

LA TRIPLE HELICE EN LA TERAPIA GENICA

Por: Lía Cristina Upegui-González

Laboratoire de Recherche C.H.B., Hopital Paul Brousse, Villejuif, France.

INTRODUCCION

El momento actual de la civilización es la explosión de la biología molecular. Una verdadera revolución tecnológica y científica en la que la unidad básica de la transmisión hereditaria, el gen, deja de ser una unidad de información conceptual. Ahora el gen es identificado, localizado, desentrañado (secuenciado y descompuesto en sus subunidades funcionales), disecado y transportado a contextos foráneos y, más irreverente aun, es utilizado como herramienta.

Después de las ya conocidas utilidades de los genes clonados bacterias que hace la industria farmacéutica, surge otra utilización de la manipulación de genes, la terapéutica. Aunando los vertiginosos avances técnicos de la biología molecular, el desarrollo de la virología y la ampliación del mapa genético humano, nació un nuevo tipo de terapia que utiliza el material genético como medicina: la terapia génica (Anderson W.F. 1992, Dodet B. 1992, Miller A.D. 1992).

La terapia génica es una nueva esperanza de curar enfermedades para las cuales no existe tratamiento eficaz. Hasta ahora la terapia génica se ha restringido a células somáticas debido a consideraciones éticas. Se han empleado diferentes tipos de vectores, virales o no, para introducir genes o copias de genes (ADNc) en células en cultivo o en animales. Dichos transgenes tienen ya sea un efecto positivo para suplir la actividad génica ausente en las células enfermas, o bien lo contrario, bloquean la acción de un gen indeseable. Esta última es la estrategia de los antígenos, llámense ribozimas, ARN antisentido u oligonucleótidos inductores de triple hélice.

OLIGONUCLEOTIDOS INDUCTORES DE TRIPLE HELICE (TFOS)

Una de las estrategias más recientemente empleadas es la transferencia de inductores de formación de triple hélice en el ADN (TFOs). Aunque la formación de hélice triple con oligonucleótidos fuera descrita desde 1957, solamente se demostró su factibilidad treinta años después (Helene C. 1994). Los TFO son oligonucleótidos de hebra simple que se acoplan al ADN. Estos oligómeros, o las secuencias de ADN que los codifican, se transfieren clonados en vectores plasmídicos generalmente.

Los TFOs de ADN o de ARN, se aparean con porciones complementarias del ADN dúplex formadas por homopurinas. Diversas secuencias pueden intervenir

en la tercera hebra (TFO). La cadena de polipirimidinas del TFO reconoce su secuencia blanco en el ADN y se acopla a ella por medio de enlaces tipo Hoogsteen, intercalándose en el surco mayor de la espiral (François J.C. 1988). El acoplamiento de la tercera cadena no desestabiliza la doble hélice. Por medio de enlaces de tipo Hoogsteen, la timina reconoce las parejas AT y CG, la citosina se liga al par GC, la guanina se une al par AT (Minton K.W. 1985). Debido a la necesidad de protonación de la citosina para establecer uniones tipo Hoogsteen, la triada C*GC es inestable a pH fisiológico. Se ha reportado mayor estabilidad de la triple hélice a pH fisiológico gracias a metilaciones de la citosina (Hausheer F.H. 1992).

La selectividad de la unión entre el TFO y el ADN de doble cadena es igual que la de los apareamientos de Watson y Crick en la la doble hélice. El ligamiento con el ARN es de afinidad similar que con el ADN. En la estructura de la triple hélice, las regiones del TFO en unión con el dúplex, se presentan intercaladas con secuencias no apareadas. Cuando estos "puentes" están formados por dos pirimidinas, la estabilidad del tríplex es máxima. Un mal apareamiento en una sola tripleta desestabiliza la estructura. El grado de desestabilización varía según la ubicación de la tripleta no apareada. Así, un mal apareamiento terminal tiene repercusiones mínimas, pero uno central desequilibra por completo la estructura (Mergny J.L. 1991). Por ejemplo, si se trata de un TFO de 21 nucleótidos, la formación de la triple hélice es un fenómeno de todo o nada. Un solo mal apareamiento destruye la triple hélice (Yoon K. 1992).

1. REGULACION DE LA REPLICACION POR MEDIO DE TFOs

La formación de la triple hélice en el ADN inhibe el paso de las polimerasas y bloquea la transcripción y la replicación, principalmente cuando la triple hélice se localiza en el sitio de iniciación. La triple hélice impide no solamente el acoplamiento de la enzima, sino también de los factores proteicos requeridos para la formación del complejo de iniciación (Helene C. 1991). La obstrucción del surco mayor de la doble espiral por el TFO, obstaculiza el deslizamiento del fragmento Klenow de la ADN polimerasa a través de las transiciones entre la doble y la triple cadena. El efecto inhibitorio depende de la distancia entre el extremo 3' del cebador y el sitio de formación de la triple hélice: deben existir más de tres nucleótidos entre los dos para que el tríplex no interfiera con la replicación (Guieysse A.L. 1995). Mientras más larga sea la triple hélice, más efectivo será el bloqueo sobre la acción enzimática, que en promedio dura mínimo veinte minutos. Por ésto, los TFOs pueden utilizarse en estudios funcionales de la polimerización o de la replicación génica (Hacia J.G.1994) o bien en el control de la replicación de genes deletéreos.

