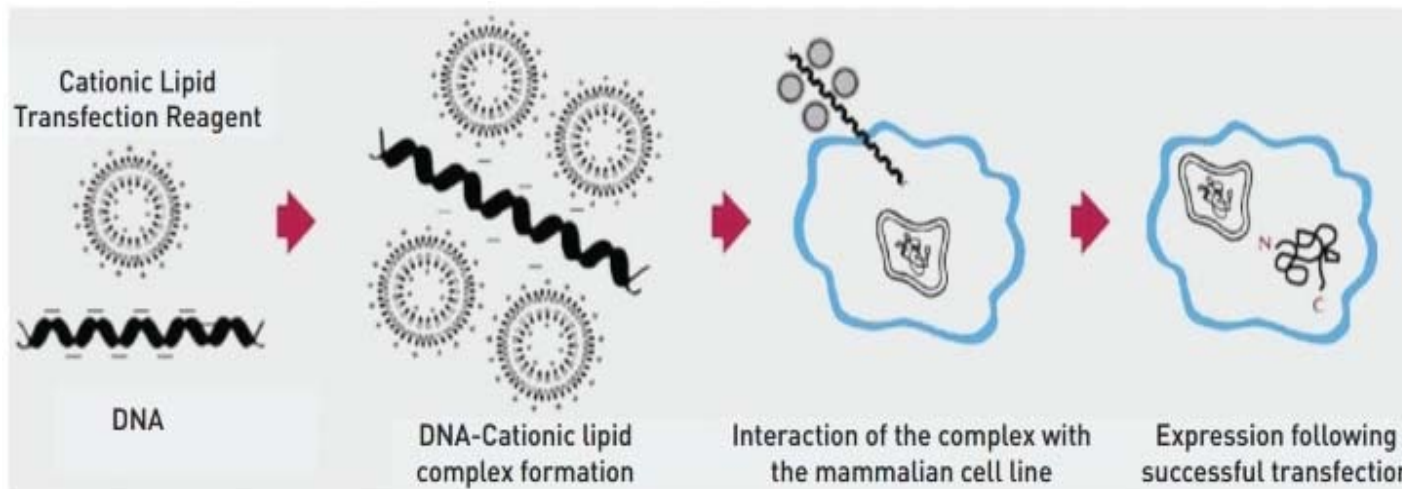


INTRODUCCION DE ADN EN CELULAS EUCARIOTAS ANIMALES EN CULTIVOS (MAMIFEROS): TRANSFECCION

Métodos Químicos: el agente químico forma un complejo que facilita la entrada del ADN en la célula: Precipitación con fosfato de calcio, DEAE dextran, liposomas neutros con ADN encapsulado o con lípidos catiónicos. El ADN entraría por endocitosis.

Lípidos catiónicos: son muy eficientes para hacer transfección con ADN, o ARN. La carga positiva del liposoma condensa el DNA cargado negativamente y facilita la interacción con la membrana celular cargada negativamente, formando una vesícula.

- El ADN entraría por endocitosis y debe eludir al endosoma, llega al núcleo y se puede transcribir. Si es ARN se traduce en el citoplasma y se pueden estudiar las proteínas.



Métodos Físicos

Microinyección de ADN en núcleos, biobalística, electroporación

- Para estudiar elementos regulatorios (promotores, enhancers)
- Podemos introducir genes para estudiar su función y regulación, ver como afecta el fenotipo
- Producir proteínas recombinantes con modificaciones postraduccionales
- Terapia génica: en células somáticas de animales vivos para tratar enfermedades.

Células de mamíferos en cultivo: fibroblastos, cel epiteliales (adherentes)

cel. de sangre, médula ósea, bazo (no adherentes)

La transfección puede ser estable o transitoria

ESTABLE:

- se integra en el genoma en un pequeño número de células formando un nuevo locus genético que se hereda a la progenie.

Transfección Transitoria: (transient): se mantiene en el núcleo en forma extracromosómica; persiste por un corto tiempo hasta que se degrada. **Para caracterizar elementos regulatorios**

-**Vector que no se replique**: no tiene un *ori* funcional en el huésped, 1-4 días después de la transfección aumenta RNAm y proteínas codificadas por el transgén, pero finalmente se degradan y se diluyen con la división celular.

-**Vector que se replique**: tiene un origen de replicación derivado de un virus (SV40 y polyoma virus murino) pueden alcanzar alto N° de copias, y necesitan la polimerasa del virus (antígeno T) que puede estar en el vector o en el genoma de la cél. huésped. Se obtiene alta expresión del transgén.

células COS: fibroblastos de riñón de mono, tienen integrado parte del genoma viral SV40 defectivo: expresan antígeno T SV40 constitutivo

(pueden replicar cualquier plásmido con el oriSV40)

células MOP-8: tienen integrado el genoma del polyoma virus, replican los plásmidos que tengan el ori del polyoma virus.

