94°C, followed by 32 cycles (94°C for 30 seconds, denaturation; 59°C for 40 seconds, annealing; 72°C for 50 seconds, extension) and a final extension of 7 min at 72°C. A 10- μl aliquot of the PCR reaction from cycle 32 was analyzed in 1% agarose electrophoresis to verify specific amplification of the PCR product. A portion of the PCR reaction was run on an ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA), and the fluorescent PCR products were automatically quantified by recording the corresponding peak areas or peak heights of the electropherograms with the GeneScan™ software, v. 2.1 (Applied Biosystems).

RESULTS AND DISCUSSION

SFHR is a novel targeted gene repair strategy that has been employed recently to modify the F508del locus within the *CFTR* gene, in both cellular and animal models (reviewed in Goncz and Gruenert, 1998). Unlike chimeraplasty, which uses long and structured RNA/DNA oligonucleotides to elicit a significant level of *in situ* gene repair (Ye et al., 1998; Kren et al., 1998,

1999), SFHR has achieved only modest correction frequencies ranging from 1% up to 10% (Kunzelmann et al., 1996; Goncz et al., 1998). For a potential therapeutic benefit in CF patients, it has been shown that 5%–10% of wild-type *CFTR* channel is necessary to overcome at least some of the abnormal phenotypic traits, such as chloride transport (Johnson et al., 1992). We wished to improve the conditions to obtain maximal correction of the *CFTR* mutation F508del in our cellular model, the adeno-SV40-transformed bronchial epithelial cell line IB3.1, isolated from a CF patient with genotype F508del/W1282X (Zeitlin et al., 1991). We have shown previously that these cells are easily transfectable and competent for chimeraplast-mediated targeted gene repair (De Semir et al., 2002, 2003). Therefore, we designed and PCR-synthesized a 388-bp SFHR DNA fragment including part of introns 9 and 10 and the complete exon 10 of the *CFTR* gene from genomic DNA of a normal individual (Fig. 1A). On introduction of the corrective single DNA strands generated from the PCR fragment into IB3.1 cells, we analyzed conversion frequencies in the F508del locus from genomic DNA isolated from the treated IB3.1 cells at 2–5 days posttransfection. Similarly as performed with the detection of the oligonucleotide-mediated W1282X correction frequency in IB3.1 cells (De Semir et al., 2003), we optimized the analysis of the percentage of F508del mutation repair in a heterozygous background using exponential PCR and genotyping. In this case, the PCR-OLA step was omitted because the 3-nt deletion enabled a good discrimination of the corresponding F508del and wild-type allele fragments by capillary electrophoresis. Analogous to that described in similar studies (Kunzelmann, 1996; Kapsa, 2001), to ensure that the genomic F508del locus was specifically amplified, one of the PCR detection primers (10i5') was located within intron 9 but outside the region of homology with the SFHR fragment (see Fig. 1A for details). Reliable quantification using this methodology allowed the estimation of the relative proportion of normal and mutant alleles present in the IB3.1 cells before and after the SFHR treatment (95% confidence interval [95% CI] \pm 4% allele wild-type) (Fig. 1B).

To ascertain whether our designed short ssDNA fragment would mediate the permanent correction of the F508del mutation at physiologically relevant frequencies, capable of yielding a measurable reversion of the CF phenotype (Bedwell et al., 1997), we investigated the percentage of wild-type allele augmentation on SFHR-treated IB3.1 cells with respect to the background wild-type allele already present in these F508del heterozygous cells. We consistently detected in their genomic DNA an F508del to wild-type allele conversion frequency of 18%–19% by SFHR treatment (8 μg). Moreover, this conversion frequency seemed to be dose dependent, yielding up to 30% F508del mutation correction at the

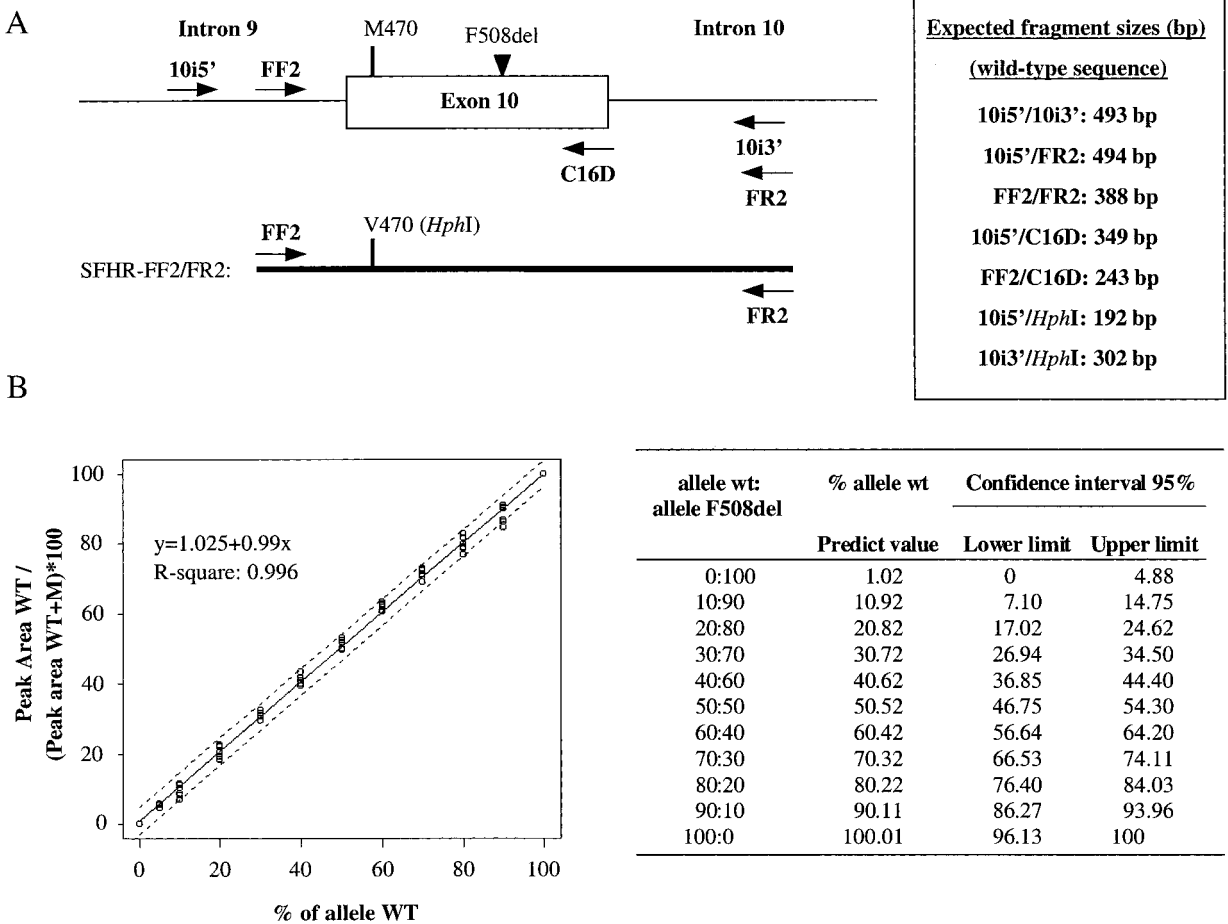


FIG. 1. SFHR-mediated targeted *CFTR* F508del repair in CF airway epithelial cells. **(A)** Schematic representation of the genomic *CFTR* locus from the F508del allele, SFHR fragment design, and primer localization for the detection of SFHR-mediated F508del to wild-type *CFTR* conversion frequencies in the IB3.1 cells. The 388-bp SFHR fragment designed included a *CFTR* gene region expanding 59 bp from intron 9, the entire exon 10, and 137 bp from intron 10. This DNA fragment was generated from a normal, non-CF individual carrying the M470V polymorphism (A → G transversion), which involves the presence of an *HphI* restriction site, useful for the detection of SFHR-mediated effects on the treated IB3.1 cells. The relative positions of forward and reverse primers for both the synthesis of the corrective SFHR fragment (FF2/FR2) and the detection of targeted conversion frequencies (10i5'/C16D) are also indicated. **(B)** Sensitivity assessment of the fluorescent PCR methodology for the relative quantification of F508del and wild-type alleles within exon 10 locus of the *CFTR* gene, from DNA of SFHR-treated or untreated IB3.1 cells. The standard curve was obtained from electropherogram peak areas corresponding to fluorescent, PCR-amplified F508del and wild-type *CFTR* allele fragments using graded mixtures of genomic DNA between a CF-affected F508del homozygous individual and a normal non-CF individual. The values displayed are from three different experiments performed in duplicate. The linear equation obtained ($y = 1.025 + 0.99x$; $r^2 = 0.996$) was used to interpolate wild-type allele frequencies for the best accurate estimation of the percentage of the F508del mutation correction as a function of the peak areas from both alleles. The table shows the predicted values of percent wild-type allele matching the corresponding ratios of non-CF normal DNA (allele wt) to F508del homozygous DNA (allele F508del), according to the linear regression model obtained and their respective lower and upper limits of confidence at 95%.

highest amount of SFHR tested (18 μ g) (Fig. 2A). Furthermore, as the corrective short ssDNA fragments used were amplified using genomic DNA from a normal individual holding the M470V polymorphism and the IB3.1 target cells did not contain this A → G transversion, SFHR-mediated repair of *CFTR* exon 10 locus could be corroborated by *HphI* digestion and PAGE fractionation

of PCR-amplified genomic DNA from treated IB3.1 cells (Fig. 2B). These DNA fragments were also cloned and sequenced to confirm both the correction of the F508del mutation and the introduction of the M470V transversion (data not shown).

Nevertheless, after isolating and genotype screening 166 SFHR-treated IB3.1 single-cell clones by limiting di-

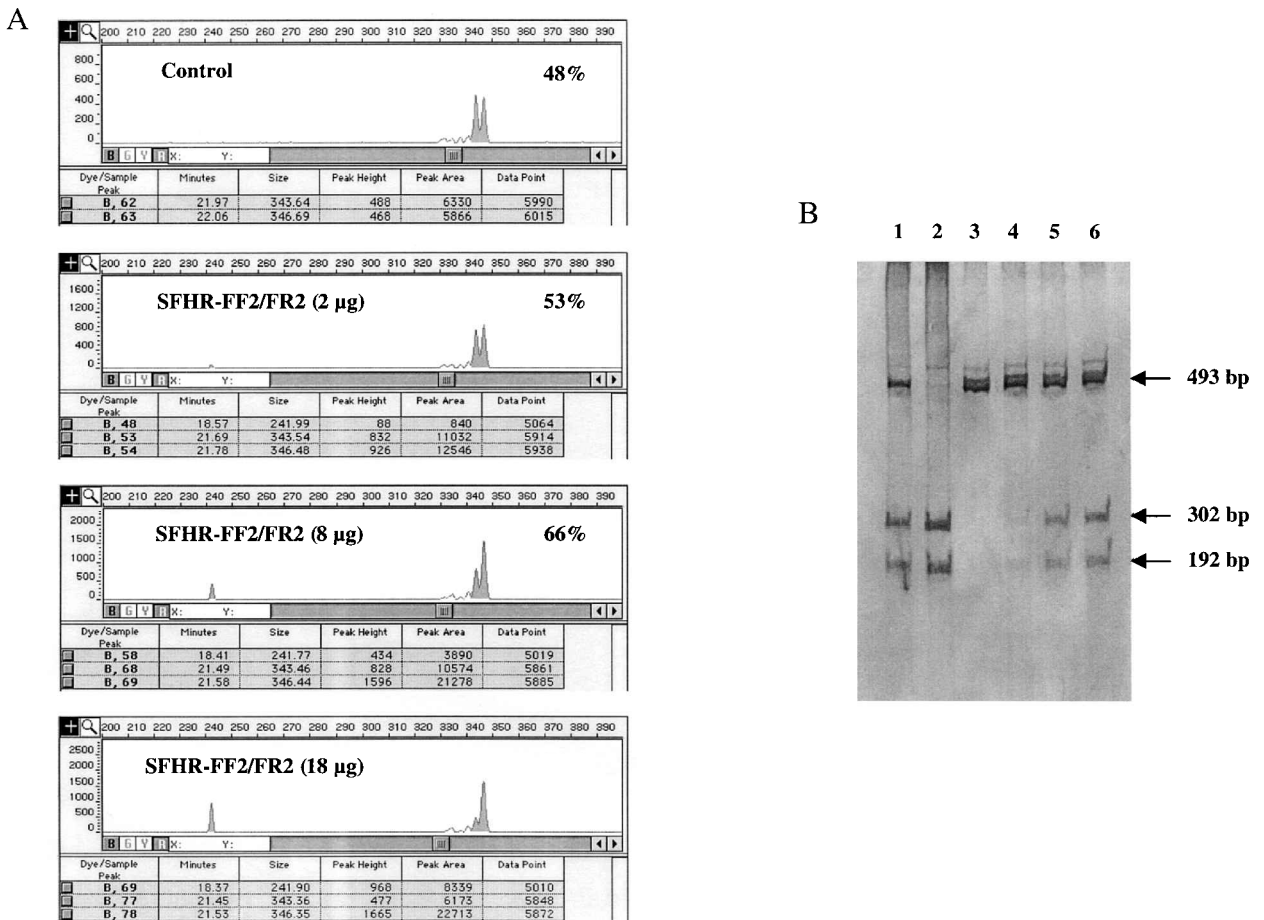


FIG. 2. Misleading high frequency of SFHR-mediated *CFTR* F508del gene correction in CF airway epithelial cells. **(A)** Genomic DNA from IB3.1 cells, either untransfected (control) or transfected with the indicated amounts of the corrective SFHR fragment, was subjected to the fluorescent PCR assay for the relative quantification of the percentage of F508del mutation repair. Electropherogram displays represent fluorescence detection of the PCR products (dual signal with peaks differing 3 bp, amplified with primer pair 10i5'/FITC-C16D) corresponding to the F508del and wild-type alleles, respectively, resolved by capillary electrophoresis in an entangled polymer network in 8 M urea. The y-axes display peak heights/areas measured by fluorescence intensity in arbitrary units, and the x-axes represent migration of the fluorescent PCR products according to size, estimated by simultaneous, in-lane running of 50–400 bp long marker DNA fragments labeled with the fluorochrome ROX (ROX-GeneScan 400 size standard; not shown). The indicated percentages of wild-type allele were obtained by applying the standard curve from Figure 1B. **(B)** To assess the introduction of the M470V polymorphism (A → G transversion) from the SFHR fragment into genomic DNA from transfected IB3.1 cells, the PCR-amplified products using primer pair 10i5'/10i3' around the exon 10 locus were subjected to *HphI* digestion and 6% PAGE fractionation. Silver staining band pattern obtained from one representative experiment. Lane 1, genomic DNA from a heterozygous (M470V/WT) individual; lane 2, genomic DNA from a homozygous (M470V/M470V) individual; lane 3, genomic DNA from untreated IB3.1 cells; lanes 4–6, genomic DNA from SFHR-treated IB3.1 cells (with 2, 8, and 18 μ g, respectively).

lution, none of them was found to acquire the homozygous wild-type genotype in the F508del locus. Besides, SFHR-mediated F508del repair was a transient event in the treated IB3.1 cells. Thus, after the second passage (3–5 days posttransfection), the percentages of F508del and wild-type alleles in the *CFTR* exon 10 locus of these cells approached 50%, similar to those found on untreated IB3.1 cells. These findings raised suspicion for a

somehow toxic phenotype resulting from the *novo* expression of wild-type *CFTR* in the IB3.1 cells or, more likely, for a potential artifact in the methodology to detect the SFHR-mediated repair frequencies. We definitely turned toward this second possibility when a time course SFHR-mediated repair experiment revealed F508del to wild-type conversion already at zero time, just after electroporating the IB3.1 cells with the correc-

tive small ssDNA fragment (data not shown). Moreover, an *in vitro* mixing experiment using genomic DNA from untreated IB3.1 cells and the corrective SFHR small ssDNA fragment produced different *CFTR* F508del and wild-type allele frequencies, simulating the induction of targeted conversion on genomic DNA from the IB3.1 cells. The increased frequency of *CFTR* wild-type allele

detected was again dependent on the amount of the small DNA fragment used (from almost absence of conversion at 10 pg SFHR fragment to 26% F508del to wild-type *CFTR* allele conversion at 1 ng SFHR fragment) (Fig. 3A). Furthermore, additional spurious bands could be detected depending on the location of the FITC fluorescent label in either of the detection primer pair (Fig. 3B) when

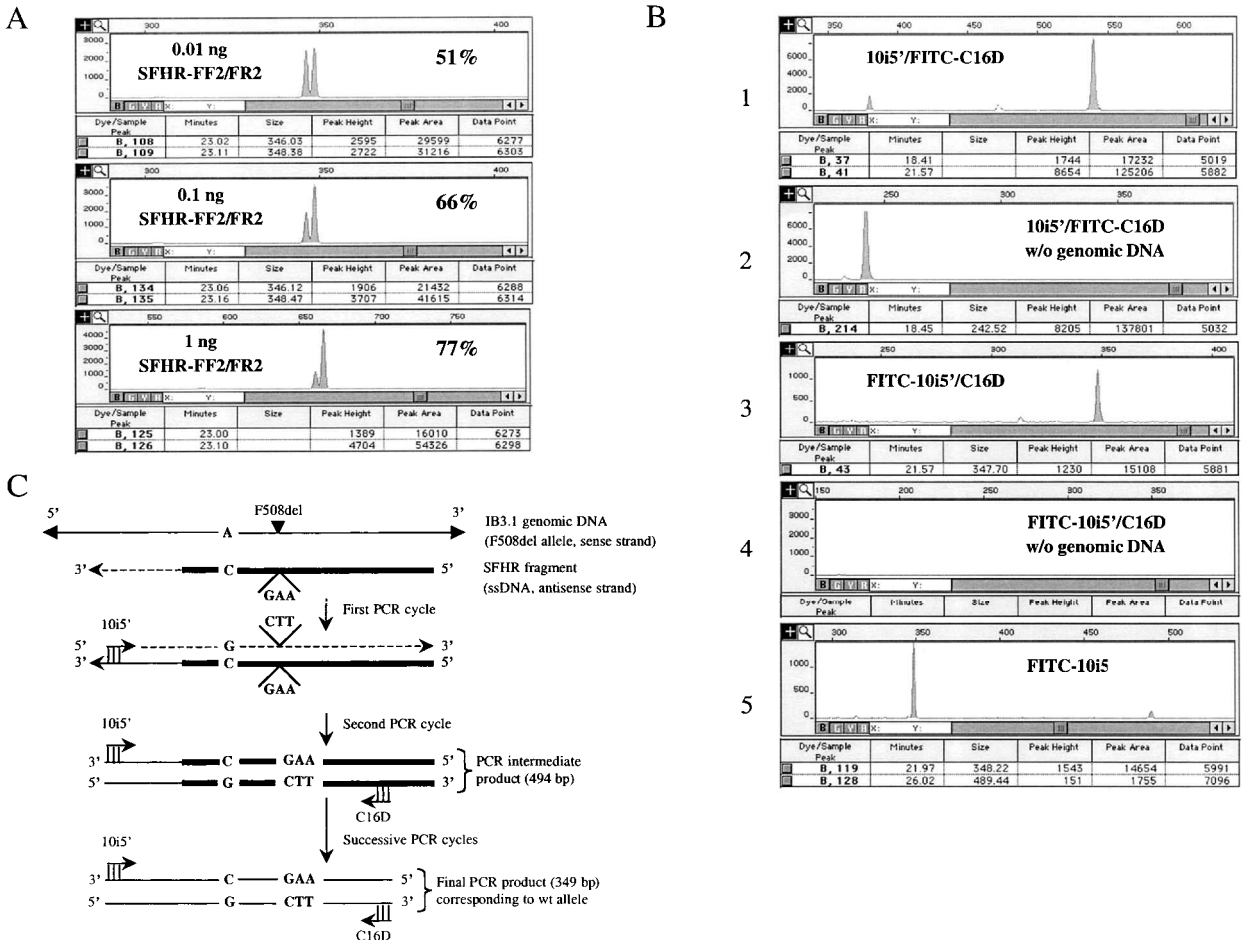


FIG. 3. An unexpected PCR by-product leads to erroneous determination of SFHR-mediated F508del to wild-type *CFTR* conversion frequencies in CF airway epithelial cells. **(A)** Electropherogram display of the F508del and wild-type allele peaks obtained by *in vitro* mixing of genomic DNA from untreated IB3.1 cells ($0.5 \mu\text{g}$) with the indicated amounts of SFHR fragment. The corresponding percentages of wild-type allele obtained are also shown. **(B)** Additional spurious bands can be detected using different fluorescent detection primers. In each case, a solution containing the SFHR fragment, either alone ($1 \mu\text{g}$, in electropherograms 1, 3, and 5) or mixed with $0.5 \mu\text{g}$ genomic DNA from untreated IB3.1 cells (10 ng, in electropherograms 2 and 4) was amplified with the indicated detection primer pair and analyzed by genotyping. Displays 1 and 2 show the presence of a 242-bp band resulting from the lineal amplification of the SFHR fragment with primer FITC-C16D. In contrast, no spurious small-size band could be detected using the fluorescent detection primer FITC-10i5', located outside the SFHR homology region (displays 3 and 4). Nevertheless, when the sample shown in display 3 was again genotyped and visualized over a higher size range using the TAMRA-GeneScan 500 size standard, in addition to the 348-bp peak corresponding to the wild-type allele, a spurious peak of near 490 bp emerged, which corresponds to an unexpected PCR intermediate product originated by mispriming of the corrective SFHR ssDNA fragment. In two of the electropherogram displays shown, automatic omission of peak sizes was the consequence of incorrect size calling by the GeneScan analysis software due to abnormal running of the size standard. The electropherogram displays are representative from one of three similar experiments. **(C)** According to the results shown, our model involves the initial amplification of a minor PCR fragment of 494 bp using the genomic DNA from IB3.1 cells as template and the unexpected primer pair 10i5'/antisense ssDNA SFHR fragment. Successive rounds of amplification of this PCR product, efficiently competing with IB3.1 genomic DNA as templates for primer pair 10i5'/C16D, would generate misleading high frequency of repaired wild-type allele fragment.

excess of SFHR fragment was mixed with genomic DNA from IB3.1 cells. Using the 10i5'/FITC-C16D primer pair, an additional band of 243 bp was clearly visible in the corresponding electropherograms due to a linear amplification of the forward SFHR ssDNA fragment by the FITC-C16D reverse primer, which also arose in those displaying F508del and wild-type *CFTR* allele frequencies from SFHR-treated IB3.1 cells (Fig. 2A). In contrast, a more detailed analysis of the same samples over a higher size range using the FITC-10i5'/C16D primer pair revealed an additional minor band whose size (around 490 bp) matched the presence of an unexpected PCR intermediate originated through amplification of genomic DNA from IB3.1 cells using forward primer 10i5' (located in the 3'-region of intron 9) and the complete anti-sense ssDNA SFHR fragment (388 bp) as the reverse primer (Fig. 3B). Taken together, these results strongly suggested that a PCR-mediated detection artifact involving the corrective small DNA fragment used for repair was responsible for the high F508del to wild-type conversion frequencies detected in the *CFTR* gene from SFHR-treated IB3.1 cells.

Thus, our model suggests that the presence of contaminating ssDNA SFHR fragment in the isolated genomic DNA from SFHR-treated cells serves as an artifactual primer, allowing the generation of a DNA fragment intermediate (494 bp, expanding the SFHR targeting region plus the 3' intron 9 sequence up to primer 10i5'). This intermediate would in turn serve as a competing template for the subsequent reamplification of the wild-type allele discriminating DNA fragment (349 bp) with the original primers 10i5' and C16D (Fig. 3C). Hence, care should be taken when using molecular PCR end points to evaluate gene conversion events using targeted gene repair strategies. Indeed, a similar PCR-generated misleading phenomenon has been reported in gene conversion experiments using chimeric RNA/DNA oligonucleotides (Zhang et al., 1998).

Considering our results, rerevision of our PCR-based detection method using forward primer 10i5' and a re-designed reverse primer located in intron 10 of the *CFTR* gene, outside the SFHR homology region, revealed a substantial drop in the F508del to wild-type conversion frequency up to nondetectable levels on SFHR-treated IB3.1 cells (data not shown). Accordingly, Thorpe et al. (2002a) reported low recombination or mismatch repair efficiencies induced by both short DNA fragments (SFHR) and RNA/DNA oligonucleotides using a functional green fluorescent protein (GFP)-based reporter system. These authors could only estimate overall frequencies of corrected green cells ranging from <0.1% (COS7 cells) to 1.2% (HuH-7 cells). Colosimo et al. (2001) reached up to 4% SFHR-mediated targeted correction efficiencies using a mutated selectable marker gene in epithelial cells. However, targeted repair in all

these studies was performed over transfected episomal plasmids. Therefore, the correction efficiencies using these extrachromosomal systems cannot be equated with genomic correction efficiency, as transiently transfected cells are likely to contain multiple copies of the reporter target. In fact, a very recent study on the efficiency of chimeric RNA/DNA oligonucleotide gene targeting by direct nuclear injection using a similar GFP recovery assay concluded that although these elements may be fairly effective at targeting episomal DNA, targeted correction of integrated copies of the mutant GFP transgene was unsuccessful in primary cells (Tran et al., 2003).

In contrast, other recent studies suggest that the SFHR strategy works not only for CF, both in cell culture (Goncuz et al., 1998) and *in vivo* in mice (Goncuz et al., 2001), but also for a model of Duchenne muscular dystrophy (Kapsa et al., 2001). Kapsa et al. (2001) indicated the highest SFHR-mediated conversion efficiencies reported to date, 15%–20% correction of the C to T *mdx* nonsense transition at the Xp21.1 *dys* locus in cultured myoblasts from *mdx* mice, which are comparable to those initially stated in our present report. Nevertheless, although acknowledgment was made that corrected cells did not express dystrophin transcript or protein, the authors attributed this inconsistency to the potential toxicity of the lipofection reagent. Alternatively, according to our findings, a more likely explanation of their results would also suggest the generation of a misleading artifact in their PCR-RFLP or allele-specific PCR-based methods of detection. Interestingly, the distribution of their designed detection primers (Kapsa et al., 2001) was analogous to ours. Moreover, genetic correction of *mdx* myoblasts was also a transient phenomenon, although it seemed to persist for up to 28 days in culture. Again, this is not inconsistent with our model because recent experiments have indicated that although there is a cell type-specific limitation of nuclear uptake by short DNA SFHR fragments and RNA/DNA oligonucleotides, those that can reach the nucleus have the potential to remain there for a considerable time (Thorpe et al., 2002b).

On the other hand, regarding CF, several studies have shown that SFHR has successfully corrected the 3-bp F508 deletion in the *CFTR* gene (Kunzelmann et al., 1996; Goncuz et al., 1998; Sangiuolo et al., 2002) from CF epithelial cells, with efficiencies ranging from 1% to 10%, which are in contrast with our final, revised results. Strikingly, in most if not all of these reports, the localization of the primers used for analysis of gene conversion frequencies by PCR-based detection methodologies was similar to our initial primer localization, with only one of the PCR detection primers lying outside the SFHR homology region. Nevertheless, in the pioneer SFHR-mediated repair study (Kunzelmann et al., 1996), at least some of the described PCR-based methods of F508del to wild-type *CFTR* conversion analysis were performed with

both primers located outside the homologous region defined by the small DNA fragment. Analysis for the presence of wild-type *CFTR* RNA was performed with primers that amplified across intron/exon boundaries. According to our model, both situations still could lead to misleading PCR artifacts and overestimation of conversion frequencies depending on the amount of the SFHR fragments reaching the nucleus, either intact or partially degraded, that could serve as artifactual primers to generate a PCR artifact, including the transgenic SFHR region and its subsequent reamplification in a situation analogous to ours.

Most of the studies assessed *CFTR* gene repair at the nucleic acid level but not at the protein level, and detection of *CFTR* gene correction was performed shortly after SFHR (at 1–7 days posttransfection). In a recent study, Colosimo et al. (2001) acknowledge that accurate quantification of *CFTR* targeting frequency is difficult. Alternatively, they developed a functional SFHR assay using a mutated zeocin-containing plasmid cotransfected with the corrective small DNA fragments into airway epithelial cells. As previously mentioned, this approach showed significant episomal (4%), but very low chromosomal (~0.004%) DNA correction of the selectable gene, as assessed by drug-resistance analysis (Colosimo et al., 2001). Of note, electroporation was 1000-fold more effective for gene targeting than cationic lipid or dendrimer complexes, in agreement with our results (data not shown).

Consequently, the F508del/wild-type *CFTR* gene conversion frequencies reported using SFHR in the cited studies should be reevaluated considering the high probability of generating false positive results using PCR-based methods of detection.

In summary, in view of the findings described in the present study, all SFHR-based targeted repair frequencies reported to date, especially those focused on nonselectable or nonreporter genes, should bear careful reconsideration. Current PCR-based methodologies for detection of SFHR-based mutation correction at the genomic level should be carefully revised, and those yielding inconsistencies or potential artifacts should be discarded. Whenever possible, independent, nonamplifiable detection methods, such as Northern or Southern blotting, protein analysis, or functional assays, should be performed to correctly assess gene conversion frequencies. Finally, the concept of SFHR as a potentially effective targeted gene correction strategy should be revisited.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank P. Zeitlin (Johns Hopkins University, Baltimore, MD) for kindly supplying the IB3.1 cell line. We are grateful to J.R. González (ICO, L'Hospitalet,

Barcelona) and F.J. Giménez and M.D. Ramos (CGMM-IRO) for their excellent technical assistance and to our colleagues T. Casals and S. Larriba for helpful discussions. This work was supported by grant 98/1610 from “Fundació La Marató de TV3,” by a research grant from “Fundación Sira Carrasco para ayuda a la fibrosis quística” to J.M.A., and by a fellowship from “Associació Catalana de Fibrosi Quística” to D.S. The authors are members of the *Red de Centros del Instituto de Salud Carlos III* (Ref. C03/07).