2. REGULACION DE LA TRANSCRIPCION POR MEDIO DE TFOs

La formación de hélices triples por TFOs sobre secuencias reguladoras específicas, se demostró en un modelo *in vitro* con la polimerasa de T7. El

oligonucleótido se aparea con las secuencias blanco de homopurinas de los operadores, de forma antiparalela. Los TFOs de ARN se aparean con las secuencias de homopirimidinas. Sin embargo, el control sobre la transcripción no es total, lo que sugiere que el complejo represor/operador está regulado por otros elementos *in cis*, que actúan a distancia y que podrían estar presentes también en los sistemas de transcripción naturales (Skoog J.U. 1993).

Una prueba fehaciente de la utilidad de los TFOs para regular la transcripción se consiguió con el estudio del gen de la eritropoyetina (EPO). Los TFOs y los oligonucleótidos antisentido dirigidos contra la secuencia de regulación positiva de este gen, dentro de las células Hep3B reducen la síntesis del ARNm. Los oligonucleótidos dirigidos contra la secuencia inhibidora generan un aumento de la producción del mensajero (Imagawa S. 1994).

De manera similar, el TFO dirigido contra al región rica en purinas del elemento inducible por interferón (IRE), inhibe el promotor y bloquea la expresión del gen. Este bloqueo sobre la secuencia reguladora del promotor, impide la inducción que normalmente ejerce el interferón (Roy C. 1994). También la inducción ejercida por el interferón sobre la síntesis de moléculas HLA-DR es bloqueada por un TFO específicamente diseñado para acoplarse con la secuencia reguladora del gen humano DRA del CMH humano. El mismo oligonucleótido inhibe la síntesis de otros genes susceptibles al interferón-g, como el del receptor Fc de la inmunoglobulina G y el ICAM-I. El efecto del TFO sobre las células accesorias se asocia a la inhibición de la respuesta proliferativa de los linfocitos T. Aparentemente, el TFO anula el efecto del interferón sobre diversos inmunoreceptores (Fedoseyeva E.V. 1994).

Otro ejemplo es la inhibición *in vitro* de la actividad del andrógeno de rata, por medio del bloqueo de la transcripción del receptor, producido por un TFO dirigido contra la región activadora del promotor del gen que lo codifica (Song C.S. 1995).

La transcripción del gen alfa1(I) del colágeno es el punto crucial en la regulación de varias enfermedades causadas por acumulación intersticial de colágeno de tipo I. La región rica en polipurinas-polipirimidinas del promotor es el elemento de regulación positiva de la transcripción y fue el destino de los TFOs en un estudio reciente. La transfección *in vivo* del TFO conlleva la abolición de la transcripción del gen alfa y la desaparición de las interacciones protéicas en la región reguladora del gen, en las ratas tratadas (Kovacs A. 1996). La regulación de la transcripción por medio de los TFOs se anuncia como una alternativa promisoriosa respecto al control de enfermedades por acumulación.

3. TFOs Y RECOMBINACION HOMOLOGA

Por otro lado, en *E. coli* se demostró la inducción de recombinación homóloga por formación de triple hélice. La conformación superhelicoidal negativa, generada por la transcripción activa en 3', induce la formación de triple hélice entre secuencias de poli-G y poli-C *in vivo*. Esa estructura acerca porciones de ADN que originalmente estaban distantes, favoreciendo los entrecruzamientos.

Secuencias repetidas directas separadas 200 o 1000 pb recombinan probablemente cuando son puestas en contacto durante la transcripción (Kohwi Y. 1993). Entonces, el propiciar recombinaciones podría ser una función de la hélice triple importante en la evolución de los seres vivos.

4. REGULACION DE LA TRADUCCION POR MEDIO DE TFOs

La estructura de la hélice triple podría tener la función natural de regulación, ya que las colas de poliadeninas de los ARN mensajeros pueden potencialmente formar este tipo de estructura e impedir el paso de los ribosomas, impidiendo la expresión de la proteína. El fenómeno de formación de triple hélice vendría de la formación de tripletes AAU y AAT en los ARNm, o bien entre el ARNm y la secuencia codificadora del ADN. Esto bloquearía también la transcripción (Broitman S.L. 1987).

La posibilidad de una regulación génica natural, a través de la formación de triples hélices, así como la generación de cortes en la doble espiral, ya habían sido sugeridas (Hobbs C.A. 1994).

5. MUTAGENESIS DIRIGIDA POR MEDIO DE TFOs

El acoplamiento del psoralem a los TFOs induce mutaciones específicas y modifica permanentemente la expresión y la función génicas, ya que la fotoactivación del psoralem genera ligamientos cruzados en la doble hélice. Esto implica transversiones, deleciones y mutaciones puntuales; tal como se demostró con el genoma del fago I (Havre P.A. 1993) y en el genoma del virus SV40, aún en el interior de células de mamífero (células COS) (Wang G. 1995).

