

Transferència de gens en cèl.lules eucariotes.

Jordi Vives.

Servei d'Immunologia. Hospital Clínic i Provincial.
c/Villarroel, 170. Barcelona-36

Abstract.

Gene transfer in eucaryotic cells.

DNA-mediated gene transfer (transfection) is being used as one of the major tools to analyze the regulation of gene expression and other mechanisms involved in cell differentiation. In this brief review are described the current techniques for transfection i.e, DNA-precipitation with calcium phosphate, nuclear microinjection and protoplast fusion. These techniques require a system to allow selection and isolation of the transfected cells. The most used selective methods are also described: Timidine-Kinase (TK); hypoxanthine-phosphoribosyltransferase (HPRT); adenine-phosphoribosyltransferase (APRT); xanthine-guanine-phosphoribosyltransferase (xgpt); cell transformation, antibiotic geneticine (neo); and dehidrofolato reductase (DHFR) with decreased affinity for methotrexate (Mtx).

Attention is also focused on the characteristics of the DNA to be transfected. Transfections can be carried out with naked cellular DNA or by using several vectors. The vectors to be used for gene transfer should contain some characteristics such as an eucaryotic promoter and eucaryotic origin of replication together with the appropriate segments for splicing and polyadenilation of the transcript. Together with these data a strategy is outlined for the identification of structural genes and for the analysis of the relationship between structure and function of biologically active cellular molecules.

At the end is exposed a transfection method described by us. This new technique is used on lymphocytes and is based on the treatment of DNA and cells with polyethyleneglycol (PEG). Generalization of this method and analysis of the self-replication of the plasmid in the transfected cells comprise the current work in progress in our lab.

1. Introducció.

La transferència de DNA va ésser inicialment portada a terme en cèl.lules procariotes i precisament va ésser en uns experiments històrics en els quals es demostrava que el DNA era el portador de la informació genètica (Avery, OT et al, 1944). Posteriorment es va aplicar a cel.lules eucariotes amb el propòsit d'introduir-hi gens virals (Graham F.C., van der Eb. A.J., 1973). Durant la dècada de 1960 es varen fer diversos intents de transferir DNA en el interior de cèl.lules de mamífers. Si bé es van obtenir certs èxits (Szybalskam, E.H., Szybalski W. 1962), els resultats eren poc convincents i les tècniques poc reproduïbles. No es va obtenir un sistema apropiat fins que Wigler utilitzant la tècnica de precipitació de DNA amb fosfat càlcic descrita el 1973 per Graham i van der Eb va transferir el gen de la timidín quinasa (TK) a cèl.lules de ratolí. A partir d'aquesta època comencen a desenvolupar-se ràpidament altres mètodes de transfèrència de gens. Així mateix comença a utilitzar-se genèricament el terme de transfecció per denominar la transferència de gens en l'interior de les cèl.lules. Si bé s'havia aconseguit transferir gens en l'interior de les cèl.lules, la tècnica de la precipitació amb fosfat càlcic tenia una eficiència molt baixa. L'eficiència de transfecció era tan sols de 10^{-6} , és a dir només es transfectaven una de cada deu mil o milió de cèl.lules. Calia millorar aquesta eficiència. Per això es varen descriure diverses tècniques de les quals només altres dos són reproduïbles i es poden considerar com a mètodes alternatius a la tècnica descrita per Graham i van der Eb. Aquestes tècniques són la microinjecció (Capecchi M.R. 1980) i la fusió protoplàstica (Schaffner W., 1980). A continuació passem a comentar-les breument.:

2. Tecniques per a introduir el DNA en les cèl.lules.

2.1. Precipitació de DNA amb fosfat càlcic.

Aquest mètode es basa en afegir el DNA a una solució tamponada de fosfat, la qual es barreja amb una solució de clorur càlcic. Es forma un precipitat el qual s'afegeix directament sobre les cèl.lules.

Al cap d'unes hores es renten les cèl.lules afegint-se medi de cultiu normal. Aquest mètode té els inconvenients de que l'eficiència és molt baixa i que només es aplicable a un nombre limitat de tipus cel.lulars, generalment fibroblasts i cèl.lules adherents. No és útil per a cèl.lules en suspensió. Té, per altra banda els avantatges d'ésser un mètode molt reproducible i que permet utilitzar tant plàsmids com DNA cel.lular. Cal dir que si bé va ésser la primera tècnica que es va descriure, continua sent el mètode de transfecció més utilitzat.