REFERENCES

- ALBUQUERQUE-SILVA, J., VASSART, G., LAVINHA, J., and ABRAMOWICZ, M.J. (2001). Chimeraplasty validation. *Nat. Biotechnol.* **19**, 1011.
- BEDWELL, D.M., KAENJAK, A., BENOS, D.J., BEBOK, Z., BUBIEN, J.K., HONG, J., TOUSSON, A., CLANCY, J.P., and SORSCHER, E.J. (1997). Suppression of a CFTR premature stop mutation in a bronchial epithelial cell line. *Nat. Med.* **11**, 1280–1284.
- COLOSIMO, A., GONCZ, K.K., NOVELLI, G., DALLAPICCOLA, B., and GRUENERT, D.C. (2001). Targeted correction of a defective selectable marker gene in human epithelial cells by small DNA fragments. *Mol. Ther.* **2**, 178–185.
- DE SEMIR, D., NADAL, M., GONZÁLEZ, J.R., LARRIBA, S., AVINYÓ, A., NUNES, V., CASALS, T., ESTIVILL, X., and ARAN, J.M. (2003). Suitability of oligonucleotide-mediated cystic fibrosis gene repair in airway epithelial cells. *J. Gene Med.* **5**, 625–639.
- DE SEMIR, D., PÉTRIZ, J., AVINYÓ, A., LARRIBA, S., NUNES, V., CASALS, T., ESTIVILL, X., and ARAN, J.M. (2002). Non-viral vector-mediated uptake, distribution, and stability of chimeraplasts in human airway epithelial cells. *J. Gene Med.* **3**, 308–322.
- GONCZ, K.K., COLOSIMO, A., DALLAPICCOLA, B., GAGNE, L., HONG, K., NOVELLI, G., PAPAHD-JOPOULOS, D., SAWA, T., SCHREIER, H., WIENER-KRONISH, J., XU, Z., and GRUENERT, D.C. (2001). Expression of DeltaF508 CFTR in normal mouse lung after site-specific modification of CFTR sequences by SFHR. *Gene Ther.* **12**, 961–965.
- GONCZ, K.K., and GRUENERT, D.C. (1998). Site-directed alteration of DNA by small fragment homologous replacement (SFHR). In: *Gene Targeting Vector Protocols*. E.B. Kmiec, ed. (Humana Press, Totowa, NJ), pp. 85–99.
- GONCZ, K.K., and GRUENERT, D.C. (2001). Progress toward nucleotide sequence modification at the genome level: Small fragment homologous replacement. *Biotechnology* **3**, 113–120.
- GONCZ, K.K., KUNZELMANN, K., XU, Z., and GRUENERT, D.C. (1998). Targeted replacement of normal and mutant CFTR sequences in human airway epithelial cells using DNA fragments. *Hum. Mol. Genet.* **12**, 1913–1919.
- GONCZ, K.K., PROKOPISHYN, N.L., CHOW, B.L., DAVIS, B.R., and GRUENERT, D.C. (2002). Application of SFHR to gene therapy of monogenic disorders. *Gene Ther.* **11**, 691–694.

- GRAHAM, I.R., and DIXON, G. (2002). Gene repair and mutagenesis mediated by chimeric RNA-DNA oligonucleotides: Chimeraplasty for gene therapy and conversion of single nucleotide polymorphisms (SNPs). *Biochim. Biophys. Acta* **1587**, 1–6.
- GRUENERT, D.C. (1998). Gene correction with small DNA fragments. *Curr. Res. Mol. Ther.* **1**, 607–613.
- GRUENERT, D.C. (1999). Opportunities and challenges in targeting genes for therapy. *Gene Ther.* **6**, 1347–1348.
- JOHNSON, L.G., OLSEN, J.C., SARKADI, B., MOORE, K.L., SWANSTROM, R., and BOUCHER, R.C. (1992). Efficiency of gene transfer for restoration of normal airway epithelial function in cystic fibrosis. *Nat. Genet.* **1**, 21–25.
- KAPSA, R., QUIGLEY, A., LYNCH, G.S., STEEPER, K., KORNBORG, A.J., GREGOREVIC, P., AUSTIN, L., and BYRNE, E. (2001). *In vivo* and *in vitro* correction of the mdx dystrophin gene nonsense mutation by short-fragment homologous replacement. *Hum. Gene Ther.* **6**, 629–642.
- KREN, B.T., BANDYOPADHYAY, P., and STEER, C.J. (1998). *In vivo* site-directed mutagenesis of the factor IX gene by chimeric RNA/DNA oligonucleotides. *Nat. Med.* **3**, 285–290.
- KREN, B.T., PARASHAR, B., BANDYOPADHYAY, P., CHOWDHURY, N.R., CHOWDHURY, J.R., and STEER, C.J. (1999). Correction of the UDP-glucuronosyltransferase gene defect in the Gunn rat model of Crigler-Najjar syndrome type I with a chimeric oligonucleotide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 10349–10354.
- KUNZELMANN, K., LEGENDRE, J.Y., KNOELL, D.L., ESCOBAR, L.C., XU, Z., and GRUENERT, D.C. (1996). Gene targeting of CFTR DNA in CF epithelial cells. *Gene Ther.* **10**, 59–67.
- LIU, X., JIANG, Q., MANSFIELD, S.G., PUTTARAJU, M., ZHANG, Y., ZHOU, W., COHN, J.A., GARCIA-BLANCO, M.A., MITVHELL, L.G., and ENGELHARDT, J.F. (2002). Partial correction of endogenous DeltaF508 CFTR in human cystic fibrosis airway epithelia by spliceosome-mediated RNA trans-splicing. *Nat. Biotechnol.* **20**, 47–52.
- RICHARDSON, P., AUGUSTIN, L.B., KREN, B.T., and STEER, C.J. (2002). Gene repair and transposon-mediated gene therapy. *Stem Cells* **20**, 105–118.
- SANGIUOLO, F., BRUSCIA, E., SERAFINO, A., NARDONE, A.M., BONIFAZI, E., LAIS, M., GRUENERT, D.C., and NOVELLI, G. (2002). *In vitro* correction of cystic fibrosis epithelial cell lines by small fragment homologous replacement (SFHR) technique. *BMC Med. Genet.* **3**, 8–19.
- TAUBES, G. (2002). The strange case of chimeraplasty. *Science* **298**, 2216–2120.
- THORPE, P.H., STEVENSON, B.J., and PORTEOUS, D.J. (2002a). Functional correction of episomal mutations with short DNA fragments and RNA-DNA oligonucleotides. *J. Gene Med.* **2**, 195–204.
- THORPE, P.H., STEVENSON, B.J., and PORTEOUS, D.J. (2002b). Optimising gene repair strategies in cell culture. *Gene Ther.* **9**, 700–702.
- TRAN, N.D., LIU, X., YAN, Z., ABBOTE, D., JIANG, Q., KMIEC, E.B., SIGMUND, C.D., and ENGELHARDT, J.F. (2003). Efficiency of chimeraplast gene targeting by direct nuclear injection using a GFP recovery assay. *Mol. Ther.* **2**, 248–253.
- VAN DER STEEGE, G., SCHUILENGA-HUT, P.H., BUYS, C.H., SCHEFFER, H., PAS, H.H., and JONKMAN, M.F. (2001). Persistent failures in gene repair. *Nat. Biotechnol.* **19**, 305–306.
- WELSH, M.J., RAMSEY, B.W., ACCURSO, F., and CUTTING, G.R. (2001). Cystic fibrosis. In: *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, C.R. Scriver, A.L. Beaudet, D. Valle, and W.S. Sly, eds. (McGraw-Hill, New York), pp. 5121–5188.
- WOOLF, T.M. (1998). Therapeutic repair of mutated nucleic acid sequences. *Nat. Biotechnol.* **16**, 341–344.
- YAÑEZ, R.J., and PORTER, A.C. (1998). Therapeutic gene targeting. *Gene Ther.* **5**, 149–159.
- YE, S., COLE-STRAUSS, A., FRANK, B., and KMIEC, E.B. (1998). Targeted gene correction: A new strategy for molecular medicine. *Mol. Med. Today* **4**, 431–437.
- ZEITLIN, P.L., LU, L., RHIM, J., CUTTING, G., STETTEN, G., KIEFFER, K.A., CRAIG, R., and GUGGINO, W.B. (1991). A cystic fibrosis bronchial epithelial cell line: Immortalization by adeno-12-SV40 infection. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **4**, 313–319.
- ZHANG, Z., ERIKSSON, M., FALK, G., GRAFF, C., PRESNELL, S.C., READ, M.S., NICHOLS, T.C., BLOMBÄCK, M., and ANVRET, M. (1998). Failure to achieve gene conversion with chimeric circular oligonucleotides: Potentially misleading PCR artifacts observed. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* **8**, 531–536.

Address reprint requests to:

Dr. J.M. Aran
 Centre de Genètica Mèdica i Molecular
 Institut de Recerca Oncològica (IRO)
 Hospital Duran i Reynals
 Gran Via sn km 2,7
 08907 L'Hospitalet de Llobregat
 Barcelona
 Spain

E-mail: jaran@iro.es

Received April 28, 2003; accepted in revised form
 June 30, 2003.

Letter to the Editors

Dear Editors:

WE HAVE READ, WITH INTEREST, the article by De Semir and Aran recently published in *Oligonucleotides* (De Semir and Aran, 2003). Because of the nature and tone of the manuscript, and because of the potential importance of all oligonucleotide-based gene targeting approaches, we felt that it is important to address the issues raised by the authors.

While we found their study to be informative about some of the potential pitfalls associated with PCR analysis, we feel that our previous studies have been misrepresented. We have been well aware of the potential for generating artifacts using PCR, and have thus sought to design our studies to minimize, if not avoid, artifacts. This has been accomplished by having both of our analytical primers outside of the region of homology defined by the small DNA fragment (SDF) used for eliciting the modification of genomic DNA sequences (Bruscia et al., 2002; Goncz et al., 1998; Kapsa et al., 2001; Kunzelmann et al., 1996; Sangiuolo et al., 2002), analyzing DNase treated mRNA (Goncz et al., 1998; Kunzelmann et al., 1996; Goncz et al., 2001), and carrying out functional analyses (Kunzelmann et al., 1996; Colosimo et al., 2001; Thorpe et al., 2002). In addition, control DNA mixing experiments indicated that the equivalent of $\leq 10^6$ fragments per cell would not yield a PCR artifact under the PCR conditions used for analysis (Goncz et al., 1998; Kunzelmann et al., 1996; Goncz et al., 2001).

It is clear those PCR analyses of genomic DNA, where even one primer is within the homologous region of DNA (as is the case with the study carried out by the authors), can yield an artifact. It comes as no great surprise that the authors detected artifactual amplification when their reverse primers (FR2 and C16D) are either the same as the one used to generate the 388-bp SDF or are well within the SDF. Both reverse primers are complementary to one of the denatured strands of DNA and will thus seek out this strand in the annealing stage of the PCR amplification cycle. Given the 5000- to 10,000-fold excess of primers when compared to the number of fragments as well as the $\sim 10^4$ – 10^6 -fold excess of fragment compared to genomic DNA targets, the degree of fragment amplification should greatly supercede amplification of the genomic target DNA—thus the artifact.

The potential for generating an artifact is enhanced by

the annealing temperature that the authors chose for their analytical PCR, since the 5' primer (10i5') was optimized for a 59°C annealing step to generate the 493-bp plasmid insert. However, the annealing temperature of the analytical PCR is 65°C and would favor annealing and elongation of the C16D primer. Thus elongation by the C16D initiated primer would generate more amplification product from both the genomic and the correcting fragment templates and further “swamp” the PCR reaction with additional 243-base fragment. This 243-bp fragment would eventually be present in large excess of the C16D primer due to linear PCR amplification consuming the C16D primer.

The potential for artifact in this study is further augmented by the presence of the template plasmid. It appears that the plasmid is present at low levels, although the actual copy number is difficult to determine since the authors only indicate that they have used 5 μ l of a 1:20000 dilution of the pGEM-SFHR plasmid for the generation of the 388-bp transfection fragment. The presence of this plasmid, however small, in the transfection fragment mix would further contribute to the potential for the generation of an artifact during the analytical stage of the study. This would especially be a factor in the DNA mixing studies, since the primers used all lie within the 493-bp template inserted within the pGEM-SFHR plasmid.

We appreciate and share the author's concern for the generation of artifacts when analyzing DNA by PCR. However, we think that it is important to design the experiments in such a way as to minimize rather than maximize the potential for artifacts. Furthermore, we have never felt that it is adequate to present only the PCR analysis of DNA as the ultimate proof of SFHR-mediated modification. Rather, we believe that it is essential to provide analysis of mRNA and/or functional analysis to substantiate modification. In previous reports we have demonstrated that SFHR-mediated modification of the DNA is accompanied either by a sequence-specific modification in CFTR mRNA (Goncz et al., 1998; Kapsa et al., 2001; Kunzelmann et al., 1996; Goncz et al., 2001) and/or a correction of protein function (either CFTR or zeocin resistance) (Kunzelmann et al., 1996; Colosimo et al., 2001). While we have not measured the frequency in all of our studies, one study detected an efficiency of SFHR-mediated modification between 1%–10% by inde-

pendent densitometric and functional measurements (Kunzelmann et al., 1996). We therefore felt assured that the phenomenon we observed was, in fact, occurring.

It is important to remember that this area of sequence-specific modification is still in its infancy and that there are still numerous studies that need to be performed to dissect out the mechanisms that underlie SFHR and other oligonucleotide-based gene modification strategies. While there appear to be increasingly more laboratories that are devoting effort to enhancing our understanding of these systems, it is imperative that the efforts by individual laboratories do not undermine the potential for a timely and accurate assessment of these gene targeting strategies. A coordinated effort in which there is open communication, as well as standardized and shared protocols, might be one answer to avoid the kind of results that the authors are reporting.

We hope that this letter addresses the concerns raised by the authors and clarifies previous work that has been published.

REFERENCES

- BRUSCIA, E., SANGIUOLO, F., SINIBALDI, P., GONCZ, K.K., NOVELLI, G., and GRUENERT, D.C. (2002). Isolation of CF cell lines corrected at DeltaF508-CFTR locus by SFHR-mediated targeting. *Gene Ther.* **9**(11), 683–685.
- COLOSIMO, A., GONCZ, K.K., NOVELLI, G., DALLAPICCOLA, B., and GRUENERT, D.C. (2001). Targeted correction of a defective selectable marker gene in human epithelial cells by small DNA fragments. *Mol. Ther.* **3**(2), 178–185.
- DE SEMIR, D., and ARAN, J.M. (2003). Misleading gene conversion frequencies due to a PCR artifact using small fragment homologous replacement. *Oligonucleotides* **13**, 261–269.
- GONCZ, K.K., KUNZELMANN, K., XU, Z., and GRUENERT, D.C. (1998). Targeted replacement of normal and mutant CFTR sequences in human airway epithelial cells using DNA fragments. *Hum. Mol. Genet.* **7**(12), 1913–1919.

- GONCZ, K.K., COLOSIMO, A., DALLAPICCOLA, B., GAGNE, L. HONG, K., NOVELLI, G., PAPAHDJOPOULOS, D., SAWA, T., SCHREIER, H., WIENER-KRONISH, J., XU, Z., and GRUENERT, D.C. (2001). Expression of DeltaF508 CFTR in normal mouse lung after site-specific modification of CFTR sequences by SFHR. *Gene Ther.* **8**(12), 961–965.
- KAPSA, R., QUIGLEY, A., LYNCH, G.S., STEEPER, K., KORNBERG, A.J., GREGOREVIC, P., AUSTIN, L., and BYRNE, E. (2001). In vivo and in vitro correction of the mdx dystrophin gene nonsense mutation by short-fragment homologous replacement. *Hum. Gene Ther.* **12**(6), 629–642.
- KUNZELMANN, K., LEGENDRE, J.Y., KNOELL, D.L., ESCOBAR, L.C., XU, Z., and GRUENERT, D.C. (1996). Gene targeting of CFTR DNA in CF epithelial cells. *Gene Ther.* **3**(10), 859–867.
- SANGIUOLO, F., BRUSCIA, E., SERAFINO, A., NARDONE, A., BONIFAZI, E., LAIS, M., GRUENERT, D.C., and NOVELLI, G. (2002). In vitro correction of cystic fibrosis epithelial cell lines by small fragment homologous replacement (SFHR) technique. *BMC Med. Genet.* **3**(1), 8.
- THORPE, P., STEVENSON, B.J., and PORTEOUOS, D.J. (2002). Optimising gene repair strategies in cell culture. *Gene Ther.* **9**, 700–732.

Sincerely,

Dieter C. Gruenert, Ph.D.
Karl Kunzelmann, M.D.
Giuseppe Novelli, Ph.D.
Alessia Colosimo, Ph.D.
Robert Kapsa, Ph.D.
Emanuela Bruscia, Ph.D.

*California Pacific Medical Center Research Institute
Room 106, Stern Building
2330 Clay Street
San Francisco, CA 94115*

E-mail: dieter@cooper.cpmc.org

Response

Dear Editors:

WE SHARE THE SAME ENTHUSIASM as Gruenert and colleagues in their Letter to the Editors about SFHR and other oligonucleotide-based targeted gene repair methodologies, and are convinced that SFHR is indeed occurring. But for this methodology to become therapeutically useful, a necessary condition is to achieve a level of repair sufficient to reverse disease-associated phenotypes. Thus, correct assessment of gene repair frequencies is a key issue to validate potential therapeutic

applications of targeted gene repair methodologies such as chimeraplasty and SFHR. Our recently published article in *Oligonucleotides* (De Semir and Aran, 2003) intends to gather our experience in this aspect. We wanted to send a note of caution about using PCR-based signal amplification methodologies to assess gene targeting frequencies by SFHR, analogously to that recently published using another controversial gene repair methodology: chimeraplasty (Zhang et al., 1998). We display an extensive discussion of these topics in the Results and Discussion sections of our article.

Regarding the concerns raised by Gruenert and colleagues to our article:

First, we believe that it is not so obvious that in SFHR studies (using genomic DNA from treated cells and PCR for repair analysis), having one analytical primer outside and the other analytical primer inside the homology region defined by the small DNA fragment (SDF) would generate a PCR artifact causing assessment of misleading gene conversion frequencies, unless taking into account our proposed mechanistic model of PCR artifact generation based in our experimental results (De Semir and Aran, 2003; see Fig. 3C). In fact, in contrast to that reported in their Letter to the Editor, Gruenert and colleagues stated in their pioneering SFHR study addressed to also correct the F508del CFTR mutation in CF epithelial cells: "To ensure that the genomic locus containing the homologous region was specifically amplified, at least one PCR primer was outside the region of homology" (Kunzelmann et al., 1996). As an example, in another recent study by the same authors directed to introduce the F508del mutation in normal mouse lung by SFHR (Goncz et al., 2001), the analytical PCR to evaluate SFHR-mediated conversion by allele-specific PCR used mCF4 (sense) and mCF3-N/mCF3-ΔF (antisense) primers. These antisense primers are both within their SDF homology region, analogously to our primer design, and could conceivably lead to a PCR artifact through the same mechanism that we propose in our study, and thus to a misleading estimation of SFHR-mediated conversion. Furthermore, our primer design for SDF generation and SFHR-mediated conversion analysis was also analogous to that employed by Kapsa et al. (2001) for SFHR-mediated correction of a dystrophin gene mutation, where they reported a 15%–20% repair frequency in cultured myoblasts. This repair frequency is similar to that initially found in our study. Moreover, the same authors conceded that the corrected myoblasts did not express dystrophin transcript.

Conversely, Gruenert and colleagues have reported a 1%–10% efficiency of SFHR-mediated correction of the F508del CFTR gene mutation in CF epithelial cells (Kunzelmann et al., 1996). However, in a more recent study they concede that the nonselectable CFTR gene function is difficult to quantify and alternatively show that the frequency of SFHR-mediated targeted conversion of a mutated zeocin gene in CF epithelial cells did not exceed 4% in episomal form and 0.004% in chromosomal form (Colosimo et al., 2001). In contrast, as stated in our article, a further revision of our analytical PCR-based wild type CFTR detection method using now the primer pair 10i5' (intron 9)/CF6 (intron 10), both outside our SDF homology region (this reverse CF6 primer is the same as used previously by Gruenert and colleagues) did not detect any SFHR-mediated repair of the CFTR F508del mutation in our IB3.1 cell model. We had al-

ready extensively characterized this CF epithelial cell line in previous nucleic acid transfer studies (De Semir et al., 2002; 2003) and thus are assured that our inability to replicate Gruenert's results is not due to inefficient SDF transfection.

Another of the criticisms raised by Gruenert and colleagues to our study refers to the annealing temperatures used for our analytical PCR and for SDF formation, and emphasizing the generation of a 243-bp artifact due to linear PCR amplification. As clearly stated in our article, the annealing temperature chosen for the analytical PCR using the primer pair 10i5'/C16D (349 bp) was 59°C. The PCR to generate the plasmid insert for a further SDF generation was carried out with primer pair 10i5'/10i3' (493 bp) at 56°C annealing temperature. Finally, the generation of the SDF was performed with primer pair FF2/FR2 (388 bp) at an annealing temperature of 65°C (De Semir and Aran, 2003). With our primer design in mind, we already were aware of the generation of a PCR artifact resulting from the linear amplification of a 243 bp fragment from primer C16D having as template the SDF. This "contaminating" fragment has been shown repeatedly in our electropherograms when labeled by using FITC-C16D. However, this 243 bp PCR artifact was not responsible for the assessment of misleading CFTR gene conversion frequencies under our experimental conditions.

Finally, the last concern by Gruenert and colleagues refers to the potential generation of a PCR artifact by the presence of a small amount of pGEM-SFHR plasmid employed to generate the SDF utilized in our study. This concern is also applicable to most of Gruenert's studies, which used a CFTR genomic DNA fragment cloned into a plasmid to generate their corrective SDF. On our behalf, we have performed control studies in our analytical PCR by omitting the genomic DNA and amplifying only the transfection fragment mix (excess of purified SDF generated by PCR using pGEM-SFHR as template) and did not find any evidence of a contaminating PCR fragment other than the above mentioned 243 bp fragment resulting from the linear amplification of part of the SDF from primer C16D (De Semir and Aran, 2003; see Fig. 3B, electropherograms 2 and 4). Furthermore, we have used SDF generated by direct amplification from genomic DNA (without using the pGEM-SFHR) with identical results than those shown in our paper.

We completely agree with Gruenert and colleagues on the importance of a proper and careful design of analytical methods (especially those relying on PCR) to minimize the potential for artifacts and to correctly assess the real frequency in which SFHR is occurring in different cellular or animal models. Indeed, deciphering the mechanisms by which synthetic DNA molecules activate and direct the cell's inherent DNA repair systems to correct inborn errors might lead to a productive gene therapy approach. In the meantime, questions such as experimental

variability and reproducibility, and clonal inheritance of permanently corrected cells have to be solved by the united efforts of the different laboratories working on SFHR and other oligonucleotide-directed gene repair methodologies. Perhaps this could be achieved in an open forum to discuss gene repair applications, and by sharing not only protocols but also materials (reagents, cell lines, etc.). Undoubtedly, the skepticism regarding consistency of SFHR and other related gene repair approaches will be reduced as much as the number of successful reports by independent laboratories using these methodologies increases.

REFERENCES

- COLOSIMO, A., GONCZ, K.K., NOVELLI, G., DALLAPICCOLA, B., and GRUENERT, D.C. (2001). Targeted correction of a defective selectable marker gene in human epithelial cells by small DNA fragments. *Mol. Ther.* **2**, 178–185.
- DE SEMIR, D., and ARAN, J.M. (2003). Misleading gene conversion frequencies due to a PCR artifact using small fragment homologous replacement. *Oligonucleotides* **13**, 261–269.
- DE SEMIR, D., NADAL, M., GONZÁLEZ, J.R., LARRIBA, S., AVINYÓ, A., NUNES, V., CASALS, T., ESTIVILL, X., and ARAN, J.M. (2003). Suitability of oligonucleotide-mediated cystic fibrosis gene repair in airway epithelial cells. *J. Gene Med.* **5**, 625–639.
- DE SEMIR, D., PÉTRIZ, J., AVINYÓ, A., LARRIBA, S., NUNES, V., CASALS, T., ESTIVILL, X., and ARAN, J.M. (2002). Non-viral vector-mediated uptake, distribution, and stability of chimeraplasts in human airway epithelial cells. *J. Gene Med.* **3**, 308–322.
- GONCZ, K.K., COLOSIMO, A., DALLAPICCOLA, B., GAGNE, L., HONG, K., NOVELLI, G., PAPAHD-JOPOULOS, D., SAWA, T., SCHREIER, H., WIENER-KRONISH, J., XU, Z., and GRUENERT, D.C. (2001). Expression of DeltaF508 CFTR in normal mouse lung after site-specific modification of CFTR sequences by SFHR. *Gene Ther.* **12**, 961–965.
- KAPSA, R., QUIGLEY, A., LYNCH, G.S., STEEPER, K., KORNBERG, A.J., GREGOREVIC, P., AUSTIN, L., and BYRNE, E. (2001). In vivo and in vitro correction of the mdx dystrophin gene nonsense mutation by short-fragment homologous replacement. *Hum. Gene Ther.* **6**, 629–642.
- KUNZELMANN, K., LEGENDRE, J.Y., KNOELL, D.L., ESCOBAR, L.C., XU, Z., and GRUENERT, D.C. (1996). Gene targeting of CFTR DNA in CF epithelial cells. *Gene Ther.* **10**, 59–67.
- ZHANG, Z., ERIKSSON, M., FALK, G., GRAFF, C., PRESNELL, S.C., READ, M.S., NICHOLS, T.C., BLOMBÄCK, M., and ANVRET, M. (1998). Failure to achieve gene conversion with chimeric circular oligonucleotides: potentially misleading PCR artifacts observed. *Antisense Nucl. Acid Drug Dev.* **8**, 531–536.

Sincerely,

Josep M. Aran, Ph.D.
David De Semir, B.S.

*Institut de Recerca Oncològica
Hospital Duran i Reynals
Gran Via, Km. 2.7
L'Hospitalet de Llobregat
08907 Barcelona, Spain*

E-mail: jaren@iro.es

DISCUSSION

DISCUSION

En este apartado se analizan las ventajas que tiene la estrategia de corrección génica respecto a la terapia génica clásica de adición o reemplazo y las posibles modificaciones en la transfección (tanto lo que respecta a vectores como a condiciones de cultivo celular), de quimeroplastos, oligonucleótidos monocadena y fragmentos SFHR. Además, se comparan los ensayos disponibles para cuantificar la reparación génica y las técnicas de direccionamiento genético utilizadas en nuestros experimentos. También se hace hincapié en la controversia que ha generado la quimeroplastia en lo concerniente a su reproducibilidad y la falta de éxito en experimentos con quimeroplastos y oligonucleótidos monocadena. Se ha intentado razonar la variabilidad de frecuencias de corrección génica que se han obtenido en distintos estudios de quimeroplastia, con oligonucleótidos y/o fragmentos SFHR. Finalmente, se reflexiona sobre la importancia del sistema de reparación MMR, del ciclo celular y del papel de la familia de proteínas RAD en los procesos de corrección génica.

15. VENTAJAS DE LA CORRECCION GENICA VERSUS LA TERAPIA GENICA DE REEMPLAZO

A pesar de ser la técnica más ampliamente utilizada en terapia génica, el reemplazo o adición de genes salvajes presenta dos desventajas relevantes:

Una vez ha entrado el gen en el núcleo de la célula diana, éste se puede incorporar al genoma huésped o mantenerse como episoma. La integración del DNA exógeno es un proceso al azar y puede ocurrir en distintos lugares del cromosoma. La localización de esta inserción puede influenciar la expresión génica conllevando a la producción de diferentes cantidades del producto génico. Además, existe cierto riesgo de que la integración del transgén provoque la disrupción y activación de genes involucrados en el ciclo celular o supresión de tumores, proceso conocido como mutagénesis insercional. Este fenómeno ha sido descrito en dos niños que fueron tratados de SCID (inmunodeficiencia severa combinada) mediante un retrovirus conteniendo el gen de la subunidad γ C del receptor de interleuquina 2. Tres años después del tratamiento genético, 2 de los 14 niños tratados desarrollaron una leucemia debida a la proliferación de células T. La integración del retrovirus en la proximidad del promotor del proto-oncogén *LMO2* provocó su transcripción y expresión incontroladas (S Hacein-Bey-Abina, 2003). Los genes que se mantienen en forma episomal son inestables por lo que su expresión requiere repetidas administraciones y la utilización de vectores virales tiene implicaciones inmunológicas muchas veces insalvables como la imposibilidad de readministración del virus terapéutico. No todos los virus son

aplicables dado que algunos, como los retrovirus, únicamente pueden transducir células que están en división.

La segunda desventaja de la terapia génica de reemplazo radica en el considerable tamaño de los genes completos incluyendo secuencias codificantes, reguladoras e intrones. Las técnicas de transferencia génica viral tienen un límite en cuanto a la cantidad de DNA que pueden empaquetar o incorporar por lo que en general se transfieren únicamente las secuencias codificantes. Esto supone que las regiones reguladoras del gen transferido están ausentes resultando en un patrón de expresión anormal comparado con el gen original. En el caso de la fibrosis quística, la sobreexpresión del cDNA salvaje del gen *CFTR* de forma constitutiva y no regulada, puede llegar a ser tóxica para la célula. Mucha actividad del canal CFTR puede generar cambios morfológicos en las células, como un incremento de su volumen (SC Schiavi, 1996). La proliferación se puede ver afectada. De hecho, se ha constatado que células renales de primate que sobreexpresaron CFTR se detuvieron en la fase G2/M del ciclo celular (SC Schiavi, 1996).

La corrección génica dirigida presenta ciertas ventajas respecto a la terapia de reemplazo. La reparación *in situ* permite que el gen quede controlado por sus elementos reguladores propios como su promotor, en su locus nativo. La reparación génica tiene potencial aplicación tanto en enfermedades recesivas como dominantes mientras que la terapia de adición está generalmente restringida a enfermedades recesivas. Además, mediante la reparación génica se puede tratar cualquier tipo de gen sin restricciones en cuanto a su tamaño. El proceso de reparación suele involucrar a pequeñas moléculas sintéticas que son típicamente menos inmunogénicas. De hecho, los motivos CpG inmunoestimuladores que contribuyen a la respuesta inmunológica son típicos de vectores virales y/o plásmidos de expresión (AM Krieg, 2001), (AM Krieg, 2002). El pequeño tamaño de las moléculas reparadoras incrementa su incorporación a la célula y su translocación al núcleo comparado con plásmidos más grandes. Además, de este modo se evita la generación de partículas infectivas que se pueden producir durante la manipulación de los virus. Finalmente, la corrección génica permanente y por tanto heredable se puede conseguir incluso con un sólo tratamiento si se alcanzan las células progenitoras.

16. ELECCION DEL MODELO CELULAR Y MODIFICACIONES EN VECTORES DE TRANSFECCION, OLIGONUCLEOTIDOS CORRECTORES Y SFHR

En nuestras investigaciones hemos estudiado la posibilidad de reparar las mutaciones F508del y W1282X en la línea celular IB3.1 mediante técnicas de corrección génica. No existen muchos modelos celulares de fibrosis quística que crezcan fácilmente en el laboratorio, que sean fisiológicamente relevantes y que estén bien caracterizados

genéticamente. Además, la mayoría de células se han obtenido de pacientes homocigotos F508del. Esta mutación no es la más adecuada para experimentos de corrección génica mediada por oligonucleótidos al tratarse de una delección de 3 nucleótidos. Las células IB3.1 no son las más apropiadas al ser heterocigotas (F508del y transversión G a A que determina la mutación W1282X), por lo tanto se disminuyen las posibilidades de obtener un porcentaje de corrección elevado al disponer únicamente de un alelo (F508del o W1282X) para su reparación a diferencia de un modelo homocigoto con la mutación puntual. De todas maneras, la presencia de la mutación W1282X hace que estas células sean un buen modelo para ensayar la quimeroplastia y oligonucleótidos monocadena. Además, se ha demostrado que la administración de antibióticos aminoglicósidos a estas células ha producido la restauración de corrientes de cloruros activadas por cAMP, la localización de la proteína CFTR en la membrana apical y un incremento de los niveles de mRNA *CFTR* (DM Bedwell, 1997). Entonces, la corrección de la mutación W1282X conllevaría a una idéntica y permanente reversión del fenotipo FQ en estas células.