Gracias a los ligamientos creados en el ADN por irradiación u.v. de las triples hélices conjugadas a psoralem, el promotor del gen del receptor de la interleuquina 2 (IL2) fue bloqueado *in vitro* e *in vivo*. La unión del factor NF-kappa-b a la secuencia "enhancer" del gen no era posible debido al bloqueo inducido por la triple hélice (Grigoriev M. 1993).

La unión de la molécula de fenantrolina o de azidofenacil los TFOs permite cortar el ADN de manera precisa. La fenantrolina y el azidofenacil son agentes inductores de ligamientos que se activan por irradiación u.v. Una vez que el TFO se apareó con su secuencia blanco en el ADN, la fenantrolina genera cortes en la doble cadena, en presencia de cobre y de un agente reductor. El TFO dentro del surco mayor y apareado de forma paralela a la hebra de homopurinas, induce cortes de la otra cadena, dentro de la secuencia de homopirimidinas, hacia el lado 3' en el surco menor. De esta manera, el oligonucleótido queda convertido en una endonucleasa específica de secuencia y puede utilizarse para mapear porciones largas de ADN sin necesidad de desnaturalizarlas. Puede usarse también para inducir mutaciones específicas que bloqueen la replicación, por ejemplo de oncogenes o de virus patógenos (François J.C. 1988, Praseuth D. 1988).

6. TFOs Y VACUNAS ANTIRETROVIRALES

La misma técnica se empleó conjugando el psoralem con un TFO formado por timidinas, citosinas y guaninas y dirigido contra el genoma de HIV. En condiciones fisiológicas, el TFO se aparea de forma paralela a la secuencia de homopurinas y forma una triple hélice con el provirus. La estructura se estabiliza grandemente con la metilación de las citosinas. La irradiación crea ligamientos entre las dos hebras del dúplex. Esta técnica podría emplearse para inactivar los provirus integrados en los pacientes (Giovannangeli C. 1992).

La posibilidad de hacer vacunas antiretrovirus empleando la inducción de triple hélice con TFOs, se propuso en función del bloqueo directo sobre la replicación, la transcripción o la traducción que pueden ejercer. Además, porque la síntesis de la cadena "positiva" de ADN en la replicación viral se inicia en la secuencia de polipurinas altamente conservada entre los HIV-I. Los TFOs y los oligonucleótidos antisentido dirigidos contra esta secuencia son específicos para esta región de purinas e inhiben las actividades enzimáticas en ella, así mismo deben bloquear la transcriptasa reversa viral en la iniciación de la síntesis de ADN (Volkman S. 1993).

La utilización del agente intercalante oxalopiridocarbazol (OPC), ligado a un TFO de 7 mers, produjo eficazmente ligamientos en el ADN blanco. El TFO se liga de forma estable con la región rica en purinas de la porción U3 del LTR del virus HIV y el cromóforo se intercala hacia el límite entre el dúplex y el tríplex en el ADN proviral (Mouscadet J.F. 1994). Sin embargo, antes de ilusionarse con las posibles aplicaciones, debe tenerse en cuenta la observación de la reparación de los ligamientos cruzados inducidos por los TFOs en el genoma de un virus que se replicaba en células humanas en cultivo (Sandor Z. 1994). Es necesario entonces, elucidar los mecanismos por los cuales se pueden reparar las mutaciones producidas por los TFOs, para poder emplearlos adecuadamente con fines terapéuticos.

7. EMPLEO DE LOS TFOs EN TERAPIAS ANTICANCEROSAS

7. A. ONCOGENES

En cuanto al tratamiento del cáncer, la quimioterapia pretende detener la proliferación de las células malignas, pero afecta peligrosamente el desarrollo del tejido normal de crecimiento rápido. Por su parte, las células transformadas adquieren resistencia a la quimioterapia, generalmente a través de la amplificación del gen *mdr 1* que codifica la glicoproteína de membrana para la detoxificación celular. Para hacer a las células cancerosas susceptibles a la quimioterapia, se bloqueó la expresión de *mdr 1* por medio de un TFO dirigido contra una región de homopurinas en la secuencia codificadora. La síntesis de la glicoproteína se bloqueó por la imposibilidad de la polimerasa para deslizarse (Scaggiante B. 1994).

Los oncogenes de la familia *ras* son determinantes en el desarrollo de muchos tipos de cáncer. Se han usado TFOs para inhibir la transcripción del oncogén *Ha-ras* humano. La región del promotor que es esencial para la transcripción contiene tres sitios Sp1 que fueron blanco para la inducción de triple hélice. Uno de los oligonucleótidos, en particular, se liga a esta región con alta especificidad, en orientación antiparalela a la secuencia rica en purinas y bloquea la transcripción *in vitro* (Mayfield C. 1994). Solo queda esperar que *in vivo* se reproduzcan los mismos efectos.