Algunos vectores tienen el ori para ambos virus y se pueden replicar en cél. permisivas para ambos. Ej. pcDNA1.1

-**Promotor** del citomegalovirus humano: P_{CMV}

-**Intrón y señales de poliadenilación SV40**: la presencia del intrón SV40 aumenta la expresión de los genes, actuaría como un elemento regulatorio y la señal de poly(A) SV40 es indispensable para el correcto procesamiento del RNA.

-**polilinker**

-ori del polyoma virus y ori SV40

-ori ColE1 para *E. coli*

-**marcador de Resistencia a Ampicilina**

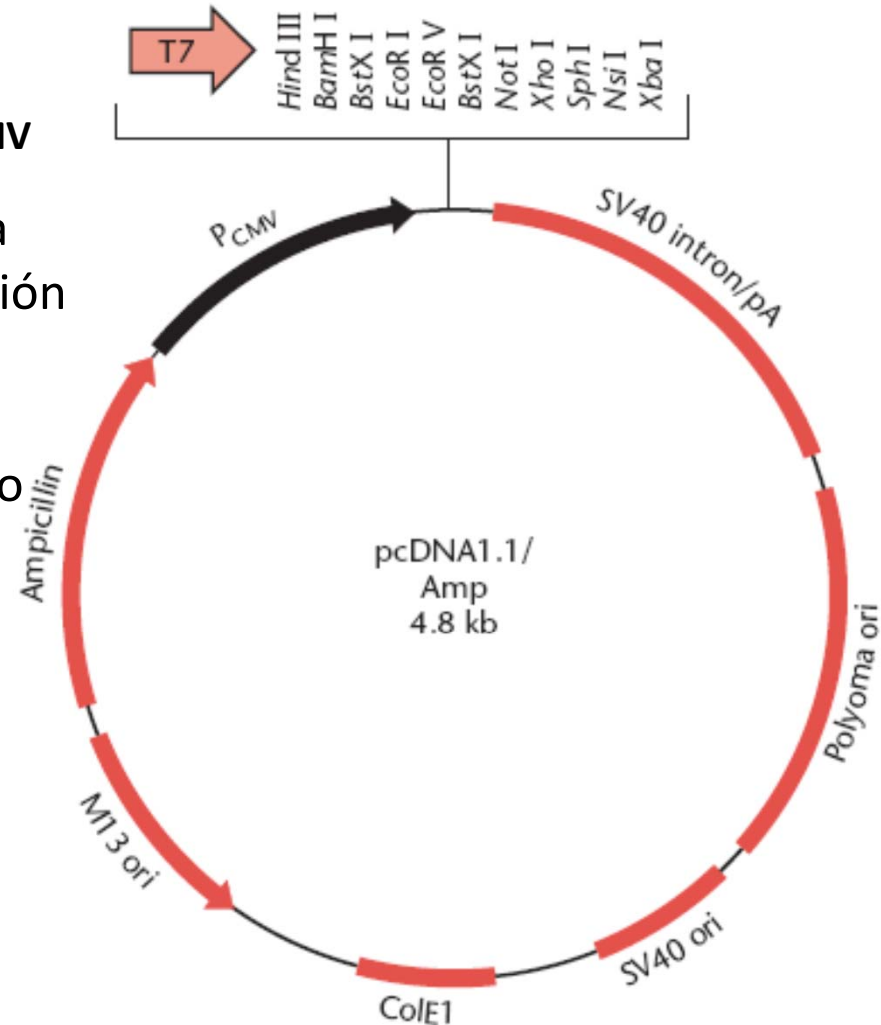


Fig. 10.4 The transient expression vector pcDNA1.1/Amp, which has origins of replication for both SV40 and murine polyomavirus. (Reproduced with permission from Invitrogen.)

TRANSFERENCIA DE GENES en células eucariotas POR TRANSDUCCION

Introducción de genes en células animales (mamíferos e insectos) explotando la habilidad que tienen los virus para entrar a la célula (células en cultivo y animales vivos)

El transgén puede reemplazar parte del genoma viral no esencial o agregarse al genoma por corte y ligación (muy laborioso!)

Virus más usados: adenovirus, retrovirus, baculovirus

Baculovirus: infectan artrópodos. Producen alta cantidad de polyhedrina, no esencial y se puede reemplazar por ADN exógeno. El gen introducido queda bajo el control del promotor de la polyhedrina. **Importante: porque se obtienen las proteínas con modificaciones post-traduccionales que no hacen las bacterias.**

Los baculovirus más usados para expresar proteínas recombinantes son



-AcMNPV (Autographa californica multiple nuclear polyhedrosis virus): líneas de células de **artrópodos**.

-BmNPV (Bombyx mori nuclear polyhedrosis virus): **gusano de seda** (silk worm)