La transfección de quimeroplastos y oligonucleótidos en general presenta ciertos obstáculos por lo que es necesaria la optimización de un vector adecuado para transferir dichas moléculas a las células que se quieren tratar. En primer lugar, los vectores de transfección deben carecer de inmunogenicidad y citotoxicidad. Únicamente aquellos vectores que no presenten toxicidad podrán ser utilizados en protocolos clínicos. En segundo lugar, es indispensable la especificidad de tejido. Muchos genes sólo se expresan en tejidos u órganos específicos por lo que el direccionamiento génico de los quimeroplastos, de oligonucleótidos monocadena y de fragmentos SFHR debe tener en cuenta su fisiología. En tercer lugar, los sistemas de transferencia génica tienen que ser capaces de atravesar la membrana plasmática, escapar de los endosomas, atravesar el citoplasma y entrar en el núcleo fácilmente. La eficiencia de incorporación y localización nuclear de quimeroplastos, oligonucleótidos monocadena y fragmentos SFHR son factores clave para obtener una corrección génica óptima. En este sentido, hemos optimizado la incorporación de un quimeroplasto marcado con fluoresceína complejo con PEI, Citofectina o GenePorter mediante citometría de flujo. Para ello, establecimos las mejores relaciones de vector y quimeroplasto y las eficiencias de internalización fueron cercanas al 100% en el caso de PEI y GenePorter y alrededor del 80% para Citofectina. Sin embargo, la microscopía confocal reveló que los lipoplejos de GenePorter quedaban retenidos en el citoplasma mientras que los complejos de PEI y Citofectina se localizaban en el núcleo. Esta observación nos permitió descartar el vector GenePorter para experimentos de corrección inducida por quimeroplastos (D de Semir, 2002b).

Otros autores han modificado vectores no virales par direccionarlos a diferentes tipos celulares. BT. Kren y colaboradores han lactosilado la PEI para incrementar la transfección

de hepatocitos en un modelo animal (BT Kren, 1998). Así, mejoraron la transfección de los hepatocitos a través del receptor de asialoglicoproteína presente únicamente en este tipo celular.

C. Welz y colaboradores compararon sistemas de transfección para vehicular quimeroplastos fluorescentes de 68 nucleótidos y hacer un seguimiento intracelular del mismo. Los autores concluyeron que complejar un quimeroplasto con sulfato de protamina y su posterior transfección con el liposoma AVE3 mejoraba la incorporación nuclear del quimeroplasto (C Welz, 2000).

Una alternativa a los vectores clásicos de transfección es la utilización de nuevos sistemas de transferencia génica como el quitosano y las nanopartículas (L Liang, 2002). El quitosano es un aminopolisacárido catiónico natural y aparece como un sustituto de la PEI. Hasta el momento, los mejores vectores para transfectar quimeroplastos son la PEI y los liposomas, ambos modificados con azúcares (como la lactosa). El quitosano presenta baja toxicidad y es biocompatible. Se ha demostrado que el quitosano fue igual de eficiente que la PEI en la transfección de un plásmido con el gen *LacZ* en células HEK293 y en el pulmón de ratones tras una administración intratraqueal (M Koping-Hoggard, 2001).

Las nanopartículas se pueden clasificar en 3 grupos: encapsuladoras, complejadoras o conjugadoras. Las nanopartículas encapsuladoras son nanoesponjas de alginato con capacidad para empaquetar el oligonucleótido en su núcleo acuoso. Las nanopartículas complejadoras están recubiertas de polímeros catiónicos y se asocian al oligonucleótido mediante cargas electrostáticas. Por último, en las nanopartículas conjugadoras los oligonucleótidos se pueden unir a las mismas mediante enlaces covalentes. Las nanopartículas encapsuladoras parecen ser las más indicadas al conferir mayor protección al oligonucleótido. En un estudio donde se comparaban dos tipos de nanopartículas encapsuladoras, se observó que las nanopartículas de alginato acumularon 10 veces más oligonucleótido en el pulmón que las nanopartículas de cianoacrilato tras una administración intravenosa (I Aynie, 1999).

Una manera de incrementar la incorporación nuclear de oligonucleótidos y de DNA en general es mediante la unión de señales de localización nuclear (NLS) en forma de péptidos (para una revisión consultar (R Cartier y R Reszka, 2002)).

Se está investigando la producción de nuevos vectores como los virasomas para tipos celulares específicos. Estas partículas combinan proteínas virales (para mejorar la entrada celular, escapar del endosoma, y alcanzar el núcleo) junto con liposomas como vehículo de transferencia (Y Kaneda, 2003). Los virasomas pueden ser más efectivos como agentes de transfección y menos inmunogénicos que los vectores virales.

En los estudios en ratones descritos con anterioridad, la aplicación de pulsos eléctricos (electrotransferencia) ha demostrado su potencial para aumentar la incorporación de

quimeroplastos, de oligonucleótidos monocadena y de fragmentos SFHR administrados por vía intramuscular y en consecuencia incrementado quizás la frecuencia de corrección génica. De hecho, ya se ha demostrado que la electrotransferencia en el músculo de ratón *mdx* ha sido eficiente en la transferencia génica de oligonucleótidos antisentido para inducir la pérdida de un exón del gen de la distrofina y producir proteína más corta aunque funcional (KE Wells, 2003).

Se ha reportado que los quimeroplastos y los oligonucleótidos monocadena pueden corregir mutaciones puntuales en mitocondrias aisladas de hepatocitos de rata, indicando que las mitocondrias tienen la actividad necesaria para la reparación de cambios de un nucleótido (Z Chen, 2001), (BT Kren, 2002), (BT Kren, 2003), lo que permite pensar en el tratamiento de enfermedades en las que intervienen genes mitocondriales. Se han desarrollado metodologías para introducir oligonucleótidos específicamente en las mitocondrias. Así, vesículas mitocondriótropicas han sido capaces de transferir ácidos nucleicos a la mitocondria (GG D'Souza, 2003) , (V Weissig y VP Torchilin, 2000) y (V Weissig y VP Torchilin, 2001). Otra estrategia es la de incorporar péptidos de señalización mitocondrial a los oligonucleótidos, semejantes a los péptidos de señalización nuclear (P Seibel, 1995).

En lo concerniente a la modificación de la estructura de los oligonucleótidos correctores, HB. Gamper y colaboradores han realizado mejoras estructurales en los quimeroplastos para establecer la óptima relación estructura-actividad de los mismos (HB Gamper, Jr., 2000). Para ello, utilizaron el plásmido pK^sm4021 (contiene el gen de resistencia a ampicilina y el gen de resistencia a kanamicina inactivado por una mutación puntual) y extractos proteicos de células HUH-7. Una de sus conclusiones fue que la cadena de DNA del quimeroplasto es la que media la corrección génica, siempre y cuando cree un "mismatch" con la secuencia diana, y no la cadena quimérica como se pensó en el diseño original de los quimeroplastos. Además, si una de las cadenas del quimeroplasto está compuesta enteramente por RNA 2'-O-metil modificado, la eficiencia de corrección se incrementa en 40%. Esta eficiencia fue también superior en los casos en los que el "mismatch" se produjo únicamente entre la cadena de DNA y el gen diana. Si la cadena quimérica es sustituida por una compuesta únicamente por DNA, la habilidad del oligonucleótido para inducir corrección se reduce a la mitad comparado con el diseño clásico de quimeroplasto.

Se pensó originalmente que las dos cadenas del quimeroplasto de primera generación (primer diseño) podían mediar la corrección génica pero posteriores análisis de estructura-actividad revelaron que éste no es el caso. De hecho, si únicamente la cadena quimérica es la que genera el "mismatch" con el gen diana, la frecuencia de conversión se reduce en 95% en comparación con un quimeroplasto que cree "mismatch" en las dos cadenas.

Las optimizaciones en la estructura de los quimeroplastos de HB. Gamper y colaboradores nos hicieron replantear nuestro diseño de quimeroplasto para corregir la mutación W1282X

presente en las células IB3.1(F508del/W1282X). Así, diseñamos el quimeraplasto CS0-3 de 80nt con una cadena totalmente compuesta por DNA con el nucleótido mutador y la cadena complementaria compuesta únicamente por RNA 2'-O-metil modificado. A pesar de esta estructura optimizada no pudimos obtener un porcentaje de alelo salvaje superior al de células IB3.1 control no transfectadas (D de Semir, 2003).

En otro estudio, HB. Gamper y colaboradores analizaron el papel de cada una de las dos cadenas del quimeraplasto por separado para elucidar su función en la corrección de mutaciones puntuales (HB Gamper, 2000). Utilizaron el plásmido pK^sm4021 y extractos proteicos de células HUH-7, fibroblastos embrionarios de ratón MEF^{+/+} (expresan MSH2) y MEF^{-/-} (deficientes en MSH2 o en MSH3) y células de cáncer endometrial HEC-1-A (deficientes en MSH6) para evaluar la efectividad de oligonucleótidos de 25nt de RNA, de DNA, o con los dos tipos de nucleótidos. La primera conclusión fue que los oligonucleótidos de DNA repararon más eficientemente la mutación puntual en el gen de resistencia a kanamicina que los oligonucleótidos de RNA. Los autores modificaron los enlaces de los oligonucleótidos de DNA para evaluar su sensibilidad a nucleasas. Para ello, diseñaron oligonucleótidos conteniendo 3, 6, 8, 10 o 12 enlaces fosforotioato en cada extremo de los mismos. Las moléculas más eficientes resultaron ser aquellas que contenían entre 3 y 6 enlaces de este tipo y a medida que aumentaba el número de estos enlaces menor fue la frecuencia de reparación. Además, el análisis del plásmido de las bacterias tras el ensayo *in vitro* con los oligonucleótidos con 10 o 12 enlaces fosforotioato en cada extremo mostró que se había producido mutagénesis al detectarse cambios nucleotídicos inesperados. Un exceso de enlaces fosforotioato disminuyen la especificidad de los oligonucleótidos monocadena. En lo concerniente a la expresión de proteínas del sistema de reparación MMR, los resultados obtenidos con los distintos extractos proteicos sugirieron que este sistema de reparación no participó en los procesos de corrección génica inducida por oligonucleótidos. Nuevamente, las observaciones de HB. Gamper y colaboradores nos sugirieron diseñar oligonucleótidos monocadena de 25nt con 5 enlaces fosforotioato en sus extremos (CS0-4 y CS0-4C) para corregir la mutación W1282X en las cadenas transcrita y no transcrita. Sin embargo, tampoco obtuvimos un porcentaje de alelo salvaje superior al obtenido en células IB3.1 control no transfectadas.

A diferencia de los oligonucleótidos, en el caso de los quimeraplastos en los que sí interviene el sistema de reparación MMR, la manera de incrementar la frecuencia de corrección génica pasaría por reclutar las proteínas que participan en los mecanismos de reparación. Por ejemplo, se ha demostrado que agentes alquilantes como la nitrosourea incrementan la translocación de las proteínas de reparación del DNA MSH2 y MSH6 desde el citoplasma al núcleo (M Christmann y B Kaina, 2000). La aplicación del algún fármaco que promoviera o activara los mecanismos de reparación génica aumentaría quizás la frecuencia

de conversión génica. En este sentido, pequeñas dosis de bleomicina (5nM) en el medio de cultivo aumentaron la frecuencia de reparación génica del gen *tyr* (tirosinasa) mediada por quimeroplastos en melanocitos albinos de ratón (*melan-c*) (T Suzuki, 2003). Con un ensayo de tinción de células, T. Suzuki y colaboradores determinaron que la frecuencia osciló entre 0,1-10% mientras que en los experimentos en los que se transfectó el quimeroplasto sin tratamiento previo de bleomicina no se observaron cambios en la tinción de las células. Otro tratamiento evaluado por los investigadores fue la irradiación con rayos γ , pero ésta no produjo ninguna mejora de la frecuencia, estudiada por cambios en la pigmentación de las células tratadas y por RFLPs. La irradiación con rayos UVB (ultravioleta B) para activar los sistemas de reparación del DNA tampoco sirvió para incrementar la corrección de mutaciones en los genes de la queratina 14 y del colágeno tipo XVII mediante quimeroplastos en queratinocitos de pacientes con epidermolisis bullosa (G van der Steege, 2001).

En vez de diseñar oligonucleótidos con enlaces fosforotioato, otros autores han utilizado oligonucleótidos con residuos de RNA 2'-O-metil modificado en sus extremos. W. Fan y K. Yoon crearon una mutación puntual (R94P) en el gen *K17* (queratina 17) en queratinocitos murinos con oligonucleótidos de 69nt que contenían 4 uridinas 2'-O-metil modificadas en los extremos 5' y 3' para evitar la degradación por nucleasas. La frecuencia de conversión génica resultó ser del 3% (W Fan y K Yoon, 2003).

Otra modificación química posible en los oligonucleótidos es la creación de otro tipo de enlaces entre los átomos de la ribosa o desoxiribosa, como los oligonucleótidos "Locked Nucleic Acid" (HB Gamper, 2000), (H Parekh-Olmedo, 2002) (ver Figura 19).

La idea de reemplazar el enlace fosforotioato por un residuo LNA surgió a raíz de la observación de que los oligonucleótidos fosforotioato podían presentar elevada toxicidad celular reduciendo su potencial para aplicaciones terapéuticas (S Agrawal y Q Zhao, 1998), mientras que estos nuevos oligonucleótidos no inducían toxicidad (cuando fueron inyectados en el cerebro de ratas), eran más estables y además seguían teniendo resistencia frente a nucleasas (C Wahlestedt, 2000).

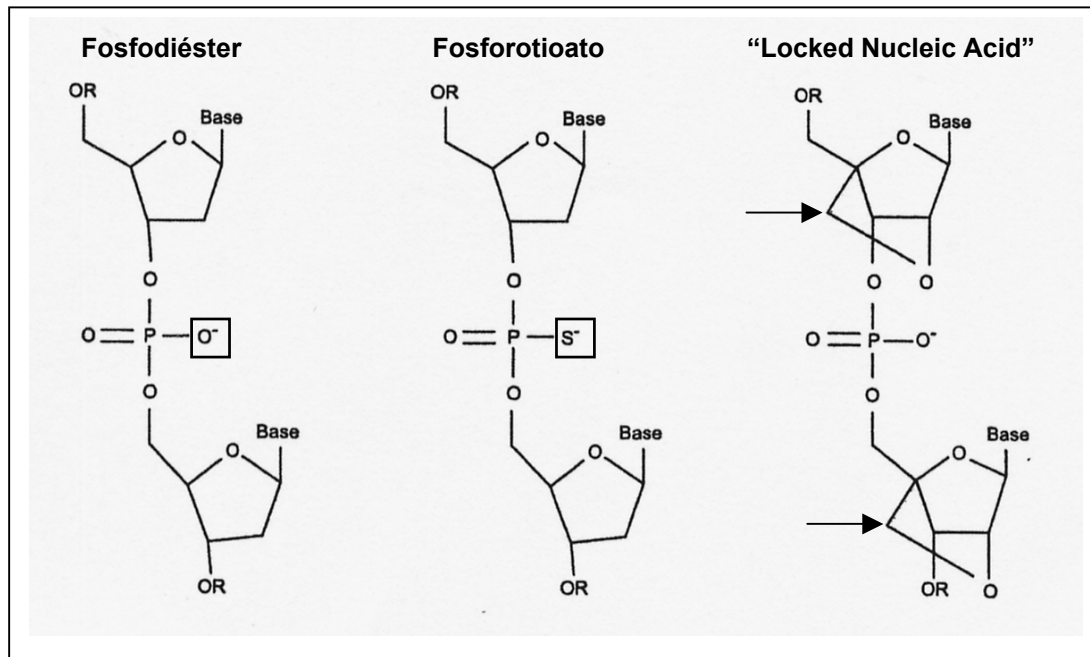


Figura 19: Modificaciones químicas y tipos de enlaces atómicos en los oligonucleótidos. El enlace fosfodiéster es el que se establece normalmente entre los nucleósidos (base + azúcar) de los ácidos nucleicos. En el enlace fosfortioato, el radical oxígeno del enlace fosfodiéster (cuadrado negro) es sustituido por el radical azufre (cuadrado negro). En el caso de un "Locked nucleic acid" (traducido por ácido nucleico cerrado), se produce un enlace metileno entre el oxígeno en la posición 2' y el carbono en la posición 4' (residuo LNA) (señalado por la flecha negra). Esquema adaptado de H Parekh-Olmedo y colaboradores (H Parekh-Olmedo, 2002)

H. Parekh-Olmedo y colaboradores utilizaron oligonucleótidos con residuos LNA para corregir una mutación puntual en el gen de resistencia a higromicina contenido en un plásmido integrativo en la levadura (*S. cerevisiae* cepa LSY678) (H Parekh-Olmedo, 2002). Oligonucleótidos control y correctores de 24nt con 1 residuo LNA en cada extremo de los mismos fueron diseñados contra la cadena transcrita y la no transcrita del gen de resistencia a higromicina y electroporados en la levadura. La mayor frecuencia de reparación génica se obtuvo en el caso de los oligonucleótidos reparadores contra la cadena no transcrita. Este hecho ya se había observado en estudios anteriores con oligonucleótidos modificados (L Liu, 2001). Para evaluar el efecto de los residuos LNA, los autores rediseñaron el oligonucleótido corrector dirigido contra la cadena no transcrita con 1, 2 o 3 residuos LNA y además oligonucleótidos de 50nt y 74nt con 5 residuos LNA en cada extremo de los mismos. La actividad correctora fue inversamente proporcional a la cantidad de enlaces LNA del oligonucleótido, pero la longitud del oligonucleótido compensó la reducción de la

actividad reparadora producida por el elevado número de residuos LNA (el oligonucleótido de 74nt fue más eficiente que el oligonucleótido de 50nt).

Otras modificaciones son posibles en el esqueleto oligonucleotídico (para una revisión consultar (J Micklefield, 2001)) para mejorar su efectividad y disminuir su toxicidad y degradación.

Se ha propuesto otra manera de abordar la reparación de mutaciones en el mRNA en el caso de los oligonucleótidos utilizando una molécula dúplex de RNA distinta a los RNA interferentes. Muy recientemente, PC. Zamecnik y colaboradores han conseguido restablecer la función del canal CFTR gracias a la inserción de los nucleótidos que se encuentran deletados en el mRNA F508del (PC Zamecnik, 2004). El dúplex de RNA consistió por una parte en un oligonucleótido de 33nt de RNA 2'-O-metil modificado y por otra, un oligonucleótido de 11nt también de RNA pero sin la modificación 2'-O-metil. El esquema hipotético de reparación del mRNA se presenta en la Figura 20.

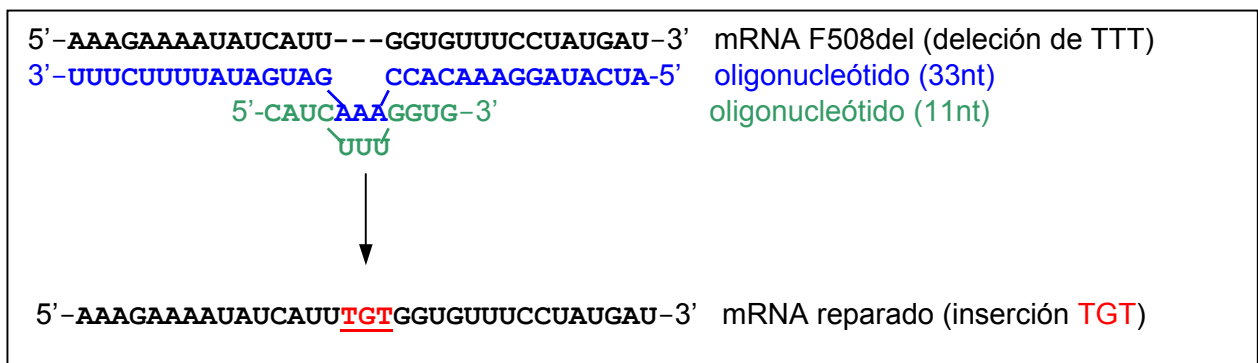


Figura 20: Representación esquemática de la reparación del mRNA F508del por RNA dúplex

El mecanismo de inserción no ha sido determinado todavía.

Esquema adaptado de PC. Zamecnik y colaboradores 2004 (PC Zamecnik, 2004).

Los autores introdujeron este dúplex de RNA en células c127i (carcinoma mamario de ratón) que expresaban F508del y obtuvieron una reversión del fenotipo. Las células tratadas respondieron a cAMP dando lugar a corrientes de cloruros mientras que las células control no mostraron ninguna respuesta (evidenciado por técnicas electrofisiológicas de “patch-clamp”). El “Western-blot” indicó que se produjo proteína CFTR sin que ésta estuviera truncada. Se realizaron RT-PCR sobre mRNA de células tratadas para confirmar la inserción de los nucleótidos. Sorprendentemente se observó una inserción TGT en vez de la TTT esperada según el diseño del dúplex de RNA. El codón TGT codifica una cisteína y parece ser una sustitución de aminoácido aceptable de la fenilalanina en la posición 508 de la

proteína. Según los investigadores, esta observación hace pensar en un mecanismo de inserción progresiva de nucleótidos individuales.

En el caso de la técnica de SFHR, la utilización de distintos fragmentos de longitud variable nos hubiera permitido optimizar esta metodología y obtener quizás corrección génica siempre y cuando los cebadores para la detección de la reparación se localicen por fuera del fragmento SFHR para evitar la interferencia de los fragmentos SFHR en la estimación del porcentaje de reparación génica (D de Semir y JM Aran, 2003).

17. ENSAYOS PARA VALIDAR Y CUANTIFICAR LA CORRECCION GENICA

La generalización de las aplicaciones de técnicas de reparación génica se ha visto dificultada por la ausencia de sistemas estandarizados para cuantificar la conversión génica en un tipo celular particular de una manera rápida y reproducible. Además, para validar estas metodologías se tiene que demostrar que la corrección génica es heredable. En este sentido, hemos desarrollado un método cuantitativo para determinar el porcentaje de reparación génica de las mutaciones F508del y W1282X, a partir de DNA genómico extraído de las células IB3.1 tratadas. Para ello, se establecieron rectas de calibración mediante reacciones de PCR en fase exponencial sobre mezclas de DNA mutado y salvaje para cada mutación con cebadores fluorescentes y posterior genotipación. Para la mutación W1282X, adaptamos la metodología diagnóstica de PCR-OLA a nuestro modelo celular (ver “13. PCR-OLA”).

En un estudio muy reciente, M. Nakamura y colaboradores han puesto a punto una recta de calibración mediante PCR en tiempo real para estimar el porcentaje de corrección del gen *ttr* (transtirretina), en hígado de ratón mediada por quimeroplastos y oligonucleótidos (M Nakamura, 2004).

Existen otros ensayos específicos para validar y cuantificar con mayor precisión la corrección génica basados en la utilización de marcadores selectivos y genes reporteros.

17.1. Ensayos en *E. coli*

Gen de resistencia a Kanamicina: ensayo *in vitro* diseñado para evaluar la competencia reparadora de las células IB3.1 (D de Semir, 2003) y otras líneas celulares (ver “14. Ensayo *in vitro* para evaluar la competencia reparadora de las células IB3.1 y otras líneas celulares”) basado en la utilización del plásmido pK^sm4021 que contiene el gen de resistencia a ampicilina y el gen de resistencia a kanamicina inactivado por una mutación puntual.

HB. Gamper y colaboradores optimizaron este ensayo para estudiar y valorar diferentes estructuras de quimeroplastos (HB Gamper, Jr., 2000). La frecuencia de corrección de la mutación puntual en el gen de resistencia a kanamicina dependió de la longitud de

homología con el DNA diana y de la composición del quimeraplasto.

Se demostró que la cadena de DNA es la que media la corrección génica mientras que la cadena híbrida estimula la formación del heterodúplex en presencia de la proteína RecA.

Gen *LacZ*: O. Igoucheva y colaboradores han utilizado un plásmido con una mutación puntual en el gen de la β -galactosidasa para evaluar el potencial corrector de extractos de células de mamífero incubados con quimeraplastos (O Igoucheva, 1999). La tinción de células CHO-K1 en las que se transfectaron el quimeraplasto de 68nt y el plásmido, reveló que la frecuencia de corrección fue del 1%. En ensayos *in vitro* en *E. coli* con extractos de células HeLa, queratinocitos humanos inmortalizados (HaCaT), y queratinocitos humanos primarios (PKC), se demostró que la corrección génica fue del 5% en el caso de las células HeLa y HaCaT pero inferior al 0,1% en queratinocitos humanos primarios (evidenciado por RFLP).

Gen de resistencia a Zeocina: para evaluar tanto la efectividad de los vectores como el diseño de los fragmentos SFHR con el objetivo de optimizar la técnica de SFHR se han puesto a punto modelos basados en la corrección de genes seleccionables o reporteros como el gen de resistencia al antibiótico zeocina (Zeo^R) (A Colosimo, 2001) y el gen *EGFP* (P Thorpe, 2002). En el caso de la técnica de SFHR para la FQ, el problema principal es la ausencia de un sistema de selección que defina con precisión los cambios genéticos. El gen *CFTR* no es un gen seleccionable o marcador selectivo. Para demostrar que los fragmentos que se generan son aptos para la corrección génica, se ha diseñado un plásmido (pZamp+4) que contiene el gen de resistencia a ampicilina y una delección de 4 bases en el gen de resistencia al antibiótico zeocina, este último utilizado como marcador de reversión fenotípica. A. Colosimo y colaboradores cotransfectaron mediante electroporación, con un lípido catiónico (DOTAP) o con un dendrímero (Superfect), fragmentos SFHR monocadena o de doble cadena de 410pb y 458pb junto con el plásmido en células de epitelio bronquial de FQ (CFBE41) (A Colosimo, 2001). De las células transfectadas se extrajo el plásmido episomal y se utilizó para transformar bacterias *E. coli*. Las frecuencias de corrección del gen Zeo se determinaron dividiendo el número de colonias resistentes a zeocina por el número de colonias resistentes a ampicilina. Estas frecuencias oscilaron entre 0,001% a 4%. El máximo (4%) se obtuvo en el caso de experimentos con el plásmido episomal y tras electroporación del fragmento monocadena más largo de 458pb.

17.2. Ensayos en *S. cerevisiae*

Ligando FLAsH: se ha diseñado un ensayo con levadura para evaluar la eficiencia de corrección de varias técnicas de conversión génica (MC Rice, 2001b).

Las células de *S. cerevisiae* contienen el plásmido pAURNeoFLAsH con el gen de resistencia a neomicina mutado, el gen de resistencia a la aureobasidina y la pauta abierta de lectura del receptor del ligando peptídico FLAsH. Se exponen las levaduras a la molécula de ácido nucleico que se quiere ensayar y la corrección de la mutación se puede evaluar por la traducción de la proteína fusionada que se une al ligando FLAsH añadido posteriormente al medio de cultivo. Este ligando sintético que permea a través de las membranas celulares, no emite fluorescencia hasta que se une al receptor. Esta unión emite fluorescencia verde facilitando la rápida identificación de las células que contienen el plásmido corregido (BA Griffin, 1998).

Fusión de genes de resistencia a Higromicina B y EGFP: el plásmido pAUR101(int)Hyg^s-EGFP (L Liu, 2003) contiene una mutación puntual en el gen de resistencia a higromicina (TAG en vez de TAT) que lo inactiva. La reparación de la mutación puntual por un oligonucleótido devuelve la resistencia a higromicina B y conlleva a la expresión de EGFP. Con el fin de comparar las eficiencias de corrección de distintas mutaciones (una sustitución de nucleótido, una inserción o una delección) en el gen de resistencia a higromicina B contenido en este plásmido (codifica para la proteína de fusión que confiere tanto resistencia a higromicina B como fluorescencia), L. Liu y colaboradores realizaron experimentos en *S. cerevisiae* (cepa LSY678). Los autores electroporaron en esta cepa un quimeraplasto de 70nt y oligonucleótidos de 25nt, 40nt, 74nt y 100nt con 3 enlaces fosforotioato en ambos extremos y dirigidos contra las cadenas transcrita y no transcrita del gen (L Liu, 2001). La mayor eficiencia de corrección se obtuvo en el caso de la interacción en la cadena no transcrita con el oligonucleótido de 74nt, mientras que con el quimeraplasto la corrección fue prácticamente nula. El oligonucleótido de 100nt no incrementó la reparación debido quizás a la formación de estructuras secundarias que redujeron la actividad de reparación. Todas las mutaciones se corrigieron de manera dependiente de la concentración de oligonucleótido pero el orden en la eficiencia de reparación fue el siguiente: sustitución>inserción>delección. La corrección del cambio en la pauta de lectura ("frameshift") fue también inferior a la frecuencia de reparación de una mutación puntual por cambio de nucleótido.

17.3. Ensayos en células de mamífero

Gen EGFP: el gen de la proteína verde es un buen gen reportero dado que la corrección de una mutación en su secuencia conlleva a la aparición de células verdes fácilmente identificables al microscopio de fluorescencia. La frecuencia de reparación génica se puede determinar mediante citometría de flujo. Para evitar controversias en las frecuencias de reparación utilizando otros sistemas de valoración y obviar la PCR como técnica de detección debido a los artefactos que se generan, la expresión de EGFP constituye un

sistema fiable y válido. A pesar de que otros sistemas han utilizado marcadores de selección, la presión selectiva puede inducir o forzar mutagénesis o incluso reversión natural que puede enmascarar la verdadera corrección mediada por los oligonucleótidos. Al utilizar la EGFP, se pueden visualizar todas las células y no sólo aquellas que han sobrevivido a la selección. De esta manera y utilizando la EGFP se puede medir con más precisión la reparación génica sin tener que pasar por ensayos bacterianos o tinciones celulares al poder detectar la corrección directamente con la utilización del citómetro de flujo.

En este sentido, PH. Thorpe y colaboradores diseñaron un ensayo *in vivo* para evaluar el potencial de corrección de distintas técnicas de reparación génica dirigida (P Thorpe, 2002). Los investigadores generaron la mutación puntual (W339X) en el gen *EGFP* contenido en el plásmido pHygEGFP que codifica para una proteína de fusión que confiere resistencia a higromicina B y fluorescencia verde bajo el control del promotor del CMV. Este plásmido se transfectó en seis tipos celulares (COS7, A549, HUH7, HeLa, HT1080, HT1080RAD51) y se seleccionaron las que tenían el plásmido integrado en sus cromosomas. Se transfectaron entonces fragmentos SFHR y quimeroplastos para validar su efectividad en la reparación de esta mutación. La corrección génica se observó al cabo de 48h con la aparición de células verdes que expresaron la proteína EGFP y además se pudieron cuantificar por citometría de flujo.

En otro estudio, ND. Tran y colaboradores (ND Tran, 2003) corrigieron una mutación puntual (Y66S) en el gen *EGFP* contenido en un plásmido. La reparación génica se dio únicamente cuando el plásmido fue microinyectado (episomal) en fibroblastos primarios de ratón junto con distintas estructuras de quimeroplastos pero a niveles bajos, entre 0,4% y 2,4%.

Fusión de genes de luciferasa: M. Bennett y J. Schaack han construido un plásmido que codifica para la proteína de fusión de dos luciferasas para comparar las eficiencias de corrección inducidas por fragmentos SFHR y oligonucleótidos monocadena. El plásmido contiene el gen *RLuc* como control interno (del coral bioluminiscente *Renilla reniformis*) y el gen *FLuc* (de la luciérnaga *Photinus pyralis*) con una delección de 1nt que lo inactiva (M Bennett y J Schaack, 2003). La expresión de una luciferasa necesita la expresión de la otra. Los autores cotransfectaron mediante el vector no viral Effectene en células HEK293 y células CHO, el plásmido con los genes fusionados junto con fragmentos SFHR de 500 bases u oligonucleótidos monocadena de 50nt con 4 enlaces fosforotioato en cada extremo dirigidos contra ambas cadenas. Las emisiones de fotones se detectaron gracias a una cámara tras añadir al medio de cultivo los sustratos luciferina y coelenterazina. Los porcentajes de reparación génica fueron superiores para los fragmentos SFHR con respecto a los oligonucleótidos, alcanzándose cerca del 5% en las células CHO y 0,21% en las

células HEK293. Los autores indicaron que el ensayo fue tan sensible que se pudo detectar una eficiencia de corrección inferior a 5×10^{-6} (<1 de cada 200000 células).