7. B. CONTROL DE LA PROLIFERACION CELULAR

El control de la proliferación celular es fundamental en el tratamiento del cáncer, ya sea como terapia en sí misma, o como tratamiento complementario de la quimioterapia. El bloqueo de la expresión génica por medio de TFOs es prometedor en este campo, dada la precisión y selectividad con la que actúan. Así pues, tenemos varios ejemplos del uso de TFOs para silenciar genes implicados en la proliferación, a través del bloqueo de la unión de los factores de transcripción con el DNA: bloqueo de *c-myc* (Cheng Y.K. 1994), del gen del receptor del EGF (factor de crecimiento epidérmico), del oncogén HER-2. Este último está relacionado con varios cánceres humanos: de estómago, colon, páncreas, seno, ovario y pulmón.

Los estudios en el gen homólogo a HER-2, el oncogén *neu* de rata, revelaron elementos ricos en polipurinas-polipirimidinas en la región "enhancer" del promotor. Los TFOs se ligan ávidamente a esta secuencia blanco y pueden usarse para ejercer una regulación negativa sobre el oncogén (Gee J. 1994). En efecto, la transcripción del oncogén humano se bloqueó con un TFO de 28 bases, dirigido contra la secuencia de polipurinas situada arriba (5') de la caja TATA del promotor. Los niveles del ARNm de HER-2 disminuyeron en un 42% seis horas después de la administración del TFO. Durante el primer día se obtuvo una reducción de 59% en la tasa de producción de la proteína específica, sin afectar la expresión de otros genes (Porum H. 1996).

Análogamente, el TFO dirigido contra la región de homopurinas-homopirimidinas del promotor del protooncogén murino *c-pim 1* se liga a ella de forma estable, casi irreversible a 37°C, en dirección antiparalela a la secuencia de homopurinas, formando una triple hélice. Solamente la substitución de un nucleótido de la secuencia del promotor impide la formación de la estructura. Probablemente, la formación de hélices triples juega un papel importante en la regulación génica *in vivo* a través de cambios conformacionales de la cromatina (Svinarchuck F. 1994).

7. C. INHIBICION DE IGF-I Y TFOs

El IGF-I (Insulin Like Growth Factor-I) es un factor de crecimiento de amplio espectro, importante en la diferenciación y desarrollo de todos los mamíferos (Humbel R.E. 1990). Probablemente IGF-I también está implicado en el progreso del cáncer. Lo que es cierto es que con frecuencia se encuentra

expresado abundantemente en los tumores. Se ha pensado en una función autocrina de IGF-I en el cáncer (Kaleko M. 1990, LeRoith D. 1995, Werner H. 1996a and b, Beitnerjohnson D. 1996, Mulrone y S.E. 1996). Nuestro equipo se ocupa de estudiar el efecto del bloqueo de IGF-I en las células tumorales en cultivo e *in vivo*.

La inhibición de IGF-I con el ARN antisentido suprime el fenotipo tumorigénico de las células C6 de glioblastoma de rata. Estas células transfectadas con el antisentido, al ser inyectadas en animales singénicos protegen contra el desarrollo de tumores (Trojan J. 1995).

Recientemente la técnica de triple hélice se empleó para inhibir la expresión de IGF-I. Así mismo, las células de glioblastoma perdieron sus características de malignidad y su capacidad para producir tumores. Al mismo tiempo, estas células aumentaron significativamente la expresión de antígenos del CMH de clase I (Shevelev A. 1997).

El sistema de glioblastoma de rata proviene de un tumor "experimental", lo que podría originar algún sesgo en la extrapolación de los resultados a tumores reales. Es por éso quisimos estudiar la inhibición de IGF-I en un tumor espontáneo. El modelo de hepatoma de ratón ATIIIT representa exactamente el hepatocarcinoma clínico en su histología y en su patrón de desarrollo. De la misma manera, la línea PCC3 de teratocarcinoma de ratón procede de un tumor espontáneo que encierra todas las capas embriológicas y representa los tumores de distintas procedencias histológicas.

En estos modelos, la inhibición de la expresión de IGF-I, tanto con ARN antisentido, como con el oligonucleótido formador de triple hélice, llevan a cambios fenotípicos pleiotrópicos. Es particularmente interesante el gran aumento en la expresión de los antígenos del CMH de clase I que están ausentes o casi, en las células tumorales. Estas moléculas participan en la presentación de antígenos y en nuestro sistema podrían presentar los antígenos tumorales al sistema inmune e inducir una respuesta específica. Este estímulo inmunogénico ausente en los pacientes cancerosos hace que las células malignas escapen al control inmunológico. Las células transfectadas expresando CMH-I junto con moléculas específicas del tumor pueden convertirse en vacunas anti-cáncer. Este aspecto se está estudiando actualmente.