2.2. Microinjecció.

Capecchi va descriure (Capecchi M.R. 1980) aquest mètode basat en la injecció directa de DNA en l'interior del nucli cel.lular. Va utilitzar com a cèl.lules receptores la línia cel.lular murina LMTK. L'eficiència d'aquesta tècnica és molt alta, es transfecten 1 de cada 500-1000 cèl.lules en forma estable. Obviament el gran inconvenient d'aquesta tècnica resideix en el nombre molt limitat de cèl.lules que es poden transfectar. Nogensmenys aquest mètode és de gran utilitat per transfectar ous fecundats i té una gran aplicabilitat en estudis embrionaris.

2.3.Fusió protoplàstica.

En un intent d'incrementar la freqüència de transfecció de la tècnica de precipitació amb fosfat càlcic, Schaffner(Schaffner 1980) va descriure un mètode en el qual va introduir un plàsmid en l'interior de E.Coli, tractava les bacteries amb lisozima i els protoplasts resultants els fusionava amb cèl.lules de mamífers. La fusió l'efectuava amb polietilenglicol. L'eficiència de transfecció arribava a ésser del 10 per cent. El mètode es va descriure originàriament en cèl.lules de ratolí, mono i humanes. Degut a la seva complexitat tècnica no ha estat una tècnica molt utilitzada, però té l'avantatge que permet efectuar transfeccions en alguns tipus de cèl.lules, en les quals no és eficaç la tècnica de precipitació amb fosfat càlcic.

Com hem vist al comentar aquestes tècniques la transfecció no es produeix a totes les cèl.lules, sinó només a un cert percentatge, en general molt petit de cèl.lules. Cal donç disposar d'elements que ens permetin seleccionar, aïllar i clonar, poblacions de cel.lules transfectades. De la mateixa manera que van sorgir diversos mètodes per a introduir el DNA en l'interior de las cèl.lules a transfectar, s'han dedicat molts esforços a trobar sistemes selectius que fossin altament sensibles i generalitzables. Obviament els millors medis son aquells que no permeten sobreviure a les cèl.lules no transfectades.

A continuació descriurem breument els principals sistemes selectius utilitzats. Aquests es poden dividir en dos grups. Els que utilitzen com a receptor linies cel.lulars mutants i els que es poden aplicar a cèl.lules normals.

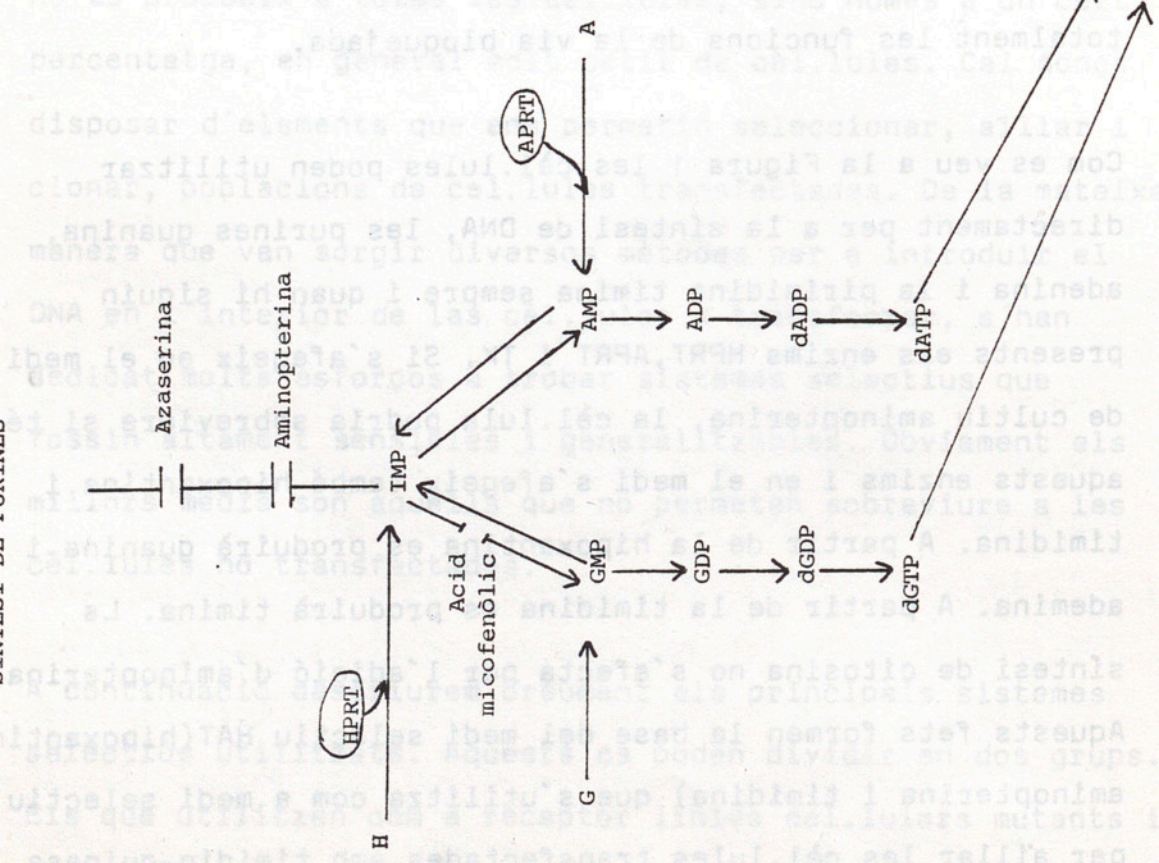
3. Selecció de cèl.lules transfectades.