17.4. Ensayos en animales

Ratón *Gtrosa26* transgénico para el gen *LacZ*: muy recientemente, HD. Nickerson y WH. Colledge han generado un ratón transgénico que expresa una mutación puntual en el gen *LacZ* la cual lo inactiva, en todos sus tejidos y que puede servir para estudiar la eficacia de las técnicas de reparación génica *in vivo* e identificar que tipos celulares son transfectables (HD Nickerson y WH Colledge, 2004). Para la obtención del ratón, los autores utilizaron células madre que contenían una copia integrada del plásmido pCMVM1 β geo con los genes fusionados *LacZ* y *neo* que ya habían caracterizado en un ensayo previo (HD Nickerson y WH Colledge, 2003). Se transfectó mediante Lipofectamina un oligonucleótido de 35 bases con 3 enlaces fosforotioato en cada extremo, en las células madre utilizadas para generar el ratón. La frecuencia de corrección se estimó en 9×10^{-5} y este bajo nivel de reparación se pudo deber quizás a la eficiencia de transfección que únicamente fue del 1-5%. En el ratón, un quimeraplasto de 68nt y el mismo oligonucleótido de 35nt fueron administrados independientemente con PEI por vía intraperitoneal e intravenosa pero en ninguno de los experimentos se detectó reparación génica tras el análisis de preparaciones de distintos tejidos. Los investigadores indicaron que posiblemente el nivel de expresión de β -galactosidasa no fuera suficiente para permitir su visualización.

Todos estos ensayos permiten optimizar las moléculas correctoras utilizadas en las técnicas de reparación génica y para comparar las eficiencias de corrección de distintos tipos celulares.

18. COMPARACION DE LAS TECNICAS DE CORRECCION GENICA (QUIMERAPLASTIA VS OLIGONUCLEOTIDOS VS SFHR)

Aunque se ha propuesto la participación de procesos de apareamiento homólogo en las diferentes técnicas de reparación génica, todavía se desconocen los mecanismos moleculares específicos implicados en cada una de ellas.

18.1. Quimeraplastia vs oligonucleótidos

Muy recientemente, M. Nakamura y colaboradores han utilizado un quimeraplasto de 68nt y oligonucleótidos de 74nt, 45nt y 25nt con tres enlaces fosforotioato en sus extremos para introducir una mutación puntual en el gen *ttr* (transtirretina), responsable de la amiloidosis (trastorno neuropático), en células HepG2 y corregir la misma mutación *in vivo* en el hígado de ratones transgénicos (M Nakamura, 2004). El vector de transfección fue el atelocolágeno

(polímero biocompatible derivado del colágeno) y en el experimento *in vivo* se administraron los complejos directamente en el hígado. Para estimar el porcentaje de corrección los autores establecieron rectas de calibración con mezclas de DNA mutado y salvaje mediante PCR en tiempo real. Los mayores niveles de conversión génica se obtuvieron con los oligonucleótidos de 74nt y fueron del 11% en HepG2 y 9% en muestras extraídas del hígado. Sin embargo, los quimeroplastos fueron incapaces de inducir conversión génica.

HB Gamper y colaboradores han constatado que los oligonucleótidos fosforotioato fueron 4 veces más activos que oligonucleótidos sin modificar o que los quimeroplastos en la reparación de la mutación puntual en el gen de resistencia a kanamicina contenido en el plásmido pK^sm4021 (HB Gamper, 2000). Los autores estudiaron por separado las dos cadenas del quimeroplasto para evaluar su capacidad de reparación de mutaciones puntuales. Utilizaron el plásmido pK^sm4021 y extractos proteicos de células HUH-7 para comparar la efectividad de oligonucleótidos de 25nt de RNA, de DNA, o quiméricos con los dos tipos de nucleótidos. Los oligonucleótidos de DNA repararon más eficientemente la mutación puntual en el gen de resistencia a kanamicina que los oligonucleótidos de RNA. Tras esta primera constatación, los autores modificaron los enlaces de los oligonucleótidos de DNA para evaluar su sensibilidad a nucleasas. Para ello, diseñaron oligonucleótidos conteniendo 3, 6, 8, 10 o 12 enlaces fosforotioato en cada extremo de los mismos y los más eficientes resultaron ser aquellos que contenían entre 3 y 6 enlaces. Sin embargo, un oligonucleótido con todos los enlaces fosforotioato no tuvo actividad lo que sugiere que es necesaria la presencia de nucleótidos sin modificar para estimular la reparación del "mismatch".

Los oligonucleótidos son más baratos que los quimeroplastos y más fáciles de sintetizar y purificar, generando menos subproductos de síntesis. Se ha demostrado que distintos oligonucleótidos monocadena pueden corregir diferentes genes en la misma célula (V Alexeev, 2002). Los autores corrigieron una mutación puntual en el gen *tyr* (tirosinasa) (en el cromosoma 7) y generaron una mutación puntual en el gen *c-kit* (tirosina quinasa en el cromosoma 5) en melanocitos de ratón albino con oligonucleótidos de 45 bases de homología con la región diana pero con los extremos 5' y 3' protegidos por 4 uracilos 2'-O-metil modificados cada uno. No se ha descrito ninguna investigación en la que se hayan utilizado dos quimeroplastos a la vez para corregir dos genes pero sí se han usado dos quimeroplastos simultáneamente para introducir dos mutaciones en el mismo gen en la planta del arroz (A Okuzaki y K Toriyama, 2003). Los autores buscaron crear mutaciones puntuales en distintas posiciones del gen *ALS* (acetolactato sintasa) que confirieran resistencia a herbicidas diferentes. Dos quimeroplastos fueron administrados simultáneamente a los callos para crear dos mutaciones a la vez, en las posiciones 548 y 627. Tras la introducción de ambos quimeroplastos se obtuvieron plantas resistentes al

bispiribac-sodio pero los análisis de DNA extraído de las hojas evidenciaron que tan sólo se había producido la mutación en la posición 548 del gen *ALS*.

W. Fan y K. Yoon generaron una mutación puntual (R94P) en el gen *K17* (queratina 17) en queratinocitos murinos con un quimeraplasto de 68nt y oligonucleótidos de 69nt con 4 uridinas 2'-O-metil modificadas en los extremos 5' y 3' para evitar su degradación por nucleasas. No hubo diferencias entre las frecuencias de conversión génica (inferior al 3%) inducidas por el quimeraplasto o el oligonucleótido (W Fan y K Yoon, 2003).

Tanto para los oligonucleótidos como para los quimeraplastos no se pueden establecer una estructura ni longitud típicas para los procesos de corrección génica.

En nuestros experimentos, hemos transfectado 4 quimeraplastos con estructuras distintas (CSO-1, CSO-1C, CSO-2, CSO-3) con PEI o Citofectina en las células IB3.1 para corregir la mutación puntual W1282X (D de Semir, 2003). Los primeros quimeraplastos utilizados (CSO-1 y CSO-1C) tenían la estructura clásica de 68nt y fueron diseñados contra ambas cadenas del DNA. El tercer quimeraplasto (CSO-2) contenía dos regiones de 12 ribonucleótidos 2'-O-metil modificados flanqueando 7 nucleótidos de DNA incluido el nucleótido mutador, por lo que la estructura optimizada fue de 80nt. El último quimeraplasto (CSO-3) fue diseñado teniendo en cuenta los resultados de estructura-actividad de HB. Gamper y colaboradores (HB Gamper, Jr., 2000) quienes sugirieron sintetizar una cadena compuesta únicamente por RNA 2'-O-metil modificado y complementaria al DNA diana y la otra cadena sólo de DNA conteniendo el nucleótido mutador. Sin embargo, ninguna de las estructuras de los quimeraplastos indujo reparación de la mutación W1282X. HB. Gamper y colaboradores (HB Gamper, 2000) han indicado que oligonucleótidos monocadena son más activos en corrección génica que las estructuras originales de los quimeraplastos por lo que diseñamos dos oligonucleótidos monocadena (CSO-4 y CSO-4C) de 25nt con 5 enlaces fosforotioato en cada extremo dirigidos contra ambas cadenas del DNA diana. Estos oligonucleótidos fueron electroporados o transfectados con PEI o Citofectina nuevamente en las células IB3.1 pero tampoco se obtuvo reparación génica (D de Semir, 2003).

18.2. Quimeraplastia y oligonucleótidos vs SFHR

La técnica de SFHR permite modificar no sólo inserciones, deleciones o mutaciones puntuales sino regiones más amplias en el genoma comparado con la quimeraplastia o los oligonucleótidos monocadena. Sin embargo, la PCR que genera los fragmentos puede introducir errores en la secuencia de los mismos aunque este problema se puede mitigar utilizando una polimerasa con capacidad de edición como la *Pfu* Turbo DNA polimerasa (Stratagene).

PH. Thorpe y colaboradores han establecido un ensayo *in vivo* con el gen *EGFP* para validar la corrección funcional de dos técnicas de reparación génica, SFHR y quimeroplastia (PH Thorpe, 2002). Los autores utilizaron el plásmido pHygEGFP que codifica para la proteína de fusión que confiere tanto resistencia a higromicina B como fluorescencia bajo el control del promotor del CMV. A este plásmido le introdujeron una mutación puntual en el gen *EGFP* (W339X) y lo cotransfectaron mediante PEI junto con fragmentos SFHR de 442pb o un quimeraplasto de 68nt para corregir esta mutación puntual en seis tipos celulares (COS7, A549, HUH7, HeLa, HT1080, HT1080RAD51). La citometría de flujo permitió cuantificar la corrección génica. Los fragmentos SFHR tuvieron una eficiencia de corrección inferior al 1% en todos los tipos celulares a excepción de las células HeLa. Sin embargo, el quimeraplasto únicamente pudo corregir la mutación en las células HT1080RAD51 que sobreexpresaron RAD51 aunque con una frecuencia de 2,6% (superior a la obtenida con fragmentos SFHR). Los investigadores sugirieron que la baja eficiencia de reparación se debió a la poca incorporación nuclear tanto de los fragmentos SFHR como del quimeraplasto, evidenciado por microscopía confocal.

HD. Nickerson y WH. Colledge compararon en células en cultivo, la efectividad de oligonucleótidos, de la técnica de SFHR y de la quimeroplastia en la corrección de una mutación puntual en el gen *LacZ* contenido en el plásmido pCMVM1 β geo que codifica para la proteína de fusión con actividad β -galactosidasa y resistencia a neomicina bajo el control del promotor del CMV (HD Nickerson y WH Colledge, 2003). Un quimeraplasto de 68nt, oligonucleótidos de 20nt, 35nt y 80nt (con 3 enlaces fosforotioato en sus extremos), y fragmentos SFHR de doble cadena de 0,52kb, 1kb y 1,9kb fueron cotransfectados mediante Lipofectamina en células HEK293, CHO-K1 (fibroblastos ováricos de hámster chino), HBE (células humanas de epitelio bronquial), y células madre de ratón junto con el plásmido o transfectados en las mismas células que expresaban establemente el gen *LacZ*. Para el gen *LacZ* episomal, la mayor frecuencia de reparación se obtuvo con los fragmentos SFHR en los 4 tipos celulares pero para el gen *LacZ* cromosómico, el mayor porcentaje de corrección fue con los oligonucleótidos antisentido. Además, los oligonucleótidos diseñados contra la cadena no transcrita (antisentido) fueron 5 veces más efectivos en la reparación que los oligonucleótidos dirigidos contra la cadena transcrita. El quimeraplasto no indujo reparación en ninguno de los experimentos. Los autores constataron una variabilidad en las eficiencias de corrección entre el gen episomal y el gen cromosómico, entre los tipos celulares y las técnicas de reparación. Por ejemplo, se obtuvieron máximos de 20% de corrección en células HEK293 con el fragmento SFHR de 1kb (*LacZ* episomal) y 0,2% en células HEK293 con el oligonucleótido de 35nt antisentido (*LacZ* cromosómico).

19. INCONSISTENCIAS EN LOS ESTUDIOS DE CORRECCION GENICA

En el estudio de A. Cole-Strauss y colaboradores (A Cole-Strauss, 1996) en el que se describió la corrección de una mutación puntual en el gen *HBB* (β -globina) en células B linfoblastoides, no se pudo repetir la conversión génica del gen de la β -globina en células TK6 a pesar de evidenciar que la incorporación del mismo quimeraplasto fue mayor en estas células que en el caso de las células B.

Un año después de la publicación de A. Cole-Strauss y colaboradores (A Cole-Strauss, 1996), KR. Thomas y MR. Capecchi (KR Thomas y MR Capecchi, 1997) ya objetaron el hecho de que los resultados obtenidos no provinieran de una población clonal de células por lo que artefactos en el ensayo de evaluación de la corrección génica debían tenerse en cuenta. A este comentario le siguió otro de A. Stasiak, SC. West y EH. Egelman (A Stasiak, 1997) que sugirieron la contaminación con células salvajes como fuente de alelo "corregido" posibilitando que la corrección génica estimada fuera mayor que la reparación real.

En 1998, al mismo tiempo que se publicaron las investigaciones de BT. Kren y colaboradores en las que se demostró la introducción de una mutación puntual en el gen *F9* (factor IX de la coagulación) en hepatocitos de rata con una frecuencia del 40% (BT Kren, 1998), apareció un comentario de M. Strauss acerca de la dificultad de la técnica de quimeroplastia, poniendo en entredicho la facilidad con la que se suponía se podían introducir o corregir mutaciones en cualquier gen (M Strauss, 1998). M. Strauss describió sus fracasos en los intentos de introducción de una mutación puntual en el gen *cdk4* en células epiteliales y en la corrección del gen mutado del receptor de LDL en linfocitos.

Un año después, EB. Kmiec sugirió cuales podían ser las causas de la no reproducibilidad de la técnica indicando que la incorporación nuclear del quimeraplasto es un factor crítico y que si la transfección celular es baja el nivel de corrección seguirá siendo indetectable (EB Kmiec, 1999). También, añadió que no se puede excluir la dependencia del contexto génico en aproximaciones de quimeroplastia a pesar de que no parece haber ninguna restricción de secuencia de DNA para que tenga lugar este proceso de reparación dado que se han conseguido modificar genes tanto de plantas como de bacterias, de células animales y humanas. Además, EB. Kmiec apuntó que debido a la longitud, estructura y contenido quimérico del quimeraplasto la eficiencia de síntesis del mismo podía ser baja por lo que la pureza de la molécula es esencial. La pureza de los oligonucleótidos y quimeroplastos es relevante ya que subproductos de síntesis pueden ser tóxicos e incluso competir con el quimeraplasto íntegro. En este sentido, A. Manzano y colaboradores han recalcado la importancia de disponer de un quimeraplasto puro para que los resultados de corrección génica se consideren reproducibles (A Manzano, 2003).

Casi todos los estudios de quimeroplastia han utilizado la PCR y RFLPs para evaluar el

porcentaje de corrección mediada por los oligonucleótidos quiméricos.

Sin embargo, Z. Zhang y colaboradores han propuesto que la falta de conversión génica y el error en la detección de la misma se deban a potenciales artefactos de PCR donde el quimeraplasto actuaría tanto de cebador como de cadena molde en la reacción de amplificación por PCR (Z Zhang, 1998). Estos autores diseñaron 42 estructuras de quimeraplastos para corregir mutaciones puntuales en cinco genes humanos (factores V, VIII y IX de coagulación, *PAI-1* o inhibidor del activador del plasminógeno, CCR5 o receptor de quimioquina) y en un gen canino (*F9*, factor IX de la coagulación) en distintos modelos celulares humanos (HT1080, células linfoblastoides, Jurkat, HUH-7) y caninos (fibroblastos primarios y hepatocitos). Para administrar los quimeraplastos se usó la lipofección, electroporación y microinyección. No obstante, los investigadores no obtuvieron reparación génica en ningún locus a largo plazo. Los análisis mediante PCR y enzimas de restricción mostraron un porcentaje de corrección génica de 2-10% en el caso del factor VIII a los 3 días post-transfección que sin embargo no se mantuvo al cabo de 14 días. Además se estimó un 5% de conversión génica para el gen *PAI-1* pero el clonaje de productos de PCR reveló la inexistencia de cambio nucleotídico para dicho gen. Por estos motivos, Z. Zhang y colaboradores han sugerido que los presuntos falsos positivos se originaron por artefactos de PCR generados por el mismo quimeraplasto.

E. Santana y colaboradores intentaron introducir mediante quimeraplastos de 68nt mutaciones puntuales en los genes de la fosfatasa alcalina y β -globina en varios tipos de células epiteliales (HeLa, queratinocitos humanos primarios, HaCaT) (E Santana, 1998). Sin embargo, los quimeraplastos transfectados con Lipofectamina, únicamente fueron efectivos en la introducción de las mutaciones en el caso de las células HeLa. El porcentaje de conversión génica fue del 5% para ambos genes (evidenciado por ensayos de RFLP y densitometría) pero inferior al 1% para las otras células, por lo que los autores sugirieron que las diferencias en las frecuencias podían deberse a las actividades de reparación de cada tipo celular.

T. Cervelli y colaboradores no pudieron introducir una mutación puntual en el gen *ATP1A1* (subunidad α -1 de la ATPasa Na^+/K^+ humana) con un quimeraplasto de 68nt electroporado en células HeLa para hacerlas resistentes a ouabaína (T Cervelli, 2002). La frecuencia de mutación espontánea de colonias resistentes a ouabaína fue similar a la obtenida tras la electroporación del quimeraplasto por lo que este último no tuvo ningún efecto. Una mutación puntual en el gen *HBB* (β -globina) ya había sido corregida en un 5% en las células HeLa con un quimeraplasto en un estudio anterior de E. Santana y colaboradores (E Santana, 1998) excluyéndose entonces el tipo celular como factor limitante en los experimentos de T. Cervelli y colaboradores. Los autores hipotetizaron que la accesibilidad y

localización del locus en el cromosoma susceptible de ser tratado podrían afectar a la eficiencia de conversión génica.

En una investigación reciente de A. Diaz-Font y colaboradores, la transfección de un quimeraplasto de 68nt no indujo la corrección de una mutación puntual en el gen *GBA* (glucocerebrosidasa) en fibroblastos de un paciente con la enfermedad de Gaucher (trastorno en el almacenamiento lisosomal) (A Diaz-Font, 2003). Se demostró la incorporación nuclear del quimeraplasto gracias al vector Citofectina en las células por lo que la falta de reparación génica no se pudo atribuir a la falta de acumulación del oligonucleótido quimérico en el núcleo. Los autores evaluaron entonces la competencia reparadora de extractos proteicos de las células en el ensayo *in vitro* utilizando *E.coli* y el plásmido pK^sm4021, pero no detectaron ninguna reparación de la mutación puntual en el gen de resistencia a kanamicina. PH. Thorpe y colaboradores también han obtenido resultados negativos con fibroblastos renales de primate (células COS-7) incluso en plásmido episomal (PH Thorpe, 2002). ND. Tran y colaboradores también han detectado un nivel muy bajo de reparación génica de una mutación puntual (Y66S) en el gen *EGFP* contenido en un plásmido. La corrección génica se dio únicamente cuando el plásmido fue microinyectado (episomal) junto con distintas estructuras de quimeraplastos (ND Tran, 2003). Los autores compararon la eficiencia de corrección de un quimeraplasto típico (con uniones covalentes entre el RNA y el DNA) con la de 6 quimeraplastos híbridos (dúplex no covalentes formados por cadenas de RNA y DNA sintetizadas individualmente e hibridadas *in vitro*) cuyas estructuras diferían en la posición del nucleótido mutador y en la homología de la región flanqueante al RNA con el gen *EGFP* diana. Tanto quimeraplastos (original e híbridos) como el plásmido con el gen *EGFP* mutado se introdujeron por microinyección en fibroblastos primarios de ratón. Únicamente tres de los seis quimeraplastos híbridos corrigieron la mutación puntual aunque con frecuencias que oscilaron entre 0,4% a 2,4% pero fueron un poco inferiores a la obtenida con el quimeraplasto típico (~3%). Las conclusiones de los investigadores fueron que los “hairpins” del quimeraplasto deben participar en la formación del “loop D” requerido para la corrección génica y que la unión covalente de la cadena de RNA y la de DNA no es estrictamente necesaria para el proceso de reparación génica. También se realizaron experimentos de corrección en fibroblastos primarios de ratón transgénico que expresaban copias integradas del gen *EGFP* mutado pero no se detectó reparación génica, lo que demuestra nuevamente la dificultad de modificar genes integrados.

La única ventaja que representa sintetizar las cadenas del quimeraplasto por separado e hibridarlas *in vitro* es que es menos costoso que la síntesis completa de todo el quimeraplasto.

En vista de los artículos publicados con fibroblastos como modelo de reparación, se puede concluir que los fibroblastos no constituyen quizás un tipo celular adecuado para experimentos de corrección génica por su falta de competencia reparadora.

Se han publicado cartas sobre la infrecuencia y/o irreproducibilidad de la quimeroplastia (no sólo entre grupos de investigación sino también entre experimentos realizados por el mismo grupo) y el hecho de que los cambios producidos sean heredables (G Taubes, 2002), (G van der Steege, 2001), (IR Graham, 2001), (J Albuquerque-Silva, 2001). De hecho, V. Alexeev y K. Yoon demostraron que la corrección de una mutación puntual en melanocitos mediada por quimeroplastos se mantuvo en clones aislados de células (V Alexeev y K Yoon, 1998) pero la frecuencia de conversión génica varió en 30 experimentos desde el 0,01% hasta el 15% (T Gura, 1999). En cuanto a la heredabilidad de la modificación genética, T. Zhu y colaboradores generaron plantas de maíz resistentes a un herbicida al introducir una mutación puntual en el gen *AHAS* (acetohidroxiácido sintasa) mediante un quimeroplasto (T Zhu, 1999), (T Zhu, 2000). El patrón de segregación se mantuvo al observarse que el fenotipo de resistencia presente en plantas C0 perduraba en plantas C1 de la progenie lo que indicaba una herencia mendeliana de la mutación introducida.

En la investigación de HD. Nickerson y WH. Colledge, la corrección de la mutación puntual inducida por un oligonucleótido de 35nt en el gen *LacZ* integrado en el genoma de células CHO-K1 se mantuvo durante más de 10 pases en cultivo sin observarse una disminución del número de células positivas para tinción con X-Gal (HD Nickerson y WH Colledge, 2003). Esta observación sugirió que la reparación fue estable.

En lo concerniente a la reproducibilidad de experimentos de quimeroplastia, los resultados obtenidos por un grupo de científicos no han podido ser repetidos por otro grupo independiente incluso utilizando el mismo quimeroplasto y protocolo de administración. Sirva de ejemplo la comparación entre las investigaciones de PR. Beetham y colaboradores (PR Beetham, 1999) y de R. Ruitter y colaboradores (R Ruitter, 2003). Los datos obtenidos en el primer estudio han demostrado claramente la introducción de una mutación puntual en el gen *ALS* (acetolactato sintasa) en células Nt-1 de la planta del tabaco mediante un quimeroplasto y biolística. Sin embargo, R. Ruitter y colaboradores no pudieron generar esa misma mutación en el gen *ALS* en las células BY-2 de la planta del tabaco a pesar de utilizar un quimeroplasto y un protocolo de microbombardeo idénticos. La única diferencia entre las dos investigaciones es el tipo celular utilizado que seguramente determina la frecuencia y fidelidad de la conversión génica inducida por quimeroplastos. Además, en sistemas bacterianos junto con ensayos *in vitro*, A. Cole-Strauss y colaboradores han corroborado que no todos los tipos celulares tienen la misma competencia reparadora (A Cole-Strauss, 1999).

La frustrante variabilidad en los resultados ha sido objeto de varios comentarios en revistas científicas, algunos de los cuales insisten en la persistente incapacidad de conseguir una corrección génica detectable. G. Van der Steege y colaboradores no pudieron reproducir los resultados obtenidos por V. Alexeev y colaboradores del laboratorio de K. Yoon con el gen *tyr* (tirosinasa) en melanocitos (V Alexeev y K Yoon, 1998) utilizando la misma línea celular e idéntico quimeroplasto (G van der Steege, 2001). Los autores también evaluaron el potencial de la quimeroplastia en queratinocitos derivados de pacientes afectados de epidermolisis bullosa con mutaciones homocigotas en los genes *KRT14* (queratina 14) y *COL17A1* (colágeno tipo XVII) pero no obtuvieron ninguna corrección génica a pesar de demostrar mediante microscopía confocal la incorporación nuclear en ambas líneas celulares de los dos quimeroplastos diseñados y de activar los mecanismos de reparación del DNA por radiación UVB (ultravioleta B). Los intentos de conversión nucleotídica de los mismos genes en linfocitos tampoco dieron resultado. Ante estos fracasos persistentes, G. Van der Steege propuso la creación de un consorcio internacional de quimeroplastia para intercambiar resultados, líneas celulares y reactivos.

J. Albuquerque-Silva y colaboradores han expuesto los 4 criterios necesarios para validar la quimeroplastia (J Albuquerque-Silva, 2001):

1. la actividad del quimeroplasto debe introducir un cambio de nucleótido de manera que se obvian los procesos de reversión espontánea.
2. la mutación introducida debe estar ausente en la línea celular utilizada en los experimentos. Células que contengan esta mutación no deberían estar presentes en el laboratorio para evitar contaminaciones cruzadas.
3. la corrección génica se debe evidenciar en clones celulares aislados y en generaciones de células posteriores.
4. es necesario confirmar la modificación génica con la expresión de la proteína en varios ciclos celulares tras el tratamiento con el quimeroplasto.

Estos autores diseñaron un quimeroplasto para corregir una mutación puntual en el gen *HPRT* en distintos tipos celulares. Tras la administración del quimeroplasto mediante PEI, liposoma o microinyección, los clones resistentes resultantes se originaron como consecuencia de la presión selectiva y no por el quimeroplasto.

En una revisión de 20 artículos sobre quimeroplastia en loci cromosómicos, J. Albuquerque-Silva y colaboradores concluyeron que ningún artículo cumplía los 4 criterios anteriormente mencionados.

G. Taubes ha apuntado de nuevo la falta de reproducibilidad en los experimentos de quimeroplastia como factor determinante en la aceptación de esta técnica (G Taubes, 2002) y que los resultados obtenidos por P. Bandyopadhyay y colaboradores (P Bandyopadhyay,

1999) en el laboratorio de C. Steer en experimentos de quimeroplastia y el gen *F9* (factor IX de la coagulación) no han podido ser replicados por T. Jensen y colaboradores.

Ante tanta crítica y escepticismo, EB. Kmiec ha recordado (EB Kmiec, 2003) que los factores que tienen influencia en la obtención de corrección génica son: una buena eficiencia de transfección, la fase del ciclo celular (replicación y transcripción), el nivel de expresión de las proteínas de recombinación y reparación y una buena síntesis de los oligonucleótidos. Después de realizar estudios comparativos con quimeroplastos y oligonucleótidos monocadena, EB. Kmiec ha llegado a las siguientes conclusiones: a) hay una relación proporcional entre la dosis de oligonucleótidos y la reparación génica pero también existe un máximo por encima del cual la eficiencia de corrección disminuye considerablemente, b) una longitud óptima de la molécula se presenta entre 70 y 80 nucleótidos en la cadena de DNA, pero la extensión hasta 100 bases reduce la eficiencia de reparación, c) la corrección génica iniciada en la cadena de DNA no transcrita es de 5 a 10 veces más eficiente que la iniciada en la cadena transcrita, d) las proteínas de la familia RAD participan en la reparación génica. En una investigación muy reciente, A. Terunuma y colaboradores han ideado un sistema basado en la utilización de luz ultravioleta para evaluar el potencial corrector de quimeroplastos (A Terunuma, 2004). Los autores transfectaron independientemente quimeroplastos de 68nt con DOTAP en linfoblastos inmortalizados y heterocigóticos compuestos de una paciente con *Xeroderma pigmentosum* para corregir las dos mutaciones puntuales del gen *XPA*, miembro del sistema de reparación de nucleótidos por escisión (NER). Las células que presentan mutaciones en este gen son sensibles a la luz ultravioleta (UV) mientras que las células heterocigóticas o salvajes sobreviven a la exposición a esta radiación. A los 14 días tras la transfección del quimeroplasto, se irradiaron los linfoblastos tratados con luz ultravioleta C (UVC: 200-290nm). A los 10 días de la radiación, únicamente el 1% de los linfoblastos sobrevivió mientras que todas las células tratadas con un quimeroplasto control murieron. Ahora bien, tras una segunda exposición con UVC para enriquecer el cultivo en células corregidas, de nuevo sólo el 1% sobrevivió sugiriendo que la mayoría de los linfoblastos que sobrevivieron a la primera radiación no expresaron establemente la proteína XPA y que la corrección de uno de los alelos no fue permanente. El análisis de secuencia de 10 clones resistentes a UVC reveló que 2 de ellos presentaron el cambio nucleotídico esperado por lo que la frecuencia de corrección fue finalmente de 2×10^{-5} . Los autores detectaron esta reparación en un único experimento y no se explican porque sus resultados no fueron reproducibles, hecho que ha sido reportado por otros grupos. Además, los intentos de corrección del otro alelo también fracasaron.

Nosotros hemos indicado que la corrección génica en las células IB3.1 de epitelio bronquial

Discusión-¿Cómo se explican las diferentes frecuencias de corrección génica obtenidas?

de fibrosis quística fue un proceso ineficiente al no observarse reparación génica de las mutaciones F508del y W1282X en el gen *CFTR* tras utilizar diferentes estructuras de quimeroplastos (68nt y 80nt) y oligonucleótidos monocadena de 25nt modificados con 5 enlaces fosforotioato en sus extremos (para corregir la mutación W1282X) (D de Semir, 2003), y fragmentos SFHR (para corregir la mutación F508del) (D de Semir, 2003). A pesar de comprobar la competencia reparadora de las células IB3.1 con el ensayo *in vitro* y el plásmido pK^sm4021 (ver “14. Ensayo *in vitro* para evaluar la competencia reparadora de las células IB3.1 y otras líneas celulares”) y la expresión de genes del sistema de reparación MMR y de reconocimiento de “mismatch”, no hemos obtenido corrección de la mutación W1282X a niveles detectables mediante la metodología de PCR-OLA (ver “13. PCR-OLA”). Tampoco hemos podido corregir la mutación F508del mediante fragmentos SFHR conteniendo la secuencia salvaje del gen *CFTR*. Basándonos en una metodología de PCR con uno de los dos cebadores de detección localizado fuera del fragmento SFHR, obtuvimos una frecuencia de corrección génica dependiente de dosis de fragmento SFHR cercana al 30%. Sin embargo, este porcentaje de corrección desapareció al cabo de 5 días post-transfección. Cuando repetimos los experimentos utilizando dos cebadores localizados externamente al fragmento SFHR, no pudimos reproducir la corrección de la mutación F508del, lo que nos llevó a pensar en que los resultados falsos positivos se originaron por un artefacto de PCR generado por el mismo fragmento SFHR. Hemos propuesto un modelo en el que fragmentos SFHR monocadena contaminantes en el DNA extraído de las células IB3.1 tratadas servirían de cebadores artefactuales en las reacciones de PCR generando un fragmento de DNA intermediario que a su vez sería amplificado en las siguientes reacciones de PCR dando lugar a la elevada frecuencia de corrección de la mutación F508del. La publicación de nuestros resultados y el hecho de poner en entredicho ciertos experimentos cuyos diseños con fragmentos SFHR creemos erróneos, conllevaron la aparición de una carta al editor de la revista “Oligonucleotides” por parte del pionero en la utilización de la técnica SFHR, Dieter C. Gruenert y colaboradores (DC Gruenert, 2004). La disputa generada y ciertas consideraciones recibidas acerca de nuestro modelo a las que contestamos con otra carta al editor (JM Aran y D de Semir, 2004) han hecho intervenir entorno a la polémica a conocidos científicos en el campo de la corrección génica (MM Seidman y PM Glazer, 2004) para establecer los estándares en las técnicas de reparación génica.