8. UTILIZACION DE TFOs EN LA PURIFICACION DE FRAGMENTOS DE DNA

La formación de hélice triple se empleó para purificar fragmentos de ADN con secuencias particulares. Los TFOs biotinilados se unen a su ADN blanco formando un complejo o estructura de triple hebra que es capturada por perlas magnéticas acopladas a la estreptavidina. Luego el ADN se eluye en un tampón ligeramente alcalino, para desestabilizar la triple hélice (Ito T. 1992).

Esta técnica se perfeccionó en la llamada técnica de captura de afinidad (TAC). Es un método rápido y simple para purificar el inserto de un cósmido. El cósmido lleva una secuencia de homopurinas-homopirimidinas (hPu-hPy) a cada lado del sitio de clonaje; después de la digestión el inserto sale flanqueado por las secuencias hPu-hPy que le permiten ser captado por un TFO biotinilado, con el que forma una hélice triple. El complejo es capturado por las perlas acopladas a estreptavidina y posteriormente el inserto es eluido a pH 9, dando un 95% de rendimiento y 95% de pureza (Ji H. 1994).

9. DETECCION DE MUTACIONES POR MEDIO DE TFOs

Los TFOs pueden discriminar entre secuencias que difieren en un solo nucleótido gracias a la alta precisión que requiere la formación de triple hélice. Esta característica se aprovechó para diferenciar el gen p53 de la versión con la microdelección (Olivas W.M. 1994) y para discriminar entre secuencias de homopurinas que presenten mutaciones puntuales. Estas secuencias son importantes porque frecuentemente son reguladoras de la expresión génica (Vo T. 1995). Los TFOs permitirían saber así por ejemplo, si un paciente es portador de un oncogén activado.

10. LIMITACIONES DE LOS TFOs Y UTILIZACION DE PNAs

Los TFOs solo son eficaces sobre secuencias de homopurinas-homopirimidinas del DNA. Además, la acción reguladora de los TFOs está limitada a la duración de vida de éstos. Como todos los oligonucleótidos, los TFOs son blanco de las restrictasas. El transporte hasta el ADN requiere sistemas de translocación hasta el núcleo y la evasión de los lisosomas. Las diversas enzimas que aparecen en este trayecto son una limitación para la utilización de TFOs. Otra dificultad en el uso de los TFOs es su difícil síntesis en cantidades grandes del orden de milimoles.

Sin embargo, existen ahora moléculas análogas a los TFOs que no son digeridas por las enzimas de restricción porque no son ácidos nucleicos normales. Son la PNAs (Acidos Nucleicos Proteicos), tienen un esqueleto peptídico sustituido con bases nitrogenadas, generando una estructura tridimensional similar a la del ADN y capaz de unirse a la doble espiral por complementariedad de bases. Las PNAs son supremamente estables y de larga vida, ya que no son digeridas por las enzimas celulares.

Los PNAs son moléculas sintetizadas en laboratorio, concebidas teóricamente para mimetizar la estructura terciaria de ADN y para cumplir con las reglas de la complementariedad de Watson-Crick y de Hoogsteen. En efecto, reaccionan de la misma forma que los oligómeros y participan en uniones paralelas o antiparalelas con el ADN. De esta forma, un PNA de homopirimidinas se une en orientación paralela a la hebra de ADN rica en purinas y forma enlaces tipo Hoogsteen. Del mismo modo, el PNA complementario al ADN se apareará en

orientación antiparalela con enlaces de hidrógeno tipo Watson-Crick (Nielsen P. 1991).

La unión del PNA con el ADN es altamente específica. La molécula de PNA busca en primera instancia el ADN de doble hebra rigurosamente complementario, se aparea y desplaza la otra cadena del ADN. En la siguiente etapa, se crea el complejo PNA2/ADN, casi irreversiblemente. El filamento de ADN no complementario y no apareado queda como simple cadena formando un bucle P que puede convertirse en un promotor de transcripción o de traducción. También puede crear un bloqueo de transcripción o de replicación (Demidov V. 1995).

La mayor estabilidad del complejo PNA2/ADN se logra cuando una PNA se une al ADN en orientación paralela (el extremo amino-terminal del lado 5', formando apareamientos de tipo Hoogsteen) y la otra molécula PNA se une de forma antiparalela (con uniones tipo Watson-Crick). Aún mayor estabilidad se consigue si la citosina se reemplaza por pseudo-citosina. Cada cadena PNA puede sintetizarse independientemente, obedeciendo simplemente a las reglas del apareamiento con la secuencia blanco. Al final, estando mezcladas las dos especies de cadenas PNAs con el DNA blanco, formarán estructuras de triple hélice estables (Egholm M. 1995).

Con el fin de evaluar la eficacia de la regulación efectuada por los PNAs se hicieron experimentos de inhibición *in vitro* e *in vivo* tanto de la traducción, de la transcripción, como de la transcripción reversa. El bloqueo de la traducción con un PNA dirigido contra el ARNm se demostró en el sistema de lisado de reticulocito de conejo. Un PNA dirigido contra la hebra transcrita de un casete de transcripción bloquea en un 90 a 100% la elongación de la transcripción por parte de la pol II. Finalmente, la línea celular tsA 8 que expresa el antígeno mayor de SV40, se utilizó para mostrar el bloqueo de la traducción ejercido por el PNA complementario con el mensajero del antígeno T. Este bloqueo es específico y no afecta la expresión de otros genes en las células estudiadas (Hanvey J. 1992).