3.1. Sistemes selectius que s'utilitzen en línies cel.lulars mutants.

Aquest grup està basat en l'utilització de cèl.lules deficitàries en un dels següents enzims: Timidin-quinasa (TK), hipoxantin-fosforibosiltransferasa (HPRT); adenin-fosforibosiltransferasa (APRT). Aquests enzims intervenen en la síntesi de nucleòtids. En les cèl.lules normals de mamífers, la síntesi de deoxiribonucleòtids té lloc a través de dues vies alternatives: la via natural (salvatge pathway) que utilitza les bases lliurades en el curs de la destrucció cel.lular i la síntesi "de novo" que és totalment independent de la primera. Si una de les vies queda destruïda per alguna mutació, l'altre via pot suplir totalment les funcions de la via bloquejada.

Com es veu a la Figura 1 les cèl.lules poden utilitzar directament per a la síntesi de DNA, les purines guanina, adenina i la pirimidina timina sempre i quan hi siguin presents els enzims HPRT, APRT i TK. Si s'afegeix en el medi de cultiu aminopterina, la cèl.lula podria sobreviure si té aquests enzims i en el medi s'afegeix també hipoxantina i timidina. A partir de la hipoxantina es produirà guanina i adenina. A partir de la timidina es produirà timina. La síntesi de citosina no s'afecta per l'addició d'aminopterina. Aquests fets formen la base del medi selectiu HAT (hipoxantina aminopterina i timidina) que s'utilitza com a medi selectiu per aïllar les cèl.lules transfectades amb timidin-quinasa (TK) o hipoxantin-guanina-fosforibosiltransferasa (HPRT).