20. ¿COMO SE EXPLICAN LAS DIFERENTES FRECUENCIAS DE CORRECCION GENICA OBTENIDAS?

Cabe destacar la variabilidad que se observa en las frecuencias de corrección por

Discusión-¿Cómo se explican las diferentes frecuencias de corrección génica obtenidas?

quimeroplastos y oligonucleótidos, aunque es muy probable que cada tipo celular tenga mecanismos de recombinación homóloga y de reparación “mismatch” distintos. Otro posible factor de variabilidad radica en la fiabilidad de los análisis de PCR y RFLP para determinar los porcentajes de corrección. Se han descrito artefactos de PCR provocados por la unión de subproductos de quimeroplastos en las reacciones de amplificación. El quimeroplasto podría actuar como cebador y al contener la secuencia correcta enmascararía la eficiencia de corrección (Z Zhang, 1998). Alternativamente, ciertas regiones del genoma pueden ser más propensas a ser corregidas que otras por el estado de compactación de la cromatina. Se han comparado las frecuencias de corrección del gen *LacZ* episomal y cromosómico (1% y 0,1% respectivamente) sugiriendo la limitada accesibilidad del DNA cromosómico como factor importante en los procesos de conversión génica. HD. Nickerson y WH. Colledge han comparado la quimeroplastia, la técnica de SFHR y la utilización de oligonucleótidos en la reparación de una mutación puntual en el gen *LacZ* episomal o cromosómico en distintos tipos celulares. Sus resultados han puesto de manifiesto que los fragmentos SFHR fueron más eficientes en la corrección del gen *LacZ* episomal que los oligonucleótidos y que éstos indujeron mayor reparación que los fragmentos SFHR en el gen *LacZ* cromosómico (HD Nickerson y WH Colledge, 2003).

La transcripción también parece jugar un papel en la corrección génica. De hecho, se ha observado que los oligonucleótidos modificados y los quimeroplastos dirigidos contra la cadena que no se transcribe corrigen con mayor eficiencia las mutaciones que los que van dirigidos contra la cadena transcrita del DNA (L Liu, 2001), (L Liu, 2002b), (O Igoucheva, 2003), (EE Brachman y EB Kmiec, 2003). La separación de las hebras de DNA durante la transcripción puede hacer que la cadena no transcrita sea más accesible que la cadena que se está transcribiendo y que se encuentra ocupada por la RNA polimerasa y proteínas accesorias. Además se conoce que la RNA polimerasa es capaz de desplazar el oligonucleótido de la cadena transcrita reduciendo entonces su potencial para mediar la corrección génica (L Liu, 2002b). Sin embargo, que la corrección génica sea superior en el caso de la cadena no transcrita no es un proceso universal. EE. Brachman y EB. Kmiec han descrito una cepa de *S. cerevisiae* en la que la corrección génica mediada por oligonucleótidos modificados se vio favorecida en la cadena transcrita (EE Brachman y EB Kmiec, 2003). Se electroporaron 5 oligonucleótidos de 70nt con 3 enlaces fosforotioato en sus extremos para corregir una mutación puntual en el gen *cyc1* (citocromo c1) en 5 cepas distintas de levadura. La mutación puntual es diferente en cada cepa e impide el crecimiento de estas células en medio de cultivo con glicerol como única fuente de carbono. La reparación del gen *cyc1* fue mayor cuando se dirigieron los oligonucleótidos hacia la cadena no transcrita en 4 cepas de levadura. No obstante, en la cepa restante se produjo lo contrario, observándose mayor frecuencia de conversión con oligonucleótidos dirigidos

Discusión-¿Cómo se explican las diferentes frecuencias de corrección génica obtenidas?

contra la cadena transcrita. El hecho de que cada cepa de levadura tuviera un cambio nucleotídico distinto en el gen *cyc1* y que los porcentajes de corrección fueran variables hizo que los investigadores sugirieran que ciertas parejas de nucleótidos del “mismatch” se reparan con más eficiencia: C/C>T/T>A/C=G/G>T/C=A/A=T/G=A/G.

En otro estudio, de M. Bennett y J. Schaack (M Bennett y J Schaack, 2003) en el que se utilizó un ensayo dual de luciferasa para evaluar la eficiencia de corrección del gen de la luciferasa (Fluc) mediante fragmentos SFHR y oligonucleótidos (ver “17.3. Ensayos en células de mamífero”), los autores no observaron diferencias entre las frecuencias de reparación de oligonucleótidos dirigidos contra la cadena transcrita o no transcrita (0,04%), a diferencia de otros estudios.

La diferencia de frecuencias entre experimentos se puede deber a la variabilidad en la degradación del quimeraplasto. Estudios con quimeraplastos marcados con radiactividad han demostrado que se produce degradación. En la investigación de T. Zhu y colaboradores los autoradiogramas evidenciaron que entre el 50-60% del quimeraplasto administrado a las células de las plantas se degradó al cabo de 90 minutos de incubación (T Zhu, 1999). Este hecho ha sido corroborado por otros autores como E. Santana y colaboradores. En su trabajo, también marcaron radiactivamente un quimeraplasto de 68nt y evaluaron su degradación citoplasmática y nuclear tras su transfección en células HeLa (E Santana, 1998). Se aisló el quimeraplasto a las 6h, 24h y 48h post-transfección tanto del citoplasma como del núcleo y las autoradiografías revelaron la aparición de subproductos de degradación a las 6h en ambos casos. Sin embargo, la degradación del quimeraplasto extraído del citoplasma fue mayor que el aislado del núcleo indicando que el oligonucleótido quimérico es más estable en el núcleo.

Nosotros hemos indicado la influencia del suero y del vector de transfección en la degradación de quimeraplastos mediante un ensayo fluorescente y geles de acrilamida (D de Semir, 2002a). Incubamos durante 24h o 48h un quimeraplasto sin complejar y marcado con fluoresceína en presencia de medio de cultivo LHC-8 (para IB3.1) sin suero o conteniendo 5% de suero: fresco, “viejo” (guardado a -20°C y descongelado varias veces a 37°C) o inactivado (56°C durante 1 hora). Es conocida la presencia de nucleasas en los sueros. Los porcentajes de degradación fueron de: 73% en el caso de la incubación con suero fresco, 19% con suero inactivado, 8% con suero “viejo” y 1% con el medio sin suero. A las 48h, el porcentaje de degradación aumentó hasta aproximadamente 90% tras la incubación en medio LHC-8 con 5% de suero fresco. Se realizaron nuevas incubaciones con un quimeraplasto complejado con PEI o Citofectina en medio LHC-8 con 5% de suero fresco. La PEI confirió más protección frente a la degradación que la Citofectina (47% de degradación *versus* 77% respectivamente). Las separaciones electroforéticas del

Discusión--¿Cómo se explican las diferentes frecuencias de corrección génica obtenidas?

quimeraplasto fluoresceinado extraído de las distintas incubaciones y los análisis mediante GeneScan revelaron la actividad exonucleolítica 3' al detectarse subproductos de 54nt de quimeraplasto. Se evidenció además una región de 25nt que fue resistente a degradación y que justamente coincide con la región quimérica de 25nt del quimeraplasto conteniendo los ribonucleótidos 2'-O-metil modificados.

La variabilidad en las frecuencias observadas en distintos modelos *in vitro* e *in vivo* (animales y plantas) demuestra que todavía no se conocen exactamente cuales son los mecanismos que operan en la reparación de mutaciones mediada por quimeraplastos.

MS. Andersen y colaboradores han intentado corregir dos mutaciones puntuales en el gen del receptor de la lipoproteína de baja densidad (LDL) causante de la hipercolesterolemia familiar. Los autores observaron la corrección de la mutación W556S en un experimento pero no detectaron la corrección de la mutación C660X (MS Andersen, 2002) lo que hace pensar en un efecto contexto de la secuencia diana.

Las diferencias en las frecuencias de conversión génica entre plantas y células de mamífero se pueden explicar por distintos factores, desde el método de transfección (biolística con microbombardeo de partículas *versus* lipofección o polifección), la homología de apareamiento de bases y la fidelidad de los mecanismos de conversión génica del sistema de reparación MMR. En el caso de las plantas se ha descrito recientemente que la frecuencia de mutación espontánea podría enmascarar la frecuencia de conversión génica de los quimeraplastos y por tanto su efectividad (R Ruitter, 2003). R. Ruitter y colaboradores no consiguieron modificar el gen *ALS* y dos transgenes (*bar* y la fusión *egfp-bar*) en las células BY-2 de la planta del tabaco mediante un quimeraplasto. De hecho, los autores constataron, tras análisis de secuencia de los genes diana, que la frecuencia de las mutaciones en las células fue idéntica tanto en ausencia como en presencia de los quimeraplastos. El hecho de que los cambios nucleotídicos observados se produjeran en cada una de las posiciones del codón diana hizo pensar que los cambios nucleotídicos fueran más fruto de mutaciones espontáneas y no de la conversión génica inducida por los quimeraplastos.

Varios estudios anteriormente explicados han sugerido que ciertas regiones del genoma sean más propensas a ser corregidas que otras por el estado de compactación de la cromatina. Por esta razón y con el objetivo de incrementar la accesibilidad del gen *CFTR* hemos incubado las células IB3.1 con tricostatina A (inhibidor de la desacetilación de histonas) para evitar la pronta compactación de la cromatina y permitir que los quimeraplastos accedan con más facilidad al gen *CFTR*. Sin embargo, este tratamiento no aumentó el porcentaje de corrección de la mutación W1282X.

21. IMPORTANCIA DEL SISTEMA DE REPARACION MMR Y DEL CICLO CELULAR

La competencia de las células tratadas para catalizar la corrección génica es un factor clave que contribuye a la variabilidad de las frecuencias de conversión génica dirigida. Por esta razón, hemos comprobado la presencia y expresión de genes implicados en la reparación de mutaciones puntuales (sistema de reparación MMR y de reconocimiento de “mismatch”) y recombinación homóloga en las células IB3.1. La técnica de hibridación *in situ* fluorescente (FISH) nos ha servido para confirmar la ausencia de macrodeleciones o reordenamientos cromosómicos en los cromosomas 2, 3 y 7 que contienen los genes del sistema de reparación MMR: *MSH6* (2p16), *MSH2* (2p22-p21), *MLH1* (3p21.3) y *PMS2* (7p22). Por otro lado, a partir de mRNA aislado de las células IB3.1 y utilizando cebadores específicos en las reacciones de RT-PCR, hemos detectado la expresión de los genes *MSH6*, *MSH2*, *MLH1*, y *PMS2*. La integridad de los mecanismos de reparación en las células IB3.1 no pareció estar alterada.

Se ha observado una disminución de la reparación génica inducida por quimeroplastos en células que carecen de la proteína MSH2 indicando la importancia de la actividad de reparación “mismatch” (A Cole-Strauss, 1999). Además, la afinidad de MSH2 por el “mismatch” es distinta dependiendo de los nucleótidos que lo forman. La eficiencia de reparación se correlaciona entonces con la afinidad de unión de MSH2 al “mismatch”: G/T>G/G=G/A>C/A>C/T=T/T>C/C=A/A (A Whitehouse, 1996). Existe una aparente jerarquía de eficiencias de corrección según el nucleótido a modificar. Por ejemplo, los cambios G a C se producen más eficientemente que los cambios A a T (HB Gamper, Jr., 2000).

A diferencia de la quimeroplastia, la conversión génica mediada por oligonucleótidos monocadena parece ser independiente de la expresión de las proteínas “mismatch” MSH2 o MSH3 (HB Gamper, Jr., 2000), (HB Gamper, 2000). O. Igoucheva y colaboradores han indicado la relevancia de la proteína p53 en los procesos de corrección génica. En su estudio, fibroblastos embrionarios de un ratón p53^{-/-} exhibieron una frecuencia de corrección mayor (1%) que células p53^{+/+} (0,003%) indicando la importancia de la proteína p53 en la conversión génica mediada por quimeroplastos (O Igoucheva, 1999). Sin embargo, la utilización de anticuerpos anti-p53 no incrementó la reparación génica lo que hace pensar que esta proteína no interviene directamente en la reparación génica. Se ha sugerido que el sistema de reparación MMR debe tener más accesibilidad para corregir el “mismatch” en ausencia de p53. La corrección mediada por quimeroplastos no parece requerir la replicación del DNA ya que se ha observado corrección génica en hepatocitos quiescentes en estadio celular G0 (BT Kren, 1998) y en células CD34⁺ (Y Xiang, 1997). Sin embargo, un estudio muy reciente de EE. Brachman y EB. Kmiec ha demostrado la influencia de la

replicación del DNA en los procesos de reparación génica (EE Brachman y EB Kmiec, 2004). Los autores diseñaron un ensayo con plásmidos cuya replicación es bidireccional y que contienen orientaciones distintas del gen *EGFP* mutado con respecto al origen de replicación de SV40. Estudiaron la correlación entre la corrección génica mediada por oligonucleótidos y la cadena conductora o la cadena retrasada del DNA en el momento de la replicación. Los investigadores electroporaron oligonucleótidos de 72nt, 44nt y 24nt con 3 enlaces fosforotioato en sus extremos junto con los distintos plásmidos en células COS-1. El porcentaje de corrección se cuantificó por citometría de flujo. Independientemente de la replicación, los porcentajes de reparación fueron siempre superiores en el caso de un direccionamiento génico hacia la cadena no transcrita y dependientes de la longitud del oligonucleótido (cuanto más largo, mayor porcentaje de reparación). En cuanto a la influencia de la replicación, los autores observaron un nivel superior de corrección cuando la cadena no transcrita fue también la cadena retrasada en la replicación. En este sentido, los autores han sugerido que la replicación del DNA aumenta la frecuencia de reparación cuando la cadena retrasada en la replicación es la cadena no transcrita del gen.

22. PAPEL DE LA FAMILIA DE PROTEINAS RAD EN LA CORRECCION GENICA

Se ha demostrado que la proteína RAD52 es supresora de la conversión génica, al constatarse un incremento de la corrección inducida por oligonucleótidos monocadena en levaduras que carecen de RAD52 (L Liu, 2002a) y que la sobreexpresión de la proteína RAD51 aumenta la corrección del DNA (RJ Yanez y AC Porter, 1999). RAD51 está involucrada en procesos de recombinación homóloga y conversión génica y su papel en la reparación génica quedó patente cuando levaduras que carecían de su expresión tuvieron una reducción severa de la actividad de reparación (MC Rice, 2001a).

Dada la importancia de estas proteínas, a partir de mRNA aislado de las células IB3.1 y utilizando cebadores específicos en las reacciones de RT-PCR, nosotros hemos detectado la expresión de los genes implicados en recombinación homóloga y de reconocimiento de "mismatch": RAD51, RAD52 y RPA.

Distintos ensayos en levaduras y células de mamífero han permitido identificar los factores que influyen el proceso de reparación génica y afectan a la frecuencia con la que ocurre. Por ejemplo, la sobreexpresión de RAD51 incrementó la frecuencia de corrección génica cromosómica utilizando el sistema de fusión higromicina-EGFP (ver "17.2. Ensayos en *S. cerevisiae*") (L Liu, 2002a). Este artículo representa la primera evidencia de que la proteína RAD51 estimula la reparación génica en levadura. La fase de unión es posiblemente la etapa más limitante durante el ensamblaje proteico de corrección. RAD51 promueve esta unión al interactuar con otras proteínas de la familia RAD (KP Rice, 2001).

La sobreexpresión de RAD51 probablemente mejore la eficiencia de la fase de unión del oligonucleótido al unirse con más afinidad a RAD54 o al incrementar la unión de RAD51 al oligonucleótido (L Krejci, 2001). Recientes investigaciones han puesto de manifiesto que RAD51 y RAD54 actúan sinérgicamente para remodelar la cromatina durante la creación del “loop D”, reacción intermedia en el proceso de reparación génica mediada por quimeroplastos (V Alexiadis y JT Kadonaga, 2002). Se conoce que la mutación I345T en RAD51 incrementa su unión al DNA mientras que la mutación K342E aumenta su interacción con RAD54 (L Liu, 2003). Utilizando una línea celular de levadura donde la construcción de genes fusionados higromicina-EGFP se mantenía de forma episomal, L. Liu y colaboradores cotransfectaron un oligonucleótido modificado junto con plásmidos que contenían los dos tipos de mutaciones en el gen *RAD51* y demostraron que las mutaciones I345T y K342E aumentaban la actividad de reparación de 38 a 46 veces. Así, la interacción de RAD51 con oligonucleótidos monocadena y/o RAD54 parece crucial para obtener frecuencias de reparación significativas. Estos resultados sugieren que se podría manipular RAD51 para que funcionase más activamente en el proceso de corrección génica.

RJ. Yáñez y AC. Porter han demostrado que RAD51 participa en el direccionamiento genético en células de mamífero (RJ Yanez y AC Porter, 1999). De hecho, observaron un incremento de la corrección génica del gen *HPRT* de dos a tres veces tras la sobreexpresión de *RAD51* en las células humanas HT1080. Sin embargo, los resultados más informativos son los reportados por PH. Thorpe y colaboradores que indicaron que la reparación génica episomal fue estimulada por la sobreexpresión de *RAD51* humano (P Thorpe, 2002).

Todos estos datos han hecho que sea posible proponer un modelo para la primera fase de la reparación génica (ver Figura 21).

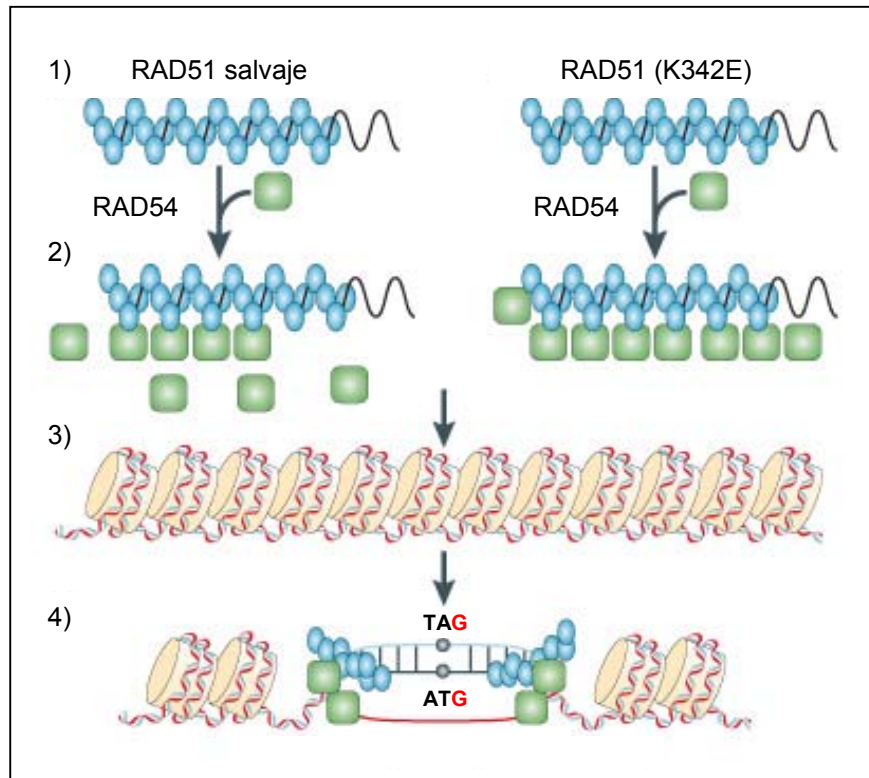


Figura 21: Modelo de la fase de apareamiento en el proceso de reparación génica

Esquema adaptado de L. Liu y colaboradores 2003 (L Liu, 2003).

- 1) El proceso se inicia con la interacción de RAD51 (en azul) y el oligonucleótido (con forma helicoidal en negro) formando un complejo nucleoproteico.
- 2) Posteriormente, RAD54 (en verde) se une al complejo RAD51-oligonucleótido. La mutación K342E en RAD51 afecta a la eficiencia de unión de RAD54 atrayendo más proteínas RAD54 al complejo o bien aumentando su afinidad.
- 3) Un vez formado el complejo terciario RAD54-RAD51-oligonucleótido se inicia la búsqueda de homología con la cromatina diana.
- 4) La formación del "loop D" se da previamente al proceso de reparación mediado por el sistema de reparación MMR y que constituye la segunda fase en la corrección génica.

Ciertos tipos celulares o regiones cromosómicas parecen ser reacios a conversión génica mediada por distintas estrategias de reparación génica dirigida. Sería importante acabar de elucidar los mecanismos que participan en cada una de ellas para optimizar las frecuencias de modificación génica y obtener así niveles de corrección terapéuticamente relevantes.

Para cumplir sus expectativas con respecto a la terapia génica de la fibrosis quística, el direccionamiento génico podría explotar el potencial terapéutico de las células madre incluyendo su corrección *ex vivo* y reimplantación en el pulmón de los pacientes FQ.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en esta tesis nos permiten extraer las siguientes conclusiones:

1. La incorporación celular de quimeroplastos, oligonucleótidos y fragmentos SFHR es muy eficiente en las células IB3.1 de epitelio bronquial de FQ. Citofectina y PEI pero no GenePORTER son vectores de transfección eficientes para incorporar quimeroplastos en el núcleo de las células IB3.1 de epitelio bronquial de FQ.
2. Los poliplexos de PEI y los lipoplejos de Citofectina son internalizados por distintos mecanismos celulares en las células IB3.1 de epitelio bronquial de FQ. Los poliplexos de PEI y los lipoplejos de Citofectina son degradados significativamente en las células IB3.1 de epitelio bronquial de FQ.
3. La influencia del suero utilizado en el medio de cultivo es un factor a tener en cuenta en la estabilidad de los quimeroplastos en fluidos biológicos. La modificación 2'-O-metil del RNA en la estructura del quimeroplasto confiere resistencia a la degradación por nucleasas.
4. El análisis GeneScan de un gel de poliacrilamida desnaturizante constituye un sistema fiable, fácil, sensible y seguro para evaluar y cuantificar la degradación intracelular y extracelular de oligonucleótidos marcados con fluorescencia en fluidos biológicos.
5. Las células IB3.1 de epitelio bronquial de FQ son competentes en cuanto al sistema de reparación MMR.
6. La PCR-OLA constituye un sistema fiable de cuantificación de reparación génica aplicable a modelos celulares heterocigotos.
7. Los fragmentos SFHR pueden actuar como cebador artefactual en las reacciones de PCR y generar un artefacto de PCR que da lugar a falsos positivos en la detección de conversión génica. Es indispensable diseñar los cebadores de detección de la modificación génica fuera de la región de homología con los fragmentos SFHR.
8. La corrección génica de mutaciones puntuales mediada por quimeroplastos, oligonucleótidos monocadena y fragmentos SFHR es un proceso ineficiente en las células IB3.1 de epitelio bronquial de FQ. Es necesario estimular los mecanismos de reparación génica para aumentar la frecuencia de corrección génica.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

- (1990). Worldwide survey of the delta F508 mutation--report from the cystic fibrosis genetic analysis consortium. *Am J Hum Genet* 47:354-9
- (1994). Population variation of common cystic fibrosis mutations. The Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium. *Hum Mutat* 4:167-77
- Abeliovich D, Lavon IP, Lerer I, Cohen T, Springer C, Avital A, Cutting GR (1992). Screening for five mutations detects 97% of cystic fibrosis (CF) chromosomes and predicts a carrier frequency of 1:29 in the Jewish Ashkenazi population. *Am J Hum Genet* 51:951-6
- Agarwal S, Gamper HB, Kmiec EB (2003). Nucleotide replacement at two sites can be directed by modified single-stranded oligonucleotides in vitro and in vivo. *Biomol Eng* 20:7-20
- Agrawal S, Zhao Q (1998). Antisense therapeutics. *Curr Opin Chem Biol* 2:519-28
- Aitken ML, Burke W, McDonald G, Shak S, Montgomery AB, Smith A (1992). Recombinant human DNase inhalation in normal subjects and patients with cystic fibrosis. A phase 1 study. *Jama* 267:1947-51
- Aitken ML, Moss RB, Waltz DA, Dovey ME, Tonelli MR, McNamara SC, Gibson RL, Ramsey BW, Carter BJ, Reynolds TC (2001). A phase I study of aerosolized administration of tgAAVCF to cystic fibrosis subjects with mild lung disease. *Hum Gene Ther* 12:1907-16
- Albuquerque-Silva J, Vassart G, Lavinha J, Abramowicz MJ (2001). Chimeraplasty validation. *Nat Biotechnol* 19:1011
- Alexeev V, Igoucheva O, Domashenko A, Cotsarelis G, Yoon K (2000). Localized in vivo genotypic and phenotypic correction of the albino mutation in skin by RNA-DNA oligonucleotide. *Nat Biotechnol* 18:43-7
- Alexeev V, Igoucheva O, Yoon K (2002). Simultaneous targeted alteration of the tyrosinase and c-kit genes by single-stranded oligonucleotides. *Gene Ther* 9:1667-75
- Alexeev V, Yoon K (1998). Stable and inheritable changes in genotype and phenotype of albino melanocytes induced by an RNA-DNA oligonucleotide. *Nat Biotechnol* 16:1343-6
- Alexeev V, Yoon K (2000). Gene correction by RNA-DNA oligonucleotides. *Pigment Cell Res* 13:72-9
- Alexiadis V, Kadonaga JT (2002). Strand pairing by Rad54 and Rad51 is enhanced by chromatin. *Genes Dev* 16:2767-71
- Allen FH, Jr., Dooley RR, Shwachman H, Steinberg AG (1956). Linkage studies with cystic fibrosis of the pancreas. *Am J Hum Genet* 8:162-76
- Alton EW, Middleton PG, Caplen NJ, Smith SN, Steel DM, Munkonge FM, Jeffery PK, Geddes DM, Hart SL, Williamson R, et al. (1993). Non-invasive liposome-mediated gene delivery can correct the ion transport defect in cystic fibrosis mutant mice. *Nat Genet* 5:135-42
- Andersen MS, Sorensen CB, Bolund L, Jensen TG (2002). Mechanisms underlying targeted gene correction using chimeric RNA/DNA and single-stranded DNA oligonucleotides. *J Mol Med* 80:770-81
- Anderson D (1938). Cystic fibrosis of the pancreas and its relationship to celiac disease: Clinical and pathologic study. *Am J Dis Chil* 56:344-399

Bibliografía

- Anderson DH, Hodges RG (1946). Genetics of cystic fibrosis of the pancreas with a consideration of etiology. *Am J Dis Child* 72: 62
- Anderson MP, Berger HA, Rich DP, Gregory RJ, Smith AE, Welsh MJ (1991a). Nucleoside triphosphates are required to open the CFTR chloride channel. *Cell* 67:775-84
- Anderson MP, Gregory RJ, Thompson S, Souza DW, Paul S, Mulligan RC, Smith AE, Welsh MJ (1991b). Demonstration that CFTR is a chloride channel by alteration of its anion selectivity. *Science* 253:202-5
- Antonarakis SE (1998). Recommendations for a nomenclature system for human gene mutations. Nomenclature Working Group. *Hum Mutat* 11:1-3
- Ao A, Handyside A, Winston RM (1996a). Preimplantation genetic diagnosis of cystic fibrosis (delta F508). *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 65:7-10
- Ao A, Ray P, Harper J, Lesko J, Paraschos T, Atkinson G, Soussis I, Taylor D, Handyside A, Hughes M, Winston RM (1996b). Clinical experience with preimplantation genetic diagnosis of cystic fibrosis (delta F508). *Prenat Diagn* 16:137-42
- Aran JM, de Semir D (2004). Response. *Oligonucleotides* 14(2):158-60
- Arkwright PD, Laurie S, Super M, Pravica V, Schwarz MJ, Webb AK, Hutchinson IV (2000). TGF-beta(1) genotype and accelerated decline in lung function of patients with cystic fibrosis. *Thorax* 55:459-62
- Arkwright PD, Pravica V, Geraghty PJ, Super M, Webb AK, Schwarz M, Hutchinson IV (2003). End-organ dysfunction in cystic fibrosis: association with angiotensin I converting enzyme and cytokine gene polymorphisms. *Am J Respir Crit Care Med* 167:384-9
- Astudillo Pombo J, Bravo Masgoret C, Margarit Creixell C, Guillermo Rodriguez ML, Tenorio Lopez L (1994). [Sequential double-lung transplantation. Technique and results in the first 3 cases. Pulmonary Transplant Group]. *Arch Bronconeumol* 30:348-53
- Auricchio A, O'Connor E, Weiner D, Gao GP, Hildinger M, Wang L, Calcedo R, Wilson JM (2002). Noninvasive gene transfer to the lung for systemic delivery of therapeutic proteins. *J Clin Invest* 110:499-504
- Avner R, Laufer N, Safran A, Kerem BS, Friedmann A, Mitrani-Rosenbaum S (1994). Preimplantation diagnosis of cystic fibrosis by simultaneous detection of the W1282X and delta F508 mutations. *Hum Reprod* 9:1676-80
- Aynie I, Vauthier C, Chacun H, Fattal E, Couvreur P (1999). Spongelike alginate nanoparticles as a new potential system for the delivery of antisense oligonucleotides. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 9:301-12
- Bandyopadhyay P, Ma X, Linehan-Stieers C, Kren BT, Steer CJ (1999). Nucleotide exchange in genomic DNA of rat hepatocytes using RNA/DNA oligonucleotides. Targeted delivery of liposomes and polyethyleneimine to the asialoglycoprotein receptor. *J Biol Chem* 274:10163-72
- Bartlett RJ, Stockinger S, Denis MM, Bartlett WT, Inverardi L, Le TT, thi Man N, Morris GE, Bogan DJ, Metcalf-Bogan J, Kornegay JN (2000). In vivo targeted repair of a point mutation in the canine dystrophin gene by a chimeric RNA/DNA oligonucleotide. *Nat Biotechnol* 18:615-22