La regulación de la expresión génica con PNAs se demostró *in vitro* y en células en cultivo, con el bloqueo específico de la interacción entre el factor de transcripción NF-kappa-B y su sitio de unión IL2-R alfa (Vickers T. 1995).

Tanto los PNAs que forman dobles como los que forman triples hélices sobre el codón AUG son capaces de inhibir la translación de los mensajeros blanco; pero solo los que forman tríplex pueden bloquearla completamente. También bloquean completamente los que forman hélices híbridas, parcialmente dobles-parcialmente triples (Knudsen H. 1996).

Buscando una aplicación clínica, se pensó en el gen de fusión P/R (leucemia Promielocítica/Receptor alfa del ácido retinoico) presente en casi todos los casos de leucemia promielocítica aguda. El gen P/R es el producto de la translocación t(15;17) y origina un ARNm y una proteína P/R quiméricos. Parece que esta proteína quimérica interviene en el proceso de génesis de leucemia y de la sensibilidad de las células APL al ácido retinoico. Se

diseñaron PNAs específicos contra la región de iniciación o contra la región de homopurinas-homopirimidinas reguladora del gen P/R y se observó inhibición de la transcripción y de la traducción *in vitro* (Gambacorti-Passerini C. 1996). El bloqueo de la expresión de esta proteína significaría tal vez el control de la leucemia promielocítica aguda y la prescripción de TFOs para dicho efecto puede convertirse en una terapia adecuada.

Aunque el diseño y la síntesis de las PNAs no es sencillo, teóricamente pueden dirigirse contra cualquier secuencia blanco según la necesidad y no están limitadas a actuar sobre secuencias de homopurinas-homopirimidinas como los TFOs. El campo de aplicación entonces se amplía al genoma entero. Una PNA unida a una molécula que produzca cortes en el ADN se convierte en una nucleasa específica de secuencia. Una PNA marcada con biotina por ejemplo, se transforma en una sonda para experimentos de microscopía electrónica o de Southern blot. Entonces, además de las aplicaciones en la regulación, existen muchas posibles utilidades de las PNAs.

CONCLUSION

El empleo de los inductores de formación de hélice triple sobre el ADN, bien sea los TFOs o bien, los plásmidos que los codifican, ha probado ser un método eficaz en la regulación de la expresión génica. Además, gracias a las ventajas en cuanto a síntesis, resistencia y multiplicidad de secuencias blanco, los PNAs abren un nuevo horizonte en la genética reversa.

Las aplicaciones que se vislumbran para esta nueva técnica son múltiples, en la prevención y en el control de enfermedades genéticas, en particular el cáncer. Los años venideros descubrirán con asombro el desarrollo de los nuevos tratamientos y métodos profilácticos de la verdadera terapia génica.

BIBLIOGRAFIA

Anderson W.F. Human Gene Therapy. Science 1992: 256-9.

Beitnerjohnson S., Blakesley V.A., Shenorr Z., Jimenez M., Stannard B., Wang L.M., Pierce J., LeRoith D. The proto-oncogene product c-CRK associates with insulin receptor substrate-1 and 4PS - modulation by insulin like growth factor-1 and enhanced IGF-1 signaling. J. Biol. Chem. 1996; 271 (16): 9287-9290.

Broitman S.L., Im D.D., Fresco J.R. Formation of the triple-stranded polynucleotide helix, poly(A.A.U). Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1987; 84(15): 5120-4.

Cheng Y.K., Petit B.M. Hoogsteen versus reversed-Hoogsteen base pairing: DNA triple helices. J. Am. Chem. Soc. 1992, 114 (12): 4465-4474.

Demidov V., Yavnilovich M., Belotserkovskii B., Frank-Kamenetskii M., Nielsen P. Kinetics and mechanism of polyamide("peptide") nucleic acid binding to duplex DNA. Procc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 1995; 92: 2637- 2641.

Dodet B. Les voies de la thérapie génique. *Biofutur*. 1992: 20-35.

Egholm M., Christensen L., Dueholm K., Buchardt O., Couli J., Nielse P. Efficient pH-independent sequence-specific DNA binding by pseudoisocytosine-containing bis-PNA. *Nucleic Acids Res.* 1995; 23(2): 217-222.

Fedoseyeva E.V., Li Y., Huey B., Tam S., Hunt C.A., Benichou G., Garovoy M.R. Inhibition of interferon-gamma-mediated immune functions by oligonucleotides. *Transplantation (Baltimore)*. 1994; 57(4): 606-612.

Francois J.C., Saison-Behmoaras T., Helene C. Sequence-specific recognition of the major groove of DNA by oligodeoxynucleotides via triple helix formation. Footprinting studies. *Nucleic Acids Res.* 1988 Dec 23; 16(24): 11431-40.

Gambacorti-Passerini C., Mologni L., Bertazzoli C., le Coutre P., Marchesi E., Grignani F., Nielsen P. In vitro transcription and translation inhibition by anti-promyelocytic leukemia(PML)/retinoic acid receptor alpha and anti-PML peptide nucleic acid. *Blood*. 1996; 88(4): 1411- 1417.

Gee J.E., Yen R.L., Hung M.C., Hogan M.E. Triplex formation at the rat neu oncogene promoter. *Gene (Amsterdam)*. 1994,149 (1):109-114.

Giovannangeli C., Rouge M., Garestier T., Thuong N.T., Helene C. Triple-helix formation by oligonucleotides containing the three bases thymine, cytosine, and guanine. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 1992; (18): 8631-8635.

Grigoriev M., Praseuth D., Guieysse A.L., Robin P., Thoung N.T., Hélène C., Harel-Bellan A. Inhibition of gene expression by triple helix-directed DNA cross-linking at specific sites. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 1993; 90(8): 3501-3505.

Guieysse A.L., Praseuth D., François J.C., Hélène C. Inhibition of replication initiation by triple helix-forming oligonucleotides. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1995; 217(1): 186- 94.

Hacia J.G., Dervan P.B., Wold B.J. Inhibition of klenow fragment DNA polymerase on double-helical templates by oligonucleotide-directed triple-helix formation. *Biochemistry*. 1994, 33(20): 6192-6200.

Hanvey J., Peffer N., Bisi J., Thomson S., Cadilla R., Josey J., Ricca D., Hassman F., Bonham M., Au K., Carter S., Bruckenstein D., Boyd A., Noble S., Babiss L. Antisense and Antigene properties of Peptide Nucleic Acids. *Science*. 1992; 258: 1481-1485.

Hausheer F.H., Singh U.C., Saxe J.D., Flory J.P., Tufto K.B. Thermodynamic and conformational characterization of 5-methylcytosine- versus cytosine-substituted oligomers in DNA triple helices: Ab initio quantum mechanical and free energy perturbation studies. *J. Am. Chem. Soc.* 1992, 114(13): 5356-5362.

Havre P.A., Glazer P.M. Targeted mutagenesis of simian virus 40 DNA mediated by a triple helix-forming oligonucleotide. *Journal of Virology*. 1993; 67 (12): 7324- 7331.

Hélène C. The anti-gene strategy: control of gene expression by triplex-forming-oligonucleotides. *Anticancer Drugs Des*. 1991; 6(6): 569-84.

Helene C. Control of oncogene expression by antisense nucleic acids. *Eur. J. Cancer*. 1994; 30(11): 1721-1726.

Hobbs C.A., Yoon K. Differential regulation of gene expression in vivo by triple helix-forming oligonucleotides as detected by a reporter enzyme. *Antisense Res. Dev*. 1994; 4(1): 1-8.

Humbel R.E. The insulin-like growth factors I and II. *Eur. J. Biochem*. 1990; 190(3): 445-62.

Imagawa S.K., Izumi T., Miura Y. Positive and negative regulation of the erythropoietin gene. *J. Biol. Chem*. 1994; 269 (12): 9038-9044.

Ito T., Smith C.L., Cantor C.R. Sequence-specific DNA purification by triplex affinity capture. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 1992; 89 (2): 495-498.

Ji H., Smith L.M., Guilfoyle R.A. Rapid isolation of cosmid insert DNA by triple-helix-mediated affinity capture. *Genet. Anal. Tech. App*. 1994, 11(2): 43-47.

Kaleko M., Rutter W., Miller A. Overexpression of the human insulin-like growth factor I receptor promotes ligand-dependant neoplastic transformation. *Mol. Cell. Biol*. 1990, 10: 464- 473.

Knudsen H., Nielsen P. Antisense properties of duplex- and triplex-forming PNAs. *Nucleic Acids Res*. 1996; 24(3): 494-500.

Kohwi Y., Panchenko Y. Transcription-dependent recombination induced by triple-helix formation. *Genes & Develop*. 1993, 7(9): 1766-1778.

Kovacs A., Kandala J.C., Weber K.T., Guntaka R.V. Triple helix-forming oligonucleotide corresponding to the polypyrimidine sequence in the rat alpha1(I) collagen promoter specifically inhibits factors binding and transcription. *J. Biol. Chem*. 1996, 271 (3): 1805- 12.

LeRoith D., Baserga R., Helman L., Roberts C.T. Insulin-like growth factors and cancer. *Ann. Int. Med. USA*. 1995; 121(1): 54-9.

Mayfield C., Ebbinghaus S., Gee J., Jones D., Rodu B., Squibb M., Miller D. Triplex formation by the human Ha-ras promoter inhibits Sp1 binding and in vitro transcription. *J. Biol. Chem*. 1994, 269(27): 18232-18238.

Mergni J.L., Sun J.S., Rougee M., Montenay-Garestier T., Barcelo F., Chomilier J., Hélène C. Sequence specificity in triple-helix formation: experimental and

theoretical studies of the effect of mismatches on triplex stability. *Biochemistry*. 1991; 30 (40): 9791- 9798.