Bibliografia

- 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
- Beetham PR, Kipp PB, Sawycky XL, Arntzen CJ, May GD (1999). A tool for functional plant genomics: chimeric RNA/DNA oligonucleotides cause in vivo gene-specific mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:8774-8
- Beigelman L, Karpeisky A, Matulic-Adamic J, Haeberli P, Sweedler D, Usman N (1995). Synthesis of 2'-modified nucleotides and their incorporation into hammerhead ribozymes. *Nucleic Acids Res* 23:4434-42
- Bennett M, Schaack J (2003). Development of a dual-luciferase fusion gene as a sensitive marker for site-directed DNA repair strategies. *J Gene Med* 5:723-32
- Bertoni C, Lau C, Rando TA (2003). Restoration of dystrophin expression in mdx muscle cells by chimeraplast-mediated exon skipping. *Hum Mol Genet* 12:1087-99
- Bertoni C, Rando TA (2002). Dystrophin gene repair in mdx muscle precursor cells in vitro and in vivo mediated by RNA-DNA chimeric oligonucleotides. *Hum Gene Ther* 13:707-18
- Biet E, Maurisse R, Dutreix M, Sun J (2001). Stimulation of RecA-mediated D-loop formation by oligonucleotide-directed triple-helix formation: guided homologous recombination (GOREC). *Biochemistry* 40:1779-86
- Billings PR (1999). In utero gene therapy: the case against. *Nat Med* 5:255-6
- Bines JE, Israel EJ (1991). Hypoproteinemia, anemia, and failure to thrive in an infant. *Gastroenterology* 101:848-56
- Birrer P (1995). Proteases and antiproteases in cystic fibrosis: pathogenetic considerations and therapeutic strategies. *Respiration* 62 Suppl 1:25-8
- Bishop AE (2004). Pulmonary epithelial stem cells. *Cell Prolif* 37:89-96
- Boers JE, Ambergen AW, Thunnissen FB (1999). Number and proliferation of clara cells in normal human airway epithelium. *Am J Respir Crit Care Med* 159:1585-91
- Bombieri C, Benetazzo M, Saccomani A, Belpinati F, Gile LS, Luisetti M, Pignatti PF (1998). Complete mutational screening of the CFTR gene in 120 patients with pulmonary disease. *Hum Genet* 103:718-22
- Borthwick DW, Shahbazian M, Krantz QT, Dorin JR, Randell SH (2001). Evidence for stem-cell niches in the tracheal epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol* 24:662-70
- Bossi A, Battistini F, Braggion C, Magno EC, Cosimi A, de Candussio G, Gagliardini R, Giglio L, Giunta A, Grzincich GL, La Rosa M, Lombardo M, Lucidi V, Manca A, Mastella G, Moretti P, Padoan R, Pardo F, Quattrucci S, Raia V, Romano L, Salvatore D, Taccetti G, Zanda M (1999). [Italian Cystic Fibrosis Registry: 10 years of activity]. *Epidemiol Prev* 23:5-16
- Bowdish ME, Barr ML, Starnes VA (2003). Living lobar transplantation. *Chest Surg Clin N Am* 13:505-24
- Bowler IM, Estlin EJ, Littlewood JM (1993). Cystic fibrosis in Asians. *Arch Dis Child* 68:120-2
- Boyle MP, Enke RA, Adams RJ, Guggino WB, Zeitlin PL (2001). In utero AAV-mediated gene transfer to rabbit pulmonary epithelium. *Mol Ther* 4:115-21

Bibliografía

- Brachman EE, Kmiec EB (2003). Targeted nucleotide repair of *cyc1* mutations in *Saccharomyces cerevisiae* directed by modified single-stranded DNA oligonucleotides. *Genetics* 163:527-38
- Brachman EE, Kmiec EB (2004). DNA replication and transcription direct a DNA strand bias in the process of targeted gene repair in mammalian cells. *J Cell Sci* 117:3867-74
- Brady MS, Rickard K, Yu PL, Eigen H (1992). Effectiveness of enteric coated pancreatic enzymes given before meals in reducing steatorrhea in children with cystic fibrosis. *J Am Diet Assoc* 92:813-7
- Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y, Zychlinsky A (2004). Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 303:1532-5
- Brody E, Abelson J (1985). The "spliceosome": yeast pre-messenger RNA associates with a 40S complex in a splicing-dependent reaction. *Science* 228:963-7
- Brooks AR, Harkins RN, Wang P, Qian HS, Liu P, Rubanyi GM (2004). Transcriptional silencing is associated with extensive methylation of the CMV promoter following adenoviral gene delivery to muscle. *J Gene Med* 6:395-404
- Brown RK, Kelly FJ (1994). Role of free radicals in the pathogenesis of cystic fibrosis. *Thorax* 49:738-42
- Bruscia E, Sangiuolo F, Sinibaldi P, Goncz KK, Novelli G, Gruenert DC (2002). Isolation of CF cell lines corrected at DeltaF508-CFTR locus by SFHR-mediated targeting. *Gene Ther* 9:683-5
- Bui T, Watanabe R, Kennedy B, Unadkat JD, Morton WR, Ho RJ (1995). Simian immunodeficiency virus infection of macaque primary placental cells. *AIDS Res Hum Retroviruses* 11:955-61
- Caplen NJ, Alton EW, Middleton PG, Dorin JR, Stevenson BJ, Gao X, Durham SR, Jeffery PK, Hodson ME, Coutelle C, et al. (1995). Liposome-mediated CFTR gene transfer to the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis. *Nat Med* 1:39-46
- Carbarns NJ, Gosden C, Brock DJ (1983). Microvillar peptidase activity in amniotic fluid: possible use in the prenatal diagnosis of cystic fibrosis. *Lancet* 1:329-31
- Cartier R, Reszka R (2002). Utilization of synthetic peptides containing nuclear localization signals for nonviral gene transfer systems. *Gene Ther* 9:157-67
- Casals T, Bassas L, Egozcue S, Ramos MD, Gimenez J, Segura A, Garcia F, Carrera M, Larriba S, Sarquella J, Estivill X (2000). Heterogeneity for mutations in the CFTR gene and clinical correlations in patients with congenital absence of the vas deferens. *Hum Reprod* 15:1476-83
- Casals T, Pacheco P, Barreto C, Gimenez J, Ramos MD, Pereira S, Pinheiro JA, Cobos N, Curvelo A, Vazquez C, Rocha H, Seculi JL, Perez E, Dapena J, Carrilho E, Duarte A, Palacio AM, Nunes V, Lavinha J, Estivill X (1997). Missense mutation R1066C in the second transmembrane domain of CFTR causes a severe cystic fibrosis phenotype: study of 19 heterozygous and 2 homozygous patients. *Hum Mutat* 10:387-92
- Cashman SM, Patino A, Delgado MG, Byrne L, Denham B, De Arce M (1995). The Irish cystic fibrosis database. *J Med Genet* 32:972-5
- Cech TR, Zaug AJ, Grabowski PJ (1981). In vitro splicing of the ribosomal RNA precursor of Tetrahymena: involvement of a guanosine nucleotide in the excision of the intervening sequence. *Cell* 27:487-96

Bibliografia

- Cervelli T, Lombardi G, Citti L, Galli A, Locci MT, Rainaldi G (2002). Targeting of A701G nucleotide at the human ATP1A1 locus using a RNA/DNA chimera. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 21:775-84
- CFconsortium (1993). Correlation between genotype and phenotype in patients with cystic fibrosis. The Cystic Fibrosis Genotype-Phenotype Consortium. *N Engl J Med* 329:1308-13
- Chan PP, Lin M, Faruqi AF, Powell J, Seidman MM, Glazer PM (1999). Targeted correction of an episomal gene in mammalian cells by a short DNA fragment tethered to a triplex-forming oligonucleotide. *J Biol Chem* 274:11541-8
- Chao AC, de Sauvage FJ, Dong YJ, Wagner JA, Goeddel DV, Gardner P (1994). Activation of intestinal CFTR Cl⁻ channel by heat-stable enterotoxin and guanylin via cAMP-dependent protein kinase. *Embo J* 13:1065-72
- Chao H, Mansfield SG, Bartel RC, Hiriyantha S, Mitchell LG, Garcia-Blanco MA, Walsh CE (2003). Phenotype correction of hemophilia A mice by spliceosome-mediated RNA trans-splicing. *Nat Med* 9:1015-9
- Cheer SM, Waugh J, Noble S (2003). Inhaled tobramycin (TOBI): a review of its use in the management of Pseudomonas aeruginosa infections in patients with cystic fibrosis. *Drugs* 63:2501-20
- Chen Z, Felsheim R, Wong P, Augustin LB, Metz R, Kren BT, Steer CJ (2001). Mitochondria isolated from liver contain the essential factors required for RNA/DNA oligonucleotide-targeted gene repair. *Biochem Biophys Res Commun* 285:188-94
- Cheng K, Smyth RL, Govan JR, Doherty C, Winstanley C, Denning N, Heaf DP, van Saene H, Hart CA (1996). Spread of beta-lactam-resistant Pseudomonas aeruginosa in a cystic fibrosis clinic. *Lancet* 348:639-42
- Cheng SH, Gregory RJ, Marshall J, Paul S, Souza DW, White GA, O'Riordan CR, Smith AE (1990). Defective intracellular transport and processing of CFTR is the molecular basis of most cystic fibrosis. *Cell* 63:827-34
- Cheng SH, Rich DP, Marshall J, Gregory RJ, Welsh MJ, Smith AE (1991). Phosphorylation of the R domain by cAMP-dependent protein kinase regulates the CFTR chloride channel. *Cell* 66:1027-36
- Chillon M, Casals T, Mercier B, Bassas L, Lissens W, Silber S, Romey MC, Ruiz-Romero J, Verlingue C, Claustres M, et al. (1995). Mutations in the cystic fibrosis gene in patients with congenital absence of the vas deferens. *N Engl J Med* 332:1475-80
- Choi JY, Muallem D, Kiselyov K, Lee MG, Thomas PJ, Muallem S (2001). Aberrant CFTR-dependent HCO₃⁻ transport in mutations associated with cystic fibrosis. *Nature* 410:94-7
- Choo-Kang LR, Zeitlin PL (2001). Induction of HSP70 promotes DeltaF508 CFTR trafficking. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 281:L58-68
- Chou JL, Rozmahel R, Tsui LC (1991). Characterization of the promoter region of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene. *J Biol Chem* 266:24471-6
- Christmann M, Kaina B (2000). Nuclear translocation of mismatch repair proteins MSH2 and MSH6 as a response of cells to alkylating agents. *J Biol Chem* 275:36256-62

Bibliografía

- Chu CS, Trapnell BC, Curristin S, Cutting GR, Crystal RG (1993). Genetic basis of variable exon 9 skipping in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator mRNA. *Nat Genet* 3:151-6
- Chu CS, Trapnell BC, Murtagh JJ, Jr., Moss J, Dalemans W, Jallat S, Mercenier A, Pavirani A, Lecocq JP, Cutting GR, et al. (1991). Variable deletion of exon 9 coding sequences in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene mRNA transcripts in normal bronchial epithelium. *Embo J* 10:1355-63
- Cibelli JB, Stice SL, Golueke PJ, Kane JJ, Jerry J, Blackwell C, Ponce de Leon FA, Robl JM (1998). Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. *Science* 280:1256-8
- Clancy JP, Beбок 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* 163:1683-92
- Clara M (1937). Zur Histobiologie des Bronchialepithels. *Z. Microsk. Anat. Forsch* 41, 321
- Clarke LL, Grubb BR, Gabriel SE, Smithies O, Koller BH, Boucher RC (1992). Defective epithelial chloride transport in a gene-targeted mouse model of cystic fibrosis. *Science* 257:1125-8
- Claustres M, Guittard C, Bozon D, Chevalier F, Verlingue C, Ferec C, Girodon E, Cazeneuve C, Bienvenu T, Lalau G, Dumur V, Feldmann D, Bieth E, Blayau M, Clavel C, Creveaux I, Malinge MC, Monnier N, Malzac P, Mitre H, Chomel JC, Bonnefont JP, Iron A, Chery M, Georges MD (2000). Spectrum of CFTR mutations in cystic fibrosis and in congenital absence of the vas deferens in France. *Hum Mutat* 16:143-56
- Cohen BE, Lee G, Jacobson KA, Kim YC, Huang Z, Sorscher EJ, Pollard HB (1997). 8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine and other xanthines differentially bind to the wild-type and delta F508 first nucleotide binding fold (NBF-1) domains of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Biochemistry* 36:6455-61
- Cohen RG, Barr ML, Schenkel FA, DeMeester TR, Wells WJ, Starnes VA (1994). Living-related donor lobectomy for bilateral lobar transplantation in patients with cystic fibrosis. *Ann Thorac Surg* 57:1423-7; discussion 1428
- Cohn JA, Friedman KJ, Noone PG, Knowles MR, Silverman LM, Jowell PS (1998). Relation between mutations of the cystic fibrosis gene and idiopathic pancreatitis. *N Engl J Med* 339:653-8
- Cohn JA, Noone PG, Jowell PS (2002). Idiopathic pancreatitis related to CFTR: complex inheritance and identification of a modifier gene. *J Investig Med* 50:247S-255S
- Cole-Strauss A, Gamper H, Holloman WK, Munoz M, Cheng N, Kmiec EB (1999). Targeted gene repair directed by the chimeric RNA/DNA oligonucleotide in a mammalian cell-free extract. *Nucleic Acids Res* 27:1323-30
- Cole-Strauss A, Yoon K, Xiang Y, Byrne BC, Rice MC, Gryn J, Holloman WK, Kmiec EB (1996). Correction of the mutation responsible for sickle cell anemia by an RNA-DNA oligonucleotide. *Science* 273:1386-9
- Colosimo A, Goncz KK, Novelli G, Dallapiccola B, Gruenert DC (2001). Targeted correction of a defective selectable marker gene in human epithelial cells by small DNA fragments. *Mol Ther* 3:178-85

Bibliografia

- Conneally PM, Merritt AD, Yu PL (1973). Cystic fibrosis: population genetics. *Tex Rep Biol Med* 31:639-50
- Conrad CK, Allen SS, Afione SA, Reynolds TC, Beck SE, Fee-Maki M, Barraza-Ortiz X, Adams R, Askin FB, Carter BJ, Guggino WB, Flotte TR (1996). Safety of single-dose administration of an adeno-associated virus (AAV)-CFTR vector in the primate lung. *Gene Ther* 3:658-68
- Corey M, Durie P, Moore D, Forstner G, Levison H (1989). Familial concordance of pancreatic function in cystic fibrosis. *J Pediatr* 115:274-7
- Costes B, Fanen P, Goossens M, Ghanem N (1993). A rapid, efficient, and sensitive assay for simultaneous detection of multiple cystic fibrosis mutations. *Hum Mutat* 2:185-91
- Crystal RG, McElvaney NG, Rosenfeld MA, Chu CS, Mastrangeli A, Hay JG, Brody SL, Jaffe HA, Eissa NT, Danel C (1994). Administration of an adenovirus containing the human CFTR cDNA to the respiratory tract of individuals with cystic fibrosis. *Nat Genet* 8:42-51
- Culver KW, Hsieh WT, Huyen Y, Chen V, Liu J, Khripine Y, Khorlin A (1999). Correction of chromosomal point mutations in human cells with bifunctional oligonucleotides. *Nat Biotechnol* 17:989-93
- Cuppens H, Lin W, Jaspers M, Costes B, Teng H, Vankeerberghen A, Jorissen M, Droogmans G, Reynaert I, Goossens M, Nilius B, Cassiman JJ (1998). Polyvariant mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator genes. The polymorphic (Tg)m locus explains the partial penetrance of the T5 polymorphism as a disease mutation. *J Clin Invest* 101:487-96
- Dalemans W, Barbry P, Champigny G, Jallat S, Dott K, Dreyer D, Crystal RG, Pavirani A, Lecocq JP, Lazdunski M (1991). Altered chloride ion channel kinetics associated with the delta F508 cystic fibrosis mutation. *Nature* 354:526-8
- David AL, Peebles DM, Gregory L, Themis M, Cook T, Coutelle C, Rodeck CH (2003). Percutaneous ultrasound-guided injection of the trachea in fetal sheep: a novel technique to target the fetal airways. *Fetal Diagn Ther* 18:385-90
- Davies JC, Potter M, Bush A, Rosenthal M, Geddes DM, Alton EW (2002). Bone marrow stem cells do not repopulate the healthy upper respiratory tract. *Pediatr Pulmonol* 34:251-6
- de Leval MR, Smyth R, Whitehead B, Scott JP, Elliott MJ, Sharples L, Caine N, Helms P, Martin IR, Higenbottam T, et al. (1991). Heart and lung transplantation for terminal cystic fibrosis. A 4 1/2-year experience. *J Thorac Cardiovasc Surg* 101:633-41; discussion 641-2
- de Semir D, Aran JM (2003). Misleading gene conversion frequencies due to a PCR artifact using small fragment homologous replacement. *Oligonucleotides* 13:261-9
- de Semir D, Avinyo A, Larriba S, Nunes V, Casals T, Estivill X, Aran JM (2002). Quantitative assessment of chimeroplast stability in biological fluids by polyacrylamide gel electrophoresis and laser-assisted fluorescence analysis. *Pharm Res* 19:914-8
- de Semir D, Nadal M, Gonzalez JR, Larriba S, Avinyo A, Nunes V, Casals T, Estivill X, Aran JM (2003). Suitability of oligonucleotide-mediated cystic fibrosis gene repair in airway epithelial cells. *J Gene Med* 5:625-39
- Dekker M, Brouwers C, te Riele H (2003). Targeted gene modification in mismatch-repair-deficient embryonic stem cells by single-stranded DNA oligonucleotides. *Nucleic Acids Res* 31:e27

Bibliografía

- Denning C, Dickinson P, Burl S, Wylie D, Fletcher J, Clark AJ (2001). Gene targeting in primary fetal fibroblasts from sheep and pig. *Cloning Stem Cells* 3:221-31
- Denning CR, Sommers SC, Quigley HJ, Jr. (1968). Infertility in male patients with cystic fibrosis. *Pediatrics* 41:7-17
- Denning GM, Anderson MP, Amara JF, Marshall J, Smith AE, Welsh MJ (1992). Processing of mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is temperature-sensitive. *Nature* 358:761-4
- Dequeker E, Cuppens H, Dodge J, Estivill X, Goossens M, Pignatti PF, Scheffer H, Schwartz M, Schwarz M, Tummeler B, Cassiman JJ (2000). Recommendations for quality improvement in genetic testing for cystic fibrosis. European Concerted Action on Cystic Fibrosis. *Eur J Hum Genet* 8 Suppl 2:S2-24
- Devoto M, Castagnola S, Saha N, Chetsanga C, Allen M, Gyllensten U, Romeo G (1991). Screening for the major cystic fibrosis mutation in non-Caucasian populations. *Am J Hum Genet* 49:903-4
- Di Sant'Agnese PA, Darling RC, Perera GA, Shea E (1953). Abnormal electrolyte composition of sweat in cystic fibrosis of the pancreas; clinical significance and relationship to the disease. *Pediatrics* 12:549-63
- Diaz-Font A, Cormand B, Chabas A, Vilageliu L, Grinberg D (2003). Unsuccessful chimeroplast strategy for the correction of a mutation causing Gaucher disease. *Blood Cells Mol Dis* 31:183-6
- Doetschman T, Gregg RG, Maeda N, Hooper ML, Melton DW, Thompson S, Smithies O (1987). Targetted correction of a mutant HPRT gene in mouse embryonic stem cells. *Nature* 330:576-8
- Dorin JR, Dickinson P, Alton EW, Smith SN, Geddes DM, Stevenson BJ, Kimber WL, Fleming S, Clarke AR, Hooper ML, et al. (1992). Cystic fibrosis in the mouse by targeted insertional mutagenesis. *Nature* 359:211-5
- Driskell RA, Engelhardt JF (2003). Current status of gene therapy for inherited lung diseases. *Annu Rev Physiol* 65:585-612
- Drumm ML (2001). Modifier genes and variation in cystic fibrosis. *Respir Res* 2:125-8
- Drumm ML, Pope HA, Cliff WH, Rommens JM, Marvin SA, Tsui LC, Collins FS, Frizzell RA, Wilson JM (1990). Correction of the cystic fibrosis defect in vitro by retrovirus-mediated gene transfer. *Cell* 62:1227-33
- Drumm ML, Wilkinson DJ, Smit LS, Worrell RT, Strong TV, Frizzell RA, Dawson DC, Collins FS (1991). Chloride conductance expressed by delta F508 and other mutant CFTRs in *Xenopus* oocytes. *Science* 254:1797-9
- D'Souza GG, Rammohan R, Cheng SM, Torchilin VP, Weissig V (2003). DQAsome-mediated delivery of plasmid DNA toward mitochondria in living cells. *J Control Release* 92:189-97
- 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 *Cfr*^{-/-} mouse carrying a human CFTR-G542X transgene. *J Mol Med* 80:595-604

Bibliografia

- Duan D, Sehgal A, Yao J, Engelhardt JF (1998). Lef1 transcription factor expression defines airway progenitor cell targets for in utero gene therapy of submucosal gland in cystic fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 18:750-8
- Egan ME, Pearson M, Weiner SA, Rajendran V, Rubin D, Glockner-Pagel J, Canny S, Du K, Lukacs GL, Caplan MJ (2004). Curcumin, a major constituent of turmeric, corrects cystic fibrosis defects. *Science* 304:600-2
- Egan TM, Detterbeck FC, Mill MR, Bleiweis MS, Aris R, Paradowski L, Retsch-Bogart G, Mueller BS (2002). Long term results of lung transplantation for cystic fibrosis. *Eur J Cardiothorac Surg* 22:602-9
- Eggerding FA, Iovannisci DM, Brinson E, Grossman P, Winn-Deen ES (1995). Fluorescence-based oligonucleotide ligation assay for analysis of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene mutations. *Hum Mutat* 5:153-65
- Eidelman O, Guay-Broder C, van Galen PJ, Jacobson KA, Fox C, Turner RJ, Cabantchik ZI, Pollard HB (1992). A1 adenosine-receptor antagonists activate chloride efflux from cystic fibrosis cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:5562-6
- Elborn JS, Shale DJ, Britton JR (1991). Cystic fibrosis: current survival and population estimates to the year 2000. *Thorax* 46:881-5
- Epelboin S, Hubert D, Patrat C, Abirached F, Bienvenu T, Lepercq J (2001). Management of assisted reproductive technologies in women with cystic fibrosis. *Fertil Steril* 76:1280-1
- Estivill X, Bancells C, Ramos C (1997). Geographic distribution and regional origin of 272 cystic fibrosis mutations in European populations. The Biomed CF Mutation Analysis Consortium. *Hum Mutat* 10:135-54
- Estivill X, Ortigosa L, Perez-Frias J, Dapena J, Ferrer J, Pena L, Llevadot R, Gimenez J, Nunes V, et al. (1995). Clinical characteristics of 16 cystic fibrosis patients with the missense mutation R334W, a pancreatic insufficiency mutation with variable age of onset and interfamilial clinical differences. *Hum Genet* 95:331-6
- Fan W, Yoon K (2003). In vivo alteration of the keratin 17 gene in hair follicles by oligonucleotide-directed gene targeting. *Exp Dermatol* 12:832-42
- Fanconi G, Uehlinger E, Knauer C (1936). Das coeliakies syndrom be: Angeborener zystischer pankreas fibromatose und bronkiektasien. *Wien Med Wochenschr* 86:753-756
- Farber D (1994). Pancreatic function and disease in early life. *Arch Path* 37:328
- Farrell PM, Kosorok MR, Laxova A, Shen G, Kosciak RE, Bruns WT, Splaingard M, Mischler EH (1997). Nutritional benefits of neonatal screening for cystic fibrosis. Wisconsin Cystic Fibrosis Neonatal Screening Study Group. *N Engl J Med* 337:963-9
- Faruqi AF, Datta HJ, Carroll D, Seidman MM, Glazer PM (2000). Triple-helix formation induces recombination in mammalian cells via a nucleotide excision repair-dependent pathway. *Mol Cell Biol* 20:990-1000
- Felsenfeld G, Rich A (1957). Studies on the formation of two- and three-stranded polyribonucleotides. *Biochim Biophys Acta* 26:457-68

Bibliografía

- Ferrari S, Kitson C, Farley R, Steel R, Marriott C, Parkins DA, Scarpa M, Wainwright B, Evans MJ, Colledge WH, Geddes DM, Alton EW (2001). Mucus altering agents as adjuncts for nonviral gene transfer to airway epithelium. *Gene Ther* 8:1380-6
- Festini F, Taccetti G, Cioni ML, Repetto T, De Martino M (2003). High incidence of cystic fibrosis in children born in Italy to Albanian immigrants. *Thorax* 58:93
- Fischer H, Schwarzer C, Illek B (2004). Vitamin C controls the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channel. *Proc Natl Acad Sci U S A*
- Flotte TR, Afione SA, Conrad C, McGrath SA, Solow R, Oka H, Zeitlin PL, Guggino WB, Carter BJ (1993). Stable in vivo expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator with an adeno-associated virus vector. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:10613-7
- Flotte TR, Zeitlin PL, Reynolds TC, Heald AE, Pedersen P, Beck S, Conrad CK, Brass-Ernst L, Humphries M, Sullivan K, Wetzel R, Taylor G, Carter BJ, Guggino WB (2003). Phase I trial of intranasal and endobronchial administration of a recombinant adeno-associated virus serotype 2 (rAAV2)-CFTR vector in adult cystic fibrosis patients: a two-part clinical study. *Hum Gene Ther* 14:1079-88
- Frangolias DD, Ruan J, Wilcox PJ, Davidson AG, Wong LT, Berthiaume Y, Hennessey R, Freitag A, Pedder L, Corey M, Swezey N, Zielenski J, Tullis E, Sandford AJ (2003). Alpha 1-antitrypsin deficiency alleles in cystic fibrosis lung disease. *Am J Respir Cell Mol Biol* 29:390-6
- Fuchs HJ, Borowitz DS, Christiansen DH, Morris EM, Nash ML, Ramsey BW, Rosenstein BJ, Smith AL, Wohl ME (1994). Effect of aerosolized recombinant human DNase on exacerbations of respiratory symptoms and on pulmonary function in patients with cystic fibrosis. The Pulmozyme Study Group. *N Engl J Med* 331:637-42
- Fuchs JR, Langer JC (1998). Long-term outcome after neonatal meconium obstruction. *Pediatrics* 101:E7
- Gabriel SE, Brigman KN, Koller BH, Boucher RC, Stutts MJ (1994). Cystic fibrosis heterozygote resistance to cholera toxin in the cystic fibrosis mouse model. *Science* 266:107-9
- Gaensler KM, Tu G, Bruch S, Liggitt D, Lipshutz GS, Metkus A, Harrison M, Heath TD, Debs RJ (1999). Fetal gene transfer by transuterine injection of cationic liposome-DNA complexes. *Nat Biotechnol* 17:1188-92
- Gamper HB, Jr., Cole-Strauss A, Metz R, Parekh H, Kumar R, Kmiec EB (2000). A plausible mechanism for gene correction by chimeric oligonucleotides. *Biochemistry* 39:5808-16
- Gamper HB, Parekh H, Rice MC, Bruner M, Youkey H, Kmiec EB (2000). The DNA strand of chimeric RNA/DNA oligonucleotides can direct gene repair/conversion activity in mammalian and plant cell-free extracts. *Nucleic Acids Res* 28:4332-9
- Garred P, Pressler T, Madsen HO, Frederiksen B, Svejgaard A, Hoiby N, Schwartz M, Koch C (1999). Association of mannose-binding lectin gene heterogeneity with severity of lung disease and survival in cystic fibrosis. *J Clin Invest* 104:431-7
- Gartner S et al. (2003). Neonatal screening for cystic fibrosis in Catalunya (Spain). 17th North American CF Conference.
- Gibson LE, Cooke RE (1959). A test for concentration of electrolytes in sweat in cystic fibrosis of the pancreas utilizing pilocarpine by iontophoresis. *Pediatrics* 23:545-9

Bibliografia

- Gill DR, Smyth SE, Goddard CA, Pringle IA, Higgins CF, Colledge WH, Hyde SC (2001). Increased persistence of lung gene expression using plasmids containing the ubiquitin C or elongation factor 1alpha promoter. *Gene Ther* 8:1539-46
- Goldman MJ, Wilson JM (1995). Expression of alpha v beta 5 integrin is necessary for efficient adenovirus-mediated gene transfer in the human airway. *J Virol* 69:5951-8
- Goncz KK, Colosimo A, Dallapiccola B, Gagne L, Hong K, Novelli G, Papahadjopoulos D, Sawa T, Schreier H, Wiener-Kronish J, Xu Z, Gruenert DC (2001). Expression of DeltaF508 CFTR in normal mouse lung after site-specific modification of CFTR sequences by SFHR. *Gene Ther* 8:961-5
- Goncz KK, Kunzelmann K, Xu Z, Gruenert DC (1998). Targeted replacement of normal and mutant CFTR sequences in human airway epithelial cells using DNA fragments. *Hum Mol Genet* 7:1913-9
- Goncz KK, Prokopishyn NL, Chow BL, Davis BR, Gruenert DC (2002). Application of SFHR to gene therapy of monogenic disorders. *Gene Ther* 9:691-4
- Goni JR, de la Cruz X, Orozco M (2004). Triplex-forming oligonucleotide target sequences in the human genome. *Nucleic Acids Res* 32:354-60
- Goss CH, Rubenfeld GD, Otto K, Aitken ML (2003). The effect of pregnancy on survival in women with cystic fibrosis. *Chest* 124:1460-8
- Grabowski PJ, Seiler SR, Sharp PA (1985). A multicomponent complex is involved in the splicing of messenger RNA precursors. *Cell* 42:345-53
- Graham IR, Manzano A, Tagalakis AD, Mohri Z, Sperber G, Hill V, Beattie S, Schepelmann S, Dickson G, Owen JS (2001). Gene repair validation. *Nat Biotechnol* 19:507-8
- Grasemann H, Knauer N, Buscher R, Hubner K, Drazen JM, Ratjen F (2000). Airway nitric oxide levels in cystic fibrosis patients are related to a polymorphism in the neuronal nitric oxide synthase gene. *Am J Respir Crit Care Med* 162:2172-6
- Grasemann H, van's Gravesande KS, Buscher R, Knauer N, Silverman ES, Palmer LJ, Drazen JM, Ratjen F (2003). Endothelial nitric oxide synthase variants in cystic fibrosis lung disease. *Am J Respir Crit Care Med* 167:390-4
- Gregory LG, Harbottle RP, Lawrence L, Knapton HJ, Themis M, Coutelle C (2003). Enhancement of adenovirus-mediated gene transfer to the airways by DEAE dextran and sodium caprate in vivo. *Mol Ther* 7:19-26
- Griffin BA, Adams SR, Tsien RY (1998). Specific covalent labeling of recombinant protein molecules inside live cells. *Science* 281:269-72
- Grossman PD, Bloch W, Brinson E, Chang CC, Eggerding FA, Fung S, Iovannisci DM, Woo S, Winn-Deen ES, Iovannisci DA (1994). High-density multiplex detection of nucleic acid sequences: oligonucleotide ligation assay and sequence-coded separation. *Nucleic Acids Res* 22:4527-34
- Grubb B, Lazarowski E, Knowles M, Boucher R (1993). Isobutylmethylxanthine fails to stimulate chloride secretion in cystic fibrosis airway epithelia. *Am J Respir Cell Mol Biol* 8:454-60
- Gruenert DC, Bruscia E, Novelli G, Colosimo A, Dallapiccola B, Sangiuolo F, Goncz KK (2003). Sequence-specific modification of genomic DNA by small DNA fragments. *J Clin Invest* 112:637-41

Bibliografía

- Gruenert DC, Kunzelmann K, Novelli G, Colosimo A, Kapsa R, Bruscia E (2004). Oligonucleotide-based gene targeting approaches. *Oligonucleotides* 14(2):157-8
- Guay-Broder C, Jacobson KA, Barnoy S, Cabantchik ZI, Guggino WB, Zeitlin PL, Turner RJ, Vergara L, Eidelman O, Pollard HB (1995). A1 receptor antagonist 8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine selectively activates chloride efflux from human epithelial and mouse fibroblast cell lines expressing the cystic fibrosis transmembrane regulator delta F508 mutation. *Biochemistry* 34:9079-87
- Guo H, Karberg M, Long M, Jones JP, 3rd, Sullenger B, Lambowitz AM (2000). Group II introns designed to insert into therapeutically relevant DNA target sites in human cells. *Science* 289:452-7
- Gura T (1999). Repairing the genome's spelling mistakes. *Science* 285:316-8
- Hacein-Bey-Abina S, Von Kalle C, Schmidt M, McCormack MP, Wulffraat N, Leboulch P, Lim A, et al. (2003). LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science* 302:415-9
- Haloun A, Despins P (2003). [Lung and heart-lung transplantation in cystic fibrosis]. *Rev Prat* 53:167-70
- Hamosh A, King TM, Rosenstein BJ, Corey M, Levison H, Durie P, Tsui LC, McIntosh I, Keston M, Brock DJ, et al. (1992). Cystic fibrosis patients bearing both the common missense mutation Gly----Asp at codon 551 and the delta F508 mutation are clinically indistinguishable from delta F508 homozygotes, except for decreased risk of meconium ileus. *Am J Hum Genet* 51:245-50
- Handyside AH, Lesko JG, Tarin JJ, Winston RM, Hughes MR (1992). Birth of a normal girl after in vitro fertilization and preimplantation diagnostic testing for cystic fibrosis. *N Engl J Med* 327:905-9
- Hardin DS, Ellis KJ, Dyson M, Rice J, McConnell R, Seilheimer DK (2001). Growth hormone improves clinical status in prepubertal children with cystic fibrosis: results of a randomized controlled trial. *J Pediatr* 139:636-42
- Harper JC, Wells D, Piyamongkol W, Abou-Sleiman P, Apeessos A, Ioulianos A, Davis M, Doshi A, Serhal P, Ranieri M, Rodeck C, Delhanty JD (2002). Preimplantation genetic diagnosis for single gene disorders: experience with five single gene disorders. *Prenat Diagn* 22:525-33
- Harris A (1997). Towards an ovine model of cystic fibrosis. *Hum Mol Genet* 6:2191-4
- Harvey BG, Leopold PL, Hackett NR, Grasso TM, Williams PM, Tucker AL, Kaner RJ, Ferris B, Gonda I, Sweeney TD, Ramalingam R, Kovesdi I, Shak S, Crystal RG (1999). Airway epithelial CFTR mRNA expression in cystic fibrosis patients after repetitive administration of a recombinant adenovirus. *J Clin Invest* 104:1245-55
- Hasty P, O'Neal WK, Liu KQ, Morris AP, Bebok Z, Shumyatsky GB, Jilling T, Sorscher EJ, Bradley A, Beaudet AL (1995). Severe phenotype in mice with termination mutation in exon 2 of cystic fibrosis gene. *Somat Cell Mol Genet* 21:177-87
- Hatada S, Nikkuni K, Bentley SA, Kirby S, Smithies O (2000). Gene correction in hematopoietic progenitor cells by homologous recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:13807-11
- Havre PA, Kmiec EB (1998). RecA-mediated joint molecule formation between O-methylated RNA/DNA hairpins and single-stranded targets. *Mol Gen Genet* 258:580-6

Bibliografia

- Hergersberg M, Balakrishnan J, Bettecken T, Chevalier-Porst F, Bragger C, Burger R, Einschenk I, Liechti-Gallati S, Morris M, Schorderet D, Thonney F, Moser H, Malik N (1997). A new mutation, 3905insT, accounts for 4.8% of 1173 CF chromosomes in Switzerland and causes a severe phenotype. *Hum Genet* 100:220-3
- Hirata R, Chamberlain J, Dong R, Russell DW (2002). Targeted transgene insertion into human chromosomes by adeno-associated virus vectors. *Nat Biotechnol* 20:735-8
- Hodson ME, Penketh AR, Batten JC (1981). Aerosol carbenicillin and gentamicin treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infection in patients with cystic fibrosis. *Lancet* 2:1137-9
- Holliday KE, Allen JR, Waters DL, Gruca MA, Thompson SM, Gaskin KJ (1991). Growth of human milk-fed and formula-fed infants with cystic fibrosis. *J Pediatr* 118:77-9
- Hong KU, Reynolds SD, Watkins S, Fuchs E, Stripp BR (2004). Basal cells are a multipotent progenitor capable of renewing the bronchial epithelium. *Am J Pathol* 164:577-88
- Howard M, Frizzell RA, Bedwell DM (1996). Aminoglycoside antibiotics restore CFTR function by overcoming premature stop mutations. *Nat Med* 2:467-9
- Hubbard RC, McElvaney NG, Birrer P, Shak S, Robinson WW, Jolley C, Wu M, Chernick MS, Crystal RG (1992). A preliminary study of aerosolized recombinant human deoxyribonuclease I in the treatment of cystic fibrosis. *N Engl J Med* 326:812-5
- Hull J, Thomson AH (1998). Contribution of genetic factors other than CFTR to disease severity in cystic fibrosis. *Thorax* 53:1018-21
- Hyde SC, Emsley P, Hartshorn MJ, Mimmack MM, Gileadi U, Pearce SR, Gallagher MP, Gill DR, Hubbard RE, Higgins CF (1990). Structural model of ATP-binding proteins associated with cystic fibrosis, multidrug resistance and bacterial transport. *Nature* 346:362-5
- Hyde SC, Gill DR, Higgins CF, Trezise AE, MacVinish LJ, Cuthbert AW, Ratcliff R, Evans MJ, Colledge WH (1993). Correction of the ion transport defect in cystic fibrosis transgenic mice by gene therapy. *Nature* 362:250-5
- Igoucheva O, Alexeev V, Pryce M, Yoon K (2003). Transcription affects formation and processing of intermediates in oligonucleotide-mediated gene alteration. *Nucleic Acids Res* 31:2659-70
- Igoucheva O, Alexeev V, Yoon K (2001). Targeted gene correction by small single-stranded oligonucleotides in mammalian cells. *Gene Ther* 8:391-9
- Igoucheva O, Peritz AE, Levy D, Yoon K (1999). A sequence-specific gene correction by an RNA-DNA oligonucleotide in mammalian cells characterized by transfection and nuclear extract using a lacZ shuttle system. *Gene Ther* 6:1960-71
- Illek B, Fischer H, Santos GF, Widdicombe JH, Machen TE, Reenstra WW (1995). cAMP-independent activation of CFTR Cl channels by the tyrosine kinase inhibitor genistein. *Am J Physiol* 268:C886-93
- Illek B, Zhang L, Lewis NC, Moss RB, Dong JY, Fischer H (1999). Defective function of the cystic fibrosis-causing missense mutation G551D is recovered by genistein. *Am J Physiol* 277:C833-9
- Inoue N, Dong R, Hirata RK, Russell DW (2001). Introduction of single base substitutions at homologous chromosomal sequences by adeno-associated virus vectors. *Mol Ther* 3:526-30

Bibliografía

- Inoue N, Hirata RK, Russell DW (1999). High-fidelity correction of mutations at multiple chromosomal positions by adeno-associated virus vectors. *J Virol* 73:7376-80
- Jiricny J (2000). Mediating mismatch repair. *Nat Genet* 24:6-8
- Jorde LB, Lathrop GM (1988). A test of the heterozygote-advantage hypothesis in cystic fibrosis carriers. *Am J Hum Genet* 42:808-15
- Joseph PM, O'Sullivan BP, Lapey A, Dorkin H, Oren J, Balfour R, Perricone MA, Rosenberg M, Wadsworth SC, Smith AE, St George JA, Meeker DP (2001). Aerosol and lobar administration of a recombinant adenovirus to individuals with cystic fibrosis. I. Methods, safety, and clinical implications. *Hum Gene Ther* 12:1369-82
- Kalin N, Claass A, Sommer M, Puchelle E, Tummeler B (1999). DeltaF508 CFTR protein expression in tissues from patients with cystic fibrosis. *J Clin Invest* 103:1379-89
- Kaneda Y (2003). New vector innovation for drug delivery: development of fusigenic non-viral particles. *Curr Drug Targets* 4:599-602
- Kaplan E, Shwachman H, Perlmutter AD, Rule A, Khaw KT, Holsclaw DS (1968). Reproductive failure in males with cystic fibrosis. *N Engl J Med* 279:65-9
- Kapsa R, Quigley A, Lynch GS, Steeper K, Kornberg AJ, Gregorevic P, Austin L, Byrne E (2001). In vivo and in vitro correction of the mdx dystrophin gene nonsense mutation by short-fragment homologous replacement. *Hum Gene Ther* 12:629-42
- Keicher U, Koletzko B, Reinhardt D (1995). Omega-3 fatty acids suppress the enhanced production of 5-lipoxygenase products from polymorph neutrophil granulocytes in cystic fibrosis. *Eur J Clin Invest* 25:915-9
- Kelley TJ, al-Nakkash L, Drumm ML (1995). CFTR-mediated chloride permeability is regulated by type III phosphodiesterases in airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 13:657-64
- Kelley TJ, Thomas K, Milgram LJ, Drumm ML (1997). In vivo activation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator mutant deltaF508 in murine nasal epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:2604-8
- Kelly NM, Fitzgerald MX, Tempany E, O'Boyle C, Falkiner FR, Keane CT (1982). Does pseudomonas cross-infection occur between cystic-fibrosis patients? *Lancet* 2:688-90
- Kent G, Iles R, Bear CE, Huan LJ, Griesenbach U, McKerlie C, Frndova H, Ackerley C, Gosselin D, Radzioch D, O'Brodovich H, Tsui LC, Buchwald M, Tanswell AK (1997). Lung disease in mice with cystic fibrosis. *J Clin Invest* 100:3060-9
- Kere J, Estivill X, Chillon M, Morral N, Nunes V, Norio R, Savilahti E, de la Chapelle A (1994). Cystic fibrosis in a low-incidence population: two major mutations in Finland. *Hum Genet* 93:162-6
- Kerem B, Rommens JM, Buchanan JA, Markiewicz D, Cox TK, Chakravarti A, Buchwald M, Tsui LC (1989). Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science* 245:1073-80
- Kerem E, Corey M, Kerem BS, Rommens J, Markiewicz D, Levison H, Tsui LC, Durie P (1990). The relation between genotype and phenotype in cystic fibrosis--analysis of the most common mutation (delta F508). *N Engl J Med* 323:1517-22
- Kerem E, Kalman YM, Yahav Y, Shoshani T, Abeliovich D, Szeinberg A, Rivlin J, Blau H, Tal A, Ben-Tur L, et al. (1995). Highly variable incidence of cystic fibrosis and different mutation distribution among different Jewish ethnic groups in Israel. *Hum Genet* 96:193-7

Bibliografia

- Kerem E, Reisman J, Corey M, Canny GJ, Levison H (1992). Prediction of mortality in patients with cystic fibrosis. *N Engl J Med* 326:1187-91
- Kiesewetter S, Macek M, Jr., Davis C, Curristin SM, Chu CS, Graham C, Shrimpton AE, Cashman SM, Tsui LC, Mickle J, et al. (1993). A mutation in CFTR produces different phenotypes depending on chromosomal background. *Nat Genet* 5:274-8
- Kmiec EB (1999). Targeted gene repair. *Gene Ther* 6:1-3
- Kmiec EB (2003). Targeted gene repair -- in the arena. *J Clin Invest* 112:632-6
- Kmiec EB, Johnson C, May GD (2001). Chloroplast lysates support directed mutagenesis via modified DNA and chimeric RNA/DNA oligonucleotides. *Plant J* 27:267-74
- Knauert MP, Glazer PM (2001). Triplex forming oligonucleotides: sequence-specific tools for gene targeting. *Hum Mol Genet* 10:2243-51
- Knowles M, Gatzky J, Boucher R (1981). Increased bioelectric potential difference across respiratory epithelia in cystic fibrosis. *N Engl J Med* 305:1489-95
- Knowles MR, Noone PG, Hohneker K, Johnson LG, Boucher RC, Efthimiou J, Crawford C, Brown R, Schwartzbach C, Pearlman R (1998). A double-blind, placebo controlled, dose ranging study to evaluate the safety and biological efficacy of the lipid-DNA complex GR213487B in the nasal epithelium of adult patients with cystic fibrosis. *Hum Gene Ther* 9:249-69
- Kochevenko A, Willmitzer L (2003). Chimeric RNA/DNA oligonucleotide-based site-specific modification of the tobacco acetolactate synthase gene. *Plant Physiol* 132:174-84
- Koller BH, Kim HS, Latour AM, Brigman K, Boucher RC, Jr., Scambler P, Wainwright B, Smithies O (1991). Toward an animal model of cystic fibrosis: targeted interruption of exon 10 of the cystic fibrosis transmembrane regulator gene in embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:10730-4
- Konstan MW (1998). Therapies aimed at airway inflammation in cystic fibrosis. *Clin Chest Med* 19:505-13, vi
- Konstan MW, Byard PJ, Hoppel CL, Davis PB (1995). Effect of high-dose ibuprofen in patients with cystic fibrosis. *N Engl J Med* 332:848-54
- Konstan MW, Davis PB (2002). Pharmacological approaches for the discovery and development of new anti-inflammatory agents for the treatment of cystic fibrosis. *Adv Drug Deliv Rev* 54:1409-23
- Koping-Hoggard M, Tubulekas I, Guan H, Edwards K, Nilsson M, Varum KM, Artursson P (2001). Chitosan as a nonviral gene delivery system. Structure-property relationships and characteristics compared with polyethylenimine in vitro and after lung administration in vivo. *Gene Ther* 8:1108-21
- Kopito LE, Kosasky HJ, Sturgis SH, Lieberman BL, Shwachman H (1973). Water and electrolytes in human cervical mucus. *Fertil Steril* 24:499-506
- Kotani H, Kmiec EB (1994). A role for RNA synthesis in homologous pairing events. *Mol Cell Biol* 14:6097-106
- Kotloff RM, FitzSimmons SC, Fiel SB (1992). Fertility and pregnancy in patients with cystic fibrosis. *Clin Chest Med* 13:623-35

Bibliografía

- Krause DS, Theise ND, Collector MI, Henegariu O, Hwang S, Gardner R, Neutzel S, Sharkis SJ (2001). Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell* 105:369-77
- Krejci L, Damborsky J, Thomsen B, Duno M, Bendixen C (2001). Molecular dissection of interactions between Rad51 and members of the recombination-repair group. *Mol Cell Biol* 21:966-76
- Kren BT, Bandyopadhyay P, Steer CJ (1998). In vivo site-directed mutagenesis of the factor IX gene by chimeric RNA/DNA oligonucleotides. *Nat Med* 4:285-90
- Kren BT, Chen Z, Felsheim R, Roy Chowdhury N, Roy Chowdhury J, Steer CJ (2002). Modification of hepatic genomic DNA using RNA/DNA oligonucleotides. *Gene Ther* 9:686-90
- Kren BT, Cole-Strauss A, Kmiec EB, Steer CJ (1997). Targeted nucleotide exchange in the alkaline phosphatase gene of HUH-7 cells mediated by a chimeric RNA/DNA oligonucleotide. *Hepatology* 25:1462-8
- Kren BT, Parashar B, Bandyopadhyay P, Chowdhury NR, Chowdhury JR, Steer CJ (1999). Correction of the UDP-glucuronosyltransferase gene defect in the gunn rat model of crigler-najjar syndrome type I with a chimeric oligonucleotide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:10349-54
- Kren BT, Wong PY, Steer CJ (2003). Short, single-stranded oligonucleotides mediate targeted nucleotide conversion using extracts from isolated liver mitochondria. *DNA Repair (Amst)* 2:531-46
- Krieg AM (2001). Now I know my CpGs. *Trends Microbiol* 9:249-52
- Krieg AM (2002). CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annu Rev Immunol* 20:709-60
- Kristidis P, Bozon D, Corey M, Markiewicz D, Rommens J, Tsui LC, Durie P (1992). Genetic determination of exocrine pancreatic function in cystic fibrosis. *Am J Hum Genet* 50:1178-84
- Kunzelmann K, Legendre JY, Knoell DL, Escobar LC, Xu Z, Gruenert DC (1996). Gene targeting of CFTR DNA in CF epithelial cells. *Gene Ther* 3:859-67
- Lai L, Park KW, Cheong HT, Kuhholzer B, Samuel M, Bonk A, Im GS, Rieke A, Day BN, Murphy CN, Carter DB, Prather RS (2002). Transgenic pig expressing the enhanced green fluorescent protein produced by nuclear transfer using colchicine-treated fibroblasts as donor cells. *Mol Reprod Dev* 62:300-6
- Lang AB, Rudeberg A, Schoni MH, Que JU, Furer E, Schaad UB, Baumann U, et al. (2004). Vaccination of cystic fibrosis patients against *Pseudomonas aeruginosa* reduces the proportion of patients infected and delays time to infection. Recombinant OprF-OprI as a vaccine against *Pseudomonas aeruginosa* infections. Construction and characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* mucoid exopolysaccharide-alginate conjugate vaccine. Immunogenicity of a new purified fusion protein vaccine to respiratory syncytial virus: a multi-center trial in children with cystic fibrosis. Influenza vaccination coverage level at a cystic fibrosis center. Dual-function vaccine for *Pseudomonas aeruginosa*: characterization of chimeric exotoxin A-pilin protein. Safety and immunogenicity of an intranasal *Pseudomonas aeruginosa* hybrid outer membrane protein F-I vaccine in human volunteers. Vaccines for preventing infection with *Pseudomonas aeruginosa* in people with cystic fibrosis.

Bibliografia

- Vaccinations against *Pseudomonas aeruginosa*: active and passive alternatives. *Pediatr Infect Dis J* 23:504-10
- Larson JE, Morrow SL, Delcarpio JB, Bohm RP, Ratterree MS, Blanchard JL, Cohen JC (2000). Gene transfer into the fetal primate: evidence for the secretion of transgene product. *Mol Ther* 2:631-9
- Larson JE, Morrow SL, Happel L, Sharp JF, Cohen JC (1997). Reversal of cystic fibrosis phenotype in mice by gene therapy in utero. *Lancet* 349:619-20
- Lazaro-Carrasco MT, Morales P, Ferreiro MJ, Borro JM, Varela A, Vicente R, Ramos F, Estada JA (1999). [Lung transplantation in cystic fibrosis. The results of the Clinica Puerta de Hierro (Madrid) and the Hospital La Fe (Valencia)]. *Rev Clin Esp* 199:280-4
- Lewin AS, Hauswirth WW (2001). Ribozyme gene therapy: applications for molecular medicine. *Trends Mol Med* 7:221-8
- Li Z, Engelhardt JF (2003). Progress toward generating a ferret model of cystic fibrosis by somatic cell nuclear transfer. *Reprod Biol Endocrinol* 1:83
- Liang L, Liu DP, Liang CC (2002). Optimizing the delivery systems of chimeric RNA/DNA oligonucleotides. *Eur J Biochem* 269:5753-8
- Limberis M, Anson DS, Fuller M, Parsons DW (2002). Recovery of airway cystic fibrosis transmembrane conductance regulator function in mice with cystic fibrosis after single-dose lentivirus-mediated gene transfer. *Hum Gene Ther* 13:1961-70
- Lissens W, Mercier B, Tournaye H, Bonduelle M, Ferec C, Seneca S, Devroey P, Silber S, Van Steirteghem A, Liebaers I (1996). Cystic fibrosis and infertility caused by congenital bilateral absence of the vas deferens and related clinical entities. *Hum Reprod* 11 Suppl 4:55-78; discussion 79-80
- Littlewood JM (1992). Gastrointestinal complications in cystic fibrosis. *J R Soc Med* 85 Suppl 19:13-9
- Liu H, Agarwal S, Kmiec E, Davis BR (2002). Targeted beta-globin gene conversion in human hematopoietic CD34(+) and Lin(-)CD38(-) cells. *Gene Ther* 9:118-26
- Liu L, Cheng S, van Brabant AJ, Kmiec EB (2002a). Rad51p and Rad54p, but not Rad52p, elevate gene repair in *Saccharomyces cerevisiae* directed by modified single-stranded oligonucleotide vectors. *Nucleic Acids Res* 30:2742-50
- Liu L, Parekh-Olmedo H, Kmiec EB (2003). The development and regulation of gene repair. *Nat Rev Genet* 4:679-89
- Liu L, Rice MC, Drury M, Cheng S, Gamper H, Kmiec EB (2002b). Strand bias in targeted gene repair is influenced by transcriptional activity. *Mol Cell Biol* 22:3852-63
- Liu L, Rice MC, Kmiec EB (2001). In vivo gene repair of point and frameshift mutations directed by chimeric RNA/DNA oligonucleotides and modified single-stranded oligonucleotides. *Nucleic Acids Res* 29:4238-50
- Liu X, Jiang Q, Mansfield SG, Puttaraju M, Zhang Y, Zhou W, Cohn JA, Garcia-Blanco MA, Mitchell LG, Engelhardt JF (2002). Partial correction of endogenous DeltaF508 CFTR in human cystic fibrosis airway epithelia by spliceosome-mediated RNA trans-splicing. *Nat Biotechnol* 20:47-52

Bibliografía

- Liu X, Yan Z, Luo M, Zak R, Li Z, Driskell RR, Huang Y, Tran N, Engelhardt JF (2004). Targeted Correction of Single-Base-Pair Mutations with Adeno-Associated Virus Vectors under Nonselective Conditions. *J Virol* 78:4165-75
- Lu IL, Lin CY, Lin SB, Chen ST, Yeh LY, Yang FY, Au LC (2003). Correction/mutation of acid alpha-D-glucosidase gene by modified single-stranded oligonucleotides: in vitro and in vivo studies. *Gene Ther* 10:1910-6
- Lu QL, Mann CJ, Lou F, Bou-Gharios G, Morris GE, Xue SA, Fletcher S, Partridge TA, Wilton SD (2003). Functional amounts of dystrophin produced by skipping the mutated exon in the mdx dystrophic mouse. *Nat Med* 9:1009-14
- Macek M Jr. et al. (2001). Activities of the National CF Center in Prague: integrated care for CF patients in the Czech Republic. *CF European Network*, newsletter 5)
- Macklin CC (1954). The pulmonary alveolar mucoid film and the pneumonocytes. *Lancet* 266:1099-1104
- Majumdar A, Khorlin A, Dyatkina N, Lin FL, Powell J, Liu J, Fei Z, Khripine Y, Watanabe KA, George J, Glazer PM, Seidman MM (1998). Targeted gene knockout mediated by triple helix forming oligonucleotides. *Nat Genet* 20:212-4
- Mall M, Grubb BR, Harkema JR, O'Neal WK, Boucher RC (2004). Increased airway epithelial Na(+) absorption produces cystic fibrosis-like lung disease in mice. *Nat Med*
- Mansfield SG, Kole J, Puttaraju M, Yang CC, Garcia-Blanco MA, Cohn JA, Mitchell LG (2000). Repair of CFTR mRNA by spliceosome-mediated RNA trans-splicing. *Gene Ther* 7:1885-95
- Manzano A, Mohri Z, Sperber G, Ogris M, Graham I, Dickson G, Owen JS (2003). Failure to generate atheroprotective apolipoprotein AI phenotypes using synthetic RNA/DNA oligonucleotides (chimeraplasts). *J Gene Med* 5:795-802
- Mason RJ, Williams MC, Moses HL, Mohla S, Berberich MA (1997). Stem cells in lung development, disease, and therapy. *Am J Respir Cell Mol Biol* 16:355-63
- Maurisse R, Feugeas JP, Biet E, Kuzniak I, Leboulch P, Dutreix M, Sun JS (2002). A new method (GOREC) for directed mutagenesis and gene repair by homologous recombination. *Gene Ther* 9:703-7
- McCarty NA, Standaert TA, Teresi M, Tuthill C, Launspach J, Kelley TJ, Milgram LJ, Hilliard KA, Regelman WE, Weatherly MR, Aitken ML, Konstan MW, Ahrens RC (2002). A phase I randomized, multicenter trial of CPX in adult subjects with mild cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 33:90-8
- McCreath KJ, Howcroft J, Campbell KH, Colman A, Schnieke AE, Kind AJ (2000). Production of gene-targeted sheep by nuclear transfer from cultured somatic cells. *Nature* 405:1066-9
- McDonald RJ, Lukason MJ, Raabe OG, Canfield DR, Burr EA, Kaplan JM, Wadsworth SC, St George JA (1997). Safety of airway gene transfer with Ad2/CFTR2: aerosol administration in the nonhuman primate. *Hum Gene Ther* 8:411-22
- McGann KA, Collman R, Kolson DL, Gonzalez-Scarano F, Coukos G, Coutifaris C, Strauss JF, Nathanson N (1994). Human immunodeficiency virus type 1 causes productive infection of macrophages in primary placental cell cultures. *J Infect Dis* 169:746-53

Bibliografia

- Meacham GC, Patterson C, Zhang W, Younger JM, Cyr DM (2001). The Hsc70 co-chaperone CHIP targets immature CFTR for proteasomal degradation. *Nat Cell Biol* 3:100-5
- Meindl RS (1987). Hypothesis: a selective advantage for cystic fibrosis heterozygotes. *Am J Phys Anthropol* 74:39-45
- Mercier B, Verlingue C, Lissens W, Silber SJ, Novelli G, Bonduelle M, Audrezet MP, Ferec C (1995). Is congenital bilateral absence of vas deferens a primary form of cystic fibrosis? Analyses of the CFTR gene in 67 patients. *Am J Hum Genet* 56:272-7
- Merlo CA, Boyle MP (2003). Modifier genes in cystic fibrosis lung disease. *J Lab Clin Med* 141:237-41
- Micklefield J (2001). Backbone modification of nucleic acids: synthesis, structure and therapeutic applications. *Curr Med Chem* 8:1157-79
- Miller PW, Hamosh A, Macek M, Jr., Greenberger PA, MacLean J, Walden SM, Slavin RG, Cutting GR (1996). Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene mutations in allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Am J Hum Genet* 59:45-51
- Moerschell RP, Tsunasawa S, Sherman F (1988). Transformation of yeast with synthetic oligonucleotides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:524-8
- Montrose-Rafizadeh C, Kole J, Bartkowski LM, Lee LH, Blackmon DL, Behnken SE, Gearhart JD, Cohn JA, Montrose MH (1997). Gene targeting of a CFTR allele in HT29 human epithelial cells. *J Cell Physiol* 170:299-308
- Moran A, Doherty L, Wang X, Thomas W (1998). Abnormal glucose metabolism in cystic fibrosis. *J Pediatr* 133:10-17
- Morgan AR, Wells RD (1968). Specificity of the three-stranded complex formation between double-stranded DNA and single-stranded RNA containing repeating nucleotide sequences. *J Mol Biol* 37:63-80
- Morral N, Bertranpetit J, Estivill X, Nunes V, Casals T, Gimenez J, Reis A, Varon-Mateeva R, Macek M, Jr., Kalaydjieva L, et al. (1994). The origin of the major cystic fibrosis mutation (delta F508) in European populations. *Nat Genet* 7:169-75
- Morral N, Nunes V, Casals T, Chillon M, Gimenez J, Bertranpetit J, Estivill X (1993). Microsatellite haplotypes for cystic fibrosis: mutation frameworks and evolutionary tracers. *Hum Mol Genet* 2:1015-22
- Morral N, Nunes V, Casals T, Estivill X (1991). CA/GT microsatellite alleles within the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene are not generated by unequal crossingover. *Genomics* 10:692-8
- Morrow SL, Larson JE, Nelson S, Sekhon HS, Ren T, Cohen JC (1998). Modification of development by the CFTR gene in utero. *Mol Genet Metab* 65:203-12
- Moser HE, Dervan PB (1987). Sequence-specific cleavage of double helical DNA by triple helix formation. *Science* 238:645-50
- Moss RB, Rodman D, Spencer LT, Aitken ML, Zeitlin PL, Waltz D, Milla C, Brody AS, Clancy JP, Ramsey B, Hamblett N, Heald AE (2004). Repeated adeno-associated virus serotype 2 aerosol-mediated cystic fibrosis transmembrane regulator gene transfer to the lungs of patients with cystic fibrosis: a multicenter, double-blind, placebo-controlled trial. *Chest* 125:509-21

Bibliografía

- Moutou C, Ohl J, Wittemer C, Nisand I, Gerlinger P, Viville S (2001). [Twin birth after preimplantation diagnosis for cystic fibrosis]. *Gynecol Obstet Fertil* 29:668-72
- Muller F, Dommergues M, Simon-Bouy B, Ferec C, Oury JF, Aubry MC, Bessis R, Vuillard E, Denamur E, Biennu T, Serre JL (1998). Cystic fibrosis screening: a fetus with hyperechogenic bowel may be the index case. *J Med Genet* 35:657-60
- Murphy WJ, Watkins KP, Agabian N (1986). Identification of a novel Y branch structure as an intermediate in trypanosome mRNA processing: evidence for trans splicing. *Cell* 47:517-25
- Nakamura M, Ando Y, Nagahara S, Sano A, Ochiya T, Maeda S, Kawaji T, Ogawa M, Hirata A, Terazaki H, Haraoka K, Tanihara H, Ueda M, Uchino M, Yamamura K (2004). Targeted conversion of the transthyretin gene in vitro and in vivo. *Gene Ther* 11:838-46
- Nickerson HD, Colledge WH (2003). A comparison of gene repair strategies in cell culture using a lacZ reporter system. *Gene Ther* 10:1584-91
- Nickerson HD, Colledge WH (2004). A LacZ-based transgenic mouse for detection of somatic gene repair events in vivo. *Gene Ther* 11:1351-7
- Nousia-Arvanitakis S, Fotoulaki M, Economou H, Xefteri M, Galli-Tsinopoulou A (2001). Long-term prospective study of the effect of ursodeoxycholic acid on cystic fibrosis-related liver disease. *J Clin Gastroenterol* 32:324-8
- Okuzaki A, Toriyama K (2003). Chimeric RNA/DNA oligonucleotide-directed gene targeting in rice. *Plant Cell Rep*
- Orita M, Suzuki Y, Sekiya T, Hayashi K (1989). Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics* 5:874-9
- Osborne L, Santis G, Schwarz M, Klinger K, Dork T, McIntosh I, Schwartz M, Nunes V, Macek M, Jr., Reiss J, et al. (1992). Incidence and expression of the N1303K mutation of the cystic fibrosis (CFTR) gene. *Hum Genet* 89:653-8
- Ostrowski LE, Hutchins JR, Zakel K, O'Neal WK (2003). Targeting expression of a transgene to the airway surface epithelium using a ciliated cell-specific promoter. *Mol Ther* 8:637-45
- Palmer E, Wilhelm JM (1978). Mistranslation in a eucaryotic organism. *Cell* 13:329-34
- Palmer E, Wilhelm JM, Sherman F (1979). Phenotypic suppression of nonsense mutants in yeast by aminoglycoside antibiotics. *Nature* 277:148-50
- Parekh-Olmedo H, Drury M, Kmiec EB (2002). Targeted nucleotide exchange in *Saccharomyces cerevisiae* directed by short oligonucleotides containing locked nucleic acids. *Chem Biol* 9:1073-84
- Parmley RR, Gendler SJ (1998). Cystic fibrosis mice lacking Muc1 have reduced amounts of intestinal mucus. *J Clin Invest* 102:1798-806
- Pasyk EA, Foskett JK (1995). Mutant (delta F508) cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl⁻ channel is functional when retained in endoplasmic reticulum of mammalian cells. *J Biol Chem* 270:12347-50
- Patrizio P, Asch RH, Handelin B, Silber SJ (1993). Aetiology of congenital absence of vas deferens: genetic study of three generations. *Hum Reprod* 8:215-20
- Peebles D, Gregory LG, David A, Themis M, Waddington SN, Knapton HJ, Miah M, Cook T, Lawrence L, Nivsarkar M, Rodeck C, Coutelle C (2004). Widespread and efficient marker gene