Miller A.D. Human Gene therapy comes of age. *Nature*. 1992; 357: 455-60.

Minton K.W. The triple helix: a potential mechanism for gene regulation. *J. Exp. Pathol.* 1985; 2(3): 135- 48.

Mouscadet J.F., Ketterle C., Goulaouic H., Carteau S., Subra F., Le Bret M., Auclair C. Triple helix formation with short oligonucleotide-intercalator conjugates matching the HIV-1 U3 LTR end sequence. *Biochem.* 1994, 33 (14): 4187- 96.

Nielsen P., Egholm M., Berg R., Buchardt O. Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide. *Science*. 1991; 254: 1497- 1500.

Mulroney S.E., Koenig J.I., Csikos, Pesce C., Striker L., LeRoith D., Haramati A. Temporal changes in InsulinLike Growth Factor I, c-Fos and c-Jun gene expression during hyperplastic kidney growth In Wealing rats. *Endocrinology*. 1996; 137(3): 839-845.

Olivas W.M., Maher L.J. Analysis of duplex DNA by triple helix formaton: Application to detection of a p53 microdeletion. *Biotechniques*. 1994; 16 (1): 128- 132.

Porum H., Gousset H., Letellier R., Salle V., Briane D., Vassy J., Amor-Gueret M., Israel L., Taillandier E. Temporary ex vivo inhibition of the expression of the human oncogène HER2 (neu) bay a triple hélix-forming oligonucleotide. *Cancer Res*. 1996, 56 (3): 515- 22.

Praseuth D., Perrouault L., Le Doan T., Chassignol M., Thuong N., Helene C. Sequence-specific binding and photocrosslinking of alpha and beta oligodeoxynucleotides to the major groove of DNA via triple-helix formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1988; 85(5): 1349-53.

Roy C. Triple-helix formation interferes with the transcription and hinged DNA structure of the interferon-inducible 6-16 gene promoter. *Eur. J. Biochem.* 1994; 220(2): 493-503.

Sandor Z., Bredberg A. Repair of triple helix directed psoralen adducts in human cells. *Nucleic Acids Res.* 1994, 22(11): 2051-2056.

Scaggiante B., Morassutti C., Tolazzi G., Michelutti A., Baccarani M., Quadrifoglio F. Effect of unmodified triple helix-forming oligodeoxyribonucleotide targeted to human multidrug-resistance gene *mdr1* in MDR cancer cells. *FEBS Lett.* 1994, 352(3): 380-384.

Skoog J.U., Maher L.J.III. Relief of triple-helix-mediated promoter inhibition by elongating RNA polymerases. *Nucleic Acids Res.* 1993; 21(17): 4055-4058.

Shevelev A., Trojan J., Ilan J. *Cancer Gene Therapy*. 1997. in press

Song C.S., Jung M.H., Supakar P.C., Chen S., Vellanoweth R.L., Chatterjee B., Roy A.K. Regulation of androgen action by receptor gene inhibition. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1995; 12; 761: 97-108.

Svinarchuk F., Bertrand J.R., Malvy C. A short purine oligonucleotide forms a highly stable triple helix with the promoter of the murine c-pim-1 proto-oncogene. *Nucleic Acids Res.* 1994, 22(18): 3742-3747.

Trojan J., Johnson T.R., Rudin S.D., Ilan J., Tykocinski M., Ilan J. Treatment and prevention of rat glioblastoma by immunogenic C6 cells expressing antisense insulin-like growth factor I RNA. *Science*. 1993; 259: 94-97.

Vo T., Wang S., Kool E.T. Targeting pyrimidine single strands by triplex formation: Structural optimization of binding. *Nucleic Acids Res.* 1995; 23 (15): 2937-2944.

Volkman S., Dannull J., Moelling K. The polypurine tract, PPT, of HIV as target for antisense and triple-helix-forming oligonucleotides. *Biochimie*. 1993; 75(1-2): 71-8.

Wang G., Levy D.D., Seidman M.M., Glazer P.M. Targeted mutagenesis in mammalian cells mediated by intracellular triple helix formation. *Mol. Cell. Biol.* 1995; 15(3): 1759-1768.

Vickers T., Griffith M., Ramasamy K., Risen L., Freier S. Inhibition of NF-kappa-B specific transcriptional activation by PNA strand invasion. *Nucleic Acids Res.* 1995; 23(15): 3003-8.

Werner H., Karnieli E., Rauscher F., LeRoith D. Wild-type and mutant p53 differentially regulate transcription of the insulin-like growth factor I receptor gene. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 1996b; 93(16): 8318- 8323.

Yoon K., Hobbs C.A., Koch J., Sardaro M., Kutny R., Weiss A.L. Elucidation of the sequence-specific third-strand recognition of four Watson-Crick base pairs in a pyrimidine triple-helix motif: T cntdot AT, C cntdot GC, T cntdot CG, and G cntdot TA. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 1992,89(9): 3840-3844.