Bibliografia

- expression in the airway epithelia of fetal sheep after minimally invasive tracheal application of recombinant adenovirus in utero. *Gene Ther* 11:70-8
- Phelps CJ, Koike C, Vaught TD, Boone J, Wells KD, Chen SH, Ball S, Specht SM, Polejaeva IA, Monahan JA, Jobst PM, Sharma SB, Lamborn AE, Garst AS, Moore M, Demetris AJ, Rudert WA, Bottino R, Bertera S, Trucco M, Starzl TE, Dai Y, Ayares DL (2003). Production of alpha 1,3-galactosyltransferase-deficient pigs. *Science* 299:411-4
- Pier GB, Grout M, Zaidi T, Meluleni G, Mueschenborn SS, Banting G, Ratcliff R, Evans MJ, Colledge WH (1998). Salmonella typhi uses CFTR to enter intestinal epithelial cells. *Nature* 393:79-82
- Pierce EA, Liu Q, Igoucheva O, Omarrudin R, Ma H, Diamond SL, Yoon K (2003). Oligonucleotide-directed single-base DNA alterations in mouse embryonic stem cells. *Gene Ther* 10:24-33
- Pitt BR, Schwarz MA, Pilewski JM, Nakayama D, Mueller GM, Robbins PD, Watkins SA, Albertine KH, Bland RD (1995). Retrovirus-mediated gene transfer in lungs of living fetal sheep. *Gene Ther* 2:344-50
- Porada CD, Park P, Almeida-Porada G, Zanjani ED (2004). The sheep model of in utero gene therapy. *Fetal Diagn Ther* 19:23-30
- Porada CD, Tran N, Eglitis M, Moen RC, Troutman L, Flake AW, Zhao Y, Anderson WF, Zanjani ED (1998). In utero gene therapy: transfer and long-term expression of the bacterial neo(r) gene in sheep after direct injection of retroviral vectors into preimmune fetuses. *Hum Gene Ther* 9:1571-85
- Porteous DJ, Dorin JR, McLachlan G, Davidson-Smith H, Davidson H, Stevenson BJ, Carothers AD, Wallace WA, Moralee S, Hoenes C, Kallmeyer G, Michaelis U, Naujoks K, Ho LP, Samways JM, Imrie M, Greening AP, Innes JA (1997). Evidence for safety and efficacy of DOTAP cationic liposome mediated CFTR gene transfer to the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis. *Gene Ther* 4:210-8
- Puchelle E, Peault B (2000). Human airway xenograft models of epithelial cell regeneration. *Respir Res* 1:125-8
- Puttaraju M, DiPasquale J, Baker CC, Mitchell LG, Garcia-Blanco MA (2001). Messenger RNA repair and restoration of protein function by spliceosome-mediated RNA trans-splicing. *Mol Ther* 4:105-14
- Puttaraju M, Jamison SF, Mansfield SG, Garcia-Blanco MA, Mitchell LG (1999). Spliceosome-mediated RNA trans-splicing as a tool for gene therapy. *Nat Biotechnol* 17:246-52
- Quinton PM (1983). Chloride impermeability in cystic fibrosis. *Nature* 301:421-2
- Quinton PM, Bijman J (1983). Higher bioelectric potentials due to decreased chloride absorption in the sweat glands of patients with cystic fibrosis. *N Engl J Med* 308:1185-9
- Ramsey BW, Farrell PM, Pencharz P (1992). Nutritional assessment and management in cystic fibrosis: a consensus report. The Consensus Committee. *Am J Clin Nutr* 55:108-16
- Randak C, Auerswald EA, Assfalg-Machleidt I, Reenstra WW, Machleidt W (1999). Inhibition of ATPase, GTPase and adenylate kinase activities of the second nucleotide-binding fold of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator by genistein. *Biochem J* 340 (Pt 1):227-35

Bibliografía

- Rando TA, Disatnik MH, Zhou LZ (2000). Rescue of dystrophin expression in mdx mouse muscle by RNA/DNA oligonucleotides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:5363-8
- Ranieri E, Lewis BD, Gerace RL, Ryall RG, Morris CP, Nelson PV, Carey WF, Robertson EF (1994). Neonatal screening for cystic fibrosis using immunoreactive trypsinogen and direct gene analysis: four years' experience. *Bmj* 308:1469-72
- Ratcliff R, Evans MJ, Cuthbert AW, MacVinish LJ, Foster D, Anderson JR, Colledge WH (1993). Production of a severe cystic fibrosis mutation in mice by gene targeting. *Nat Genet* 4:35-41
- Ratcliff R, Evans MJ, Doran J, Wainwright BJ, Williamson R, Colledge WH (1992). Disruption of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene in embryonic stem cells by gene targeting. *Transgenic Res* 1:177-81
- Reardon MC, Hammond KB, Accurso FJ, Fisher CD, McCabe ER, Cotton EK, Bowman CM (1984). Nutritional deficits exist before 2 months of age in some infants with cystic fibrosis identified by screening test. *J Pediatr* 105:271-4
- Reenstra WW, Yurko-Mauro K, Dam A, Raman S, Shorten S (1996). CFTR chloride channel activation by genistein: the role of serine/threonine protein phosphatases. *Am J Physiol* 271:C650-7
- Regelmann WE, Skubitz KM, Herron JM (1991). Increased monocyte oxidase activity in cystic fibrosis heterozygotes and homozygotes. *Am J Respir Cell Mol Biol* 5:27-33
- Reynolds SD, Giangreco A, Power JH, Stripp BR (2000). Neuroepithelial bodies of pulmonary airways serve as a reservoir of progenitor cells capable of epithelial regeneration. *Am J Pathol* 156:269-78
- Rice KP, Egglar AL, Sung P, Cox MM (2001). DNA pairing and strand exchange by the Escherichia coli RecA and yeast Rad51 proteins without ATP hydrolysis: on the importance of not getting stuck. *J Biol Chem* 276:38570-81
- Rice MC, Bruner M, Czymmek K, Kmiec EB (2001a). In vitro and in vivo nucleotide exchange directed by chimeric RNA/DNA oligonucleotides in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* 40:857-68
- Rice MC, Czymmek K, Kmiec EB (2001b). The potential of nucleic acid repair in functional genomics. *Nat Biotechnol* 19:321-6
- Rice MC, May GD, Kipp PB, Parekh H, Kmiec EB (2000). Genetic repair of mutations in plant cell-free extracts directed by specific chimeric oligonucleotides. *Plant Physiol* 123:427-38
- Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Zielenski J, Lok S, Plavsic N, Chou JL, et al. (1989). Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 245:1066-73
- Rogers CS, Vanoye CG, Sullenger BA, George AL, Jr. (2002). Functional repair of a mutant chloride channel using a trans-splicing ribozyme. *J Clin Invest* 110:1783-9
- Romeo G, Devoto M, Galietta LJ (1989). Why is the cystic fibrosis gene so frequent? *Hum Genet* 84:1-5
- Rommens JM, Iannuzzi MC, Kerem B, Drumm ML, Melmer G, Dean M, Rozmahel R, Cole JL, Kennedy D, Hidaka N, et al. (1989). Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science* 245:1059-65
- Rosenstein BJ, Cutting GR (1998). The diagnosis of cystic fibrosis: a consensus statement. Cystic Fibrosis Foundation Consensus Panel. *J Pediatr* 132:589-95

Bibliografia

- Rozmahel R, Wilschanski M, Matin A, Plyte S, Oliver M, Auerbach W, Moore A, Forstner J, Durie P, Nadeau J, Bear C, Tsui LC (1996). Modulation of disease severity in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator deficient mice by a secondary genetic factor. *Nat Genet* 12:280-7
- Rubenstein RC, Lyons BM (2001). Sodium 4-phenylbutyrate downregulates HSC70 expression by facilitating mRNA degradation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 281:L43-51
- Rubenstein RC, Zeitlin PL (1998). A pilot clinical trial of oral sodium 4-phenylbutyrate (Buphenyl) in deltaF508-homozygous cystic fibrosis patients: partial restoration of nasal epithelial CFTR function. *Am J Respir Crit Care Med* 157:484-90
- Rubenstein RC, Zeitlin PL (2000). Sodium 4-phenylbutyrate downregulates Hsc70: implications for intracellular trafficking of DeltaF508-CFTR. *Am J Physiol Cell Physiol* 278:C259-67
- Ruiter R, Van Den Brande I, Stals E, Delaure S, Cornelissen M, D'Halluin K (2003). Spontaneous mutation frequency in plants obscures the effect of chimeraplasty. *Plant Mol Biol* 53:715-29
- Ruiz FE, Clancy JP, Perricone MA, Bebok Z, Hong JS, Cheng SH, Meeker DP, Young KR, Schoumacher RA, Weatherly MR, Wing L, Morris JE, Sindel L, Rosenberg M, van Ginkel FW, McGhee JR, Kelly D, Lyrene RK, Sorscher EJ (2001). A clinical inflammatory syndrome attributable to aerosolized lipid-DNA administration in cystic fibrosis. *Hum Gene Ther* 12:751-61
- Russell DW, Hirata RK (1998). Human gene targeting by viral vectors. *Nat Genet* 18:325-30
- Russell DW, Hirata RK, Inoue N (2002). Validation of AAV-mediated gene targeting. *Nat Biotechnol* 20:658
- Ruusala T, Kurland CG (1984). Streptomycin preferentially perturbs ribosomal proofreading. *Mol Gen Genet* 198:100-4
- Salvatore F, Scudiero O, Castaldo G (2002). Genotype-phenotype correlation in cystic fibrosis: the role of modifier genes. *Am J Med Genet* 111:88-95
- Sanguiuolo F, Bruscia E, Serafino A, Nardone AM, Bonifazi E, Lais M, Gruenert DC, Novelli G (2002). In vitro correction of cystic fibrosis epithelial cell lines by small fragment homologous replacement (SFHR) technique. *BMC Med Genet* 3:8
- Santana E, Peritz AE, Iyer S, Uitto J, Yoon K (1998). Different frequency of gene targeting events by the RNA-DNA oligonucleotide among epithelial cells. *J Invest Dermatol* 111:1172-7
- Sato S, Ward CL, Krouse ME, Wine JJ, Kopito RR (1996). Glycerol reverses the misfolding phenotype of the most common cystic fibrosis mutation. *J Biol Chem* 271:635-8
- Scaria A, St George JA, Jiang C, Kaplan JM, Wadsworth SC, Gregory RJ (1998). Adenovirus-mediated persistent cystic fibrosis transmembrane conductance regulator expression in mouse airway epithelium. *J Virol* 72:7302-9
- Schiavi SC, Abdelkader N, Reber S, Pennington S, Narayana R, McPherson JM, Smith AE, Hoppe Ht, Cheng SH (1996). Biosynthetic and growth abnormalities are associated with high-level expression of CFTR in heterologous cells. *Am J Physiol* 270:C341-51
- Schneider H, Coutelle C (1999). In utero gene therapy: the case for. *Nat Med* 5:256-7

Bibliografía

- Schnieke AE, Kind AJ, Ritchie WA, Mycock K, Scott AR, Ritchie M, Wilmut I, Colman A, Campbell KH (1997). Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts. *Science* 278:2130-3
- Schultz BD, Frizzell RA, Bridges RJ (1999). Rescue of dysfunctional deltaF508-CFTR chloride channel activity by IBMX. *J Membr Biol* 170:51-66
- Schwarz MJ, Malone GM, Haworth A, Cheadle JP, Meredith AL, Gardner A, Sawyer IH, Connarty M, Dennis N, Seller A, et al. (1995). Cystic fibrosis mutation analysis: report from 22 U.K. regional genetics laboratories. *Hum Mutat* 6:326-33
- Seibel P, Trappe J, Villani G, Klopstock T, Papa S, Reichmann H (1995). Transfection of mitochondria: strategy towards a gene therapy of mitochondrial DNA diseases. *Nucleic Acids Res* 23:10-7
- Seidman MM, Glazer PM (2004). Setting standards in gene repair. *Oligonucleotides* 14(2):79
- Sekhon HS, Larson JE (1995). In utero gene transfer into the pulmonary epithelium. *Nat Med* 1:1201-3
- Shak S, Capon DJ, Hellmiss R, Marsters SA, Baker CL (1990). Recombinant human DNase I reduces the viscosity of cystic fibrosis sputum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:9188-92
- Sheppard DN, Rich DP, Ostedgaard LS, Gregory RJ, Smith AE, Welsh MJ (1993). Mutations in CFTR associated with mild-disease-form Cl⁻ channels with altered pore properties. *Nature* 362:160-4
- Silber SJ, Nagy ZP, Liu J, Godoy H, Devroey P, Van Steirteghem AC (1994). Conventional in-vitro fertilization versus intracytoplasmic sperm injection for patients requiring microsurgical sperm aspiration. *Hum Reprod* 9:1705-9
- Slomski R, Schloesser M, Berg LP, Wagner M, Kakkar VV, Cooper DN, Reiss J (1992). Omission of exon 12 in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene transcripts. *Hum Genet* 89:615-9
- Smith SN, Middleton PG, Chadwick S, Jaffe A, Bush KA, Rolleston S, Farley R, Delaney SJ, Wainwright B, Geddes DM, Alton EW (1999). The in vivo effects of milrinone on the airways of cystic fibrosis mice and human subjects. *Am J Respir Cell Mol Biol* 20:129-34
- Smithies O, Gregg RG, Boggs SS, Koralewski MA, Kucherlapati RS (1985). Insertion of DNA sequences into the human chromosomal beta-globin locus by homologous recombination. *Nature* 317:230-4
- Snouwaert JN, Brigman KK, Latour AM, Malouf NN, Boucher RC, Smithies O, Koller BH (1992). An animal model for cystic fibrosis made by gene targeting. *Science* 257:1083-8
- Srivastava M, Eidelman O, Zhang J, Paweletz C, Caohuy H, Yang Q, Jacobson KA, Heldman E, Huang W, Jozwik C, Pollard BS, Pollard HB (2004). Digitoxin mimics gene therapy with CFTR and suppresses hypersecretion of IL-8 from cystic fibrosis lung epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:7693-8
- Starnes VA, Bowdish ME, Woo MS, Barbers RG, Schenkel FA, Horn MV, Pessotto R, Sievers EM, Baker CJ, Cohen RG, Bremner RM, Wells WJ, Barr ML (2004). A decade of living lobar lung transplantation: recipient outcomes. *J Thorac Cardiovasc Surg* 127:114-22
- Stasiak A, West SC, Egelman EH (1997). Sickle cell anemia research and a recombinant DNA technique. *Science* 277:460-2
- Strauss M (1998). The site-specific correction of genetic defects. *Nat Med* 4:274-5

Bibliografia

- Strickland E, Qu BH, Millen L, Thomas PJ (1997). The molecular chaperone Hsc70 assists the in vitro folding of the N-terminal nucleotide-binding domain of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J Biol Chem* 272:25421-4
- Sullenger BA, Cech TR (1994). Ribozyme-mediated repair of defective mRNA by targeted, trans-splicing. *Nature* 371:619-22
- Suratt BT, Cool CD, Serls AE, Chen L, Varella-Garcia M, Shpall EJ, Brown KK, Worthen GS (2003). Human pulmonary chimerism after hematopoietic stem cell transplantation. *Am J Respir Crit Care Med* 168:318-22
- Sutton RE, Boothroyd JC (1986). Evidence for trans splicing in trypanosomes. *Cell* 47:527-35
- Suzuki T, Murai A, Muramatsu T (2003). Low-dose bleomycin induces targeted gene repair frequency in cultured melan-c cells using chimeric RNA/DNA oligonucleotide transfection. *Int J Mol Med* 12:109-14
- Sweet SC (2003). Pediatric lung transplantation: update 2003. *Pediatr Clin North Am* 50:1393-417, ix
- Tagalakis AD, Graham IR, Riddell DR, Dickson JG, Owen JS (2001). Gene correction of the apolipoprotein (Apo) E2 phenotype to wild-type ApoE3 by in situ chimeraplasty. *J Biol Chem* 276:13226-30
- Tan A, Bhalla P, Smyth R (2000). Vaccines for preventing influenza in people with cystic fibrosis. *Cochrane Database Syst Rev*:CD001753
- Tarantal AF, Lee CI, Ekert JE, McDonald R, Kohn DB, Plopper CG, Case SS, Bunnell BA, O'Rourke JP, Newbound GC, Li J, Baskin CR (2001a). Lentiviral vector gene transfer into fetal rhesus monkeys (*Macaca mulatta*): lung-targeting approaches. *Mol Ther* 4:614-21
- Tarantal AF, O'Rourke JP, Case SS, Newbound GC, Li J, Lee CI, Baskin CR, Kohn DB, Bunnell BA (2001b). Rhesus monkey model for fetal gene transfer: studies with retroviral- based vector systems. *Mol Ther* 3:128-38
- Taubes G (2002). Gene therapy. The strange case of chimeraplasty. *Science* 298:2116-20
- Taylor JK, Zhang QQ, Wyatt JR, Dean NM (1999). Induction of endogenous Bcl-xS through the control of Bcl-x pre-mRNA splicing by antisense oligonucleotides. *Nat Biotechnol* 17:1097-100
- Terunuma A, Ye J, Emmert S, Khan SG, Kraemer KH, Vogel JC (2004). Ultraviolet light selection assay to optimize oligonucleotide correction of mutations in endogenous xeroderma pigmentosum genes. *Gene Ther*
- Texereau J, Marullo S, Hubert D, Coste J, Dusser DJ, Dall'Ava-Santucci J, Dinh-Xuan AT (2004). Nitric oxide synthase 1 as a potential modifier gene of decline in lung function in patients with cystic fibrosis. *Thorax* 59:156-8
- Thomas KR, Capecchi MR (1997). Recombinant DNA technique and sickle cell anemia research. *Science* 275:1404-5
- Thomson MA, Quirk P, Swanson CE, Thomas BJ, Holt TL, Francis PJ, Shepherd RW (1995). Nutritional growth retardation is associated with defective lung growth in cystic fibrosis: a preventable determinant of progressive pulmonary dysfunction. *Nutrition* 11:350-4
- Thorpe P, Stevenson BJ, Porteous DJ (2002). Optimising gene repair strategies in cell culture. *Gene Ther* 9:700-2

Bibliografía

- Thorpe PH, Stevenson BJ, Porteous DJ (2002). Functional correction of episomal mutations with short DNA fragments and RNA-DNA oligonucleotides. *J Gene Med* 4:195-204
- Touw DJ, Brimicombe RW, Hodson ME, Heijerman HG, Bakker W (1995). Inhalation of antibiotics in cystic fibrosis. *Eur Respir J* 8:1594-604
- Tran ND, Liu X, Yan Z, Abbote D, Jiang Q, Kmiec EB, Sigmund CD, Engelhardt JF (2003). Efficiency of chimeraplast gene targeting by direct nuclear injection using a GFP recovery assay. *Mol Ther* 7:248-53
- Tsui LC, Buchwald M, Barker D, Braman JC, Knowlton R, Schumm JW, Eiberg H, et al. (1985). Cystic fibrosis locus defined by a genetically linked polymorphic DNA marker. *Science* 230:1054-7
- Tsukamoto M, Ochiya T, Yoshida S, Sugimura T, Terada M (1995). Gene transfer and expression in progeny after intravenous DNA injection into pregnant mice. *Nat Genet* 9:243-8
- Vacanti MP, Roy A, Cortiella J, Bonassar L, Vacanti CA (2001). Identification and initial characterization of spore-like cells in adult mammals. *J Cell Biochem* 80:455-60
- van Brabant AJ, Williams JK, Parekh-Olmedo H, Kmiec EB (2004). Gene editing of a human gene in yeast artificial chromosomes using modified single-stranded DNA and dual targeting. *Pharmacogenomics J* 4:175-83
- van der Steege G, Schuilenga-Hut PH, Buys CH, Scheffer H, Pas HH, Jonkman MF (2001). Persistent failures in gene repair. *Nat Biotechnol* 19:305-6
- Vasquez KM, Narayanan L, Glazer PM (2000). Specific mutations induced by triplex-forming oligonucleotides in mice. *Science* 290:530-3
- Vincent MC, Trapnell BC, Baughman RP, Wert SE, Whitsett JA, Iwamoto HS (1995). Adenovirus-mediated gene transfer to the respiratory tract of fetal sheep in utero. *Hum Gene Ther* 6:1019-28
- Wagner JA, Nepomuceno IB, Messner AH, Moran ML, Batson EP, Dimiceli S, Brown BW, Desch JK, Norbash AM, Conrad CK, Guggino WB, Flotte TR, Wine JJ, Carter BJ, Reynolds TC, Moss RB, Gardner P (2002). A phase II, double-blind, randomized, placebo-controlled clinical trial of tgAAVCF using maxillary sinus delivery in patients with cystic fibrosis with antrostomies. *Hum Gene Ther* 13:1349-59
- Wagner JA, Reynolds T, Moran ML, Moss RB, Wine JJ, Flotte TR, Gardner P (1998). Efficient and persistent gene transfer of AAV-CFTR in maxillary sinus. *Lancet* 351:1702-3
- Wahlestedt C, Salmi P, Good L, Kela J, Johnsson T, Hokfelt T, Broberger C, Porreca F, Lai J, Ren K, Ossipov M, Koshkin A, Jakobsen N, Skouv J, Oerum H, Jacobsen MH, Wengel J (2000). Potent and nontoxic antisense oligonucleotides containing locked nucleic acids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:5633-8
- Wainwright BJ, Scambler PJ, Schmidtke J, Watson EA, Law HY, Farrall M, Cooke HJ, Eiberg H, Williamson R (1985). Localization of cystic fibrosis locus to human chromosome 7cen-q22. *Nature* 318:384-5
- Wang B, Zhou J, Jia J, Zhang W, Trinko R, Jiang J, Huang N, Tang B, Wu Q, Chen X, Pan X (2003). Specific genetic modifications of domestic animals by gene targeting and animal cloning. *Reprod Biol Endocrinol* 1:103

Bibliografia

- Wang XF, Zhou CX, Shi QX, Yuan YY, Yu MK, Ajonuma LC, Ho LS, Lo PS, Tsang LL, Liu Y, Lam SY, Chan LN, Zhao WC, Chung YW, Chan HC **(2003)**. Involvement of CFTR in uterine bicarbonate secretion and the fertilizing capacity of sperm. *Nat Cell Biol* 5:902-6
- Ward CL, Kopito RR **(1994)**. Intracellular turnover of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. Inefficient processing and rapid degradation of wild-type and mutant proteins. *J Biol Chem* 269:25710-8
- Ward CL, Omura S, Kopito RR **(1995)**. Degradation of CFTR by the ubiquitin-proteasome pathway. *Cell* 83:121-7
- Watanabe T, Sullenger BA **(2000)**. Induction of wild-type p53 activity in human cancer cells by ribozymes that repair mutant p53 transcripts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:8490-4
- Waters DL, Dorney SF, Gaskin KJ, Gruca MA, O'Halloran M, Wilcken B **(1990)**. Pancreatic function in infants identified as having cystic fibrosis in a neonatal screening program. *N Engl J Med* 322:303-8
- Waters DL, Dorney SF, Gruca MA, Martin HC, Howman-Giles R, Kan AE, De Silva M, Gaskin KJ **(1995)**. Hepatobiliary disease in cystic fibrosis patients with pancreatic sufficiency. *Hepatology* 21:963-9
- Weissig V, Torchilin VP **(2000)**. Mitochondriotropic cationic vesicles: a strategy towards mitochondrial gene therapy. *Curr Pharm Biotechnol* 1:325-46
- Weissig V, Torchilin VP **(2001)**. Cationic bolosomes with delocalized charge centers as mitochondria-specific DNA delivery systems. *Adv Drug Deliv Rev* 49:127-49
- Wells KE, Fletcher S, Mann CJ, Wilton SD, Wells DJ **(2003)**. Enhanced in vivo delivery of antisense oligonucleotides to restore dystrophin expression in adult mdx mouse muscle. *FEBS Lett* 552:145-9
- Welsh MJ, Smith AE **(1993)**. Molecular mechanisms of CFTR chloride channel dysfunction in cystic fibrosis. *Cell* 73:1251-4
- Welsh MJ, Ramsey BW, Accurso F, Cutting GR **(2001)**. Cystic Fibrosis. In : Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. *The Metabolic & Molecular Bases of Inherited Disease*. Eighth ed. McGraw-Hill, Inc. New York: 5121-5188
- Welz C, Neuhuber W, Schreier H, Repp R, Rascher W, Fahr A **(2000)**. Nuclear gene targeting using negatively charged liposomes. *Int J Pharm* 196:251-2
- Whitehouse A, Taylor GR, Deeble J, Phillips SE, Meredith DM, Markham AF **(1996)**. A carboxy terminal domain of the hMSH-2 gene product is sufficient for binding specific mismatched oligonucleotides. *Biochem Biophys Res Commun* 225:289-95
- Wilschanski M, Corey M, Durie P, Tullis E, Bain J, Asch M, Ginzburg B, Jarvi K, Buckspan M, Hartwick W **(1996)**. Diversity of reproductive tract abnormalities in men with cystic fibrosis. *Jama* 276:607-8
- 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* 161:860-5

Bibliografía

- Wilschanski M, Yahav Y, 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
- Wilson DC, Pencharz PB (1998). Nutrition and cystic fibrosis. *Nutrition* 14:792-5
- Wright JM, Zeitlin PL, Cebotaru L, Guggino SE, Guggino WB (2003). Gene expression profile analysis of 4-phenylbutyrate treatment of IB3-1 bronchial epithelial cell line demonstrates a major influence on heat shock proteins. *Physiol Genomics*
- Xiang Y, Cole-Strauss A, Yoon K, Gryn J, Kmiec EB (1997). Targeted gene conversion in a mammalian CD34+-enriched cell population using a chimeric RNA/DNA oligonucleotide. *J Mol Med* 75:829-35
- Yamamoto T, Moerschell RP, Wakem LP, Komar-Panicucci S, Sherman F (1992). Strand-specificity in the transformation of yeast with synthetic oligonucleotides. *Genetics* 131:811-9
- Yanez RJ, Porter AC (1999). Gene targeting is enhanced in human cells overexpressing hRAD51. *Gene Ther* 6:1282-90
- Yang Y, Janich S, Cohn JA, Wilson JM (1993). The common variant of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is recognized by hsp70 and degraded in a pre-Golgi nonlysosomal compartment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:9480-4
- Yankaskas JR, Mallory GB, Jr. (1998). Lung transplantation in cystic fibrosis: consensus conference statement. *Chest* 113:217-26
- Ye S, Cole-Strauss AC, Frank B, Kmiec EB (1998). Targeted gene correction: a new strategy for molecular medicine. *Mol Med Today* 4:431-7
- Yew NS, Zhao H, Przybylska M, Wu IH, Tousignant JD, Scheule RK, Cheng SH (2002). CpG-depleted plasmid DNA vectors with enhanced safety and long-term gene expression in vivo. *Mol Ther* 5:731-8
- Yoon K, Cole-Strauss A, Kmiec EB (1996). Targeted gene correction of episomal DNA in mammalian cells mediated by a chimeric RNA.DNA oligonucleotide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:2071-6
- Zabner J, Cheng SH, Meeker D, Launspach J, Balfour R, Perricone MA, Morris JE, Marshall J, Fasbender A, Smith AE, Welsh MJ (1997). Comparison of DNA-lipid complexes and DNA alone for gene transfer to cystic fibrosis airway epithelia in vivo. *J Clin Invest* 100:1529-37
- Zabner J, Couture LA, Gregory RJ, Graham SM, Smith AE, Welsh MJ (1993). Adenovirus-mediated gene transfer transiently corrects the chloride transport defect in nasal epithelia of patients with cystic fibrosis. *Cell* 75:207-16
- Zamecnik PC, Raychowdhury MK, Tabatadze DR, Cantiello HF (2004). Reversal of cystic fibrosis phenotype in a cultured Delta508 cystic fibrosis transmembrane conductance regulator cell line by oligonucleotide insertion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:8150-5
- Zegarra-Moran O, Romio L, Folli C, Caci E, Becq F, Vierfond JM, Mettey Y, Cabrini G, Fanen P, Galiotta LJ (2002). Correction of G551D-CFTR transport defect in epithelial monolayers by genistein but not by CPX or MPB-07. *Br J Pharmacol* 137:504-12
- Zeitlin PL, Diener-West M, Rubenstein RC, Boyle MP, Lee CK, Brass-Ernst L (2002). Evidence of CFTR function in cystic fibrosis after systemic administration of 4-phenylbutyrate. *Mol Ther* 6:119-26

Bibliografia

- Zhang Z, Eriksson M, Falk G, Graff C, Presnell SC, Read MS, Nichols TC, Blomback M, Anvret M (1998). Failure to achieve gene conversion with chimeric circular oligonucleotides: potentially misleading PCR artifacts observed. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 8:531-6
- Zhu T, Mettenburg K, Peterson DJ, Tagliani L, Baszczynski CL (2000). Engineering herbicide-resistant maize using chimeric RNA/DNA oligonucleotides. *Nat Biotechnol* 18:555-8
- Zhu T, Peterson DJ, Tagliani L, St Clair G, Baszczynski CL, Bowen B (1999). Targeted manipulation of maize genes in vivo using chimeric RNA/DNA oligonucleotides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:8768-73
- Ziady AG, Kelley TJ, Milliken E, Ferkol T, Davis PB (2002). Functional evidence of CFTR gene transfer in nasal epithelium of cystic fibrosis mice in vivo following luminal application of DNA complexes targeted to the serpin-enzyme complex receptor. *Mol Ther* 5:413-9
- Zielenski J, Corey M, Rozmahel R, Markiewicz D, Aznarez I, Casals T, Larriba S, Mercier B, Cutting GR, Krebsova A, Macek M, Jr., Langfelder-Schwind E, Marshall BC, DeCelle-Germana J, Claustres M, Palacio A, Bal J, Nowakowska A, Ferec C, Estivill X, Durie P, Tsui LC (1999). Detection of a cystic fibrosis modifier locus for meconium ileus on human chromosome 19q13. *Nat Genet* 22:128-9
- Zielenski J, Markiewicz D, Rininsland F, Rommens J, Tsui LC (1991a). A cluster of highly polymorphic dinucleotide repeats in intron 17b of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene. *Am J Hum Genet* 49:1256-62
- Zielenski J, Rozmahel R, Bozon D, Kerem B, Grzelczak Z, Riordan JR, Rommens J, Tsui LC (1991b). Genomic DNA sequence of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene. *Genomics* 10:214-28
- Zsembery A, Jessner W, Sitter G, Spirli C, Strazzabosco M, Graf J (2002). Correction of CFTR malfunction and stimulation of Ca-activated Cl channels restore HCO₃⁻ secretion in cystic fibrosis bile ductular cells. *Hepatology* 35:95-104