SINTESE DE PURINES



SINTESE DE PIRIMIDINES

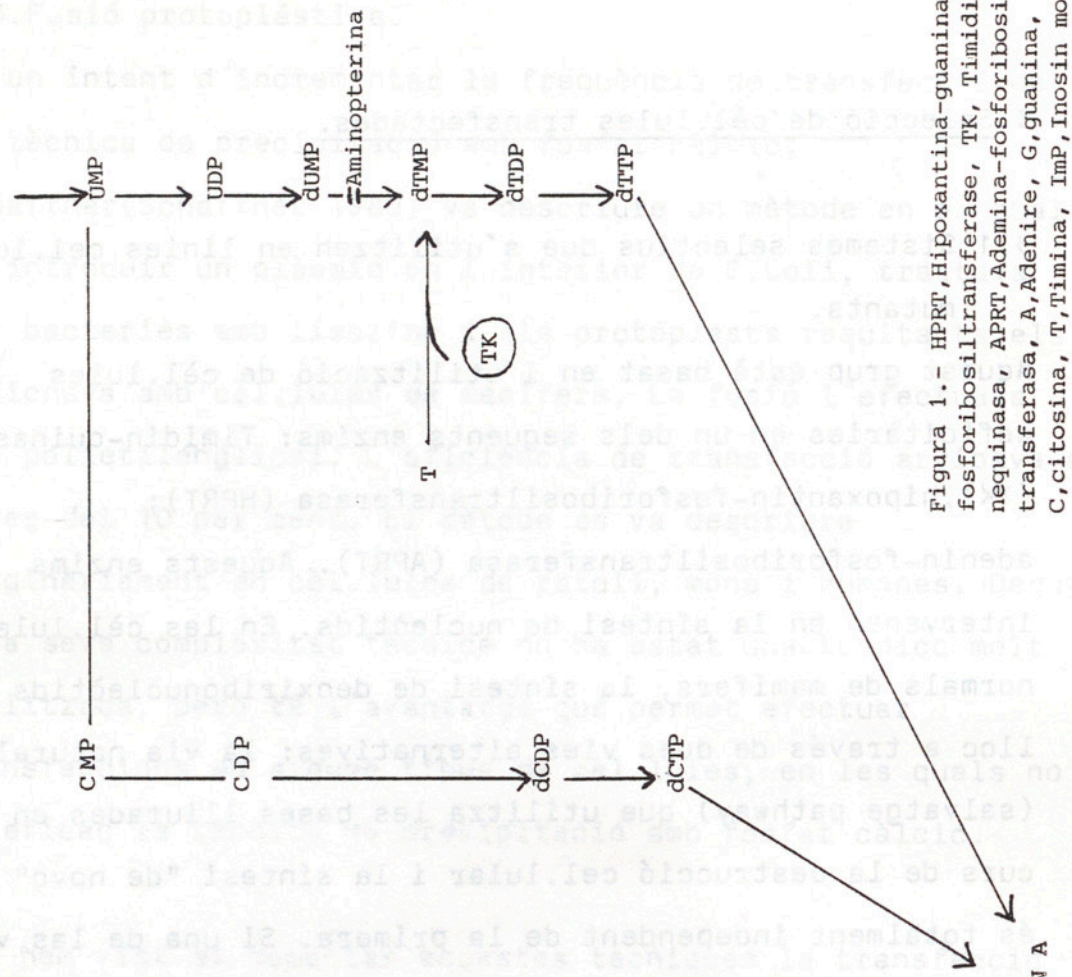


Figura 1.- HPRT, Hipoxantina-guanina-fosforibosiltransferase, TK, Timidi-nequinasa, APRT, Adenina-fosforibosil-transferasa, A, Adenire, G, guanina, C, citosina, T, Timina, Imp, Inosin monofosfato, UMP, uridinmonofosfato.

Després d'aquestes consideracions generals farem uns breus comentaris de cada un dels sistemes selectius.

3.1.1. Timidin-quinasa (TK).- Existeixen un gran nombre de línies cel·lulars que són deficitàries en aquest enzim. Per altra banda el virus de l'Herpes Simplex té un gen que codifica per la TK. Wigler i al (1977) van aïllar aquest gen i mitjançant la tècnica de precipitació amb fosfat càlcic el varen transfectar a cèl·lules murines TK⁻. Les cèl·lules transfectades sobreviuen en medi HAT.

Cal dir que si bé aquest sistema selectiu requereix línies cel·lulars TK⁻, és un sistema altament reproducible, molt selectiu i en l'actualitat és un dels sistemes selectius més utilitzats en la transfecció

3.1.2. Hipoxantin-fosforibosiltransferasa (HPRT).- Com es veu a la fig.1 aquest enzim és necessari per a la síntesi de G i A per la via natural. Aquest sistema és molt emprat sobretot per les tècniques d'hibridització somàtica i a finals de la dècada dels setanta es va introduir com a marcador selectiu en la transfecció de línies murines HPRT⁻ amb DNA de cèl·lules HPRT⁺ (Wilecke et al 1979).

Posteriorment Lester et al 1980 va reproduir la transfecció utilitzant el gen humà codificador de la HPRT. (Alguns autors, d'aquest enzim en diuen hipoxantin-guanin-fosforibosil transferasa (HGPRT)).

3.1.3. Adenin-fosforibosiltransferasa (APRT).- Aquest sistema selectiu està basat en el fet que l'azaserina bloqueja la biosíntesi de novo de les purines (fig.1) i que aquest bloqueig pot ésser compensat mitjançant l'adició d'adenina que pot ésser utilitzada per a la síntesi de purines sempre i quan hi estigui present l'enzim adenin-fosforibosiltransferasa (APRT). La síntesi de les pirimidines no queda afectada per aquest bloqueig. L'equip de Wigler et al(1979) varen utilitzar per primera vegada aquest sistema utilitzant com a medi selectiu azaserina i adenina. Cèl.lules de ratolí APRT⁻ es varen transfectar amb DNA de cèl.lules aprt⁺. Aquest sistema és menys utilitzat que l'anterior degut al poc nombre de línies cel.lulars APRT⁻.

3.2. Sistemes selectius que s'utilitzen en línies cel.lulars normals.

Aquest grup està format per elements molt més heterogenis. Els més desenvolupats són l'enzim xantin-guanin-fosforibosiltransferasa (XGPT), la transformació cel.lular, la resistència l'antibiòtic geneticina i la mutant de dehidrofolatoreductasa (DHFR) de poca afinitat pel metotrexat. A continuació comentarem les característiques d'aquests quatre sistemes selectius.

3.2.1. Xantin-guanin fosforibosiltransferasa (xgpt).- Aquest sistema selectiu es basa en el fet que les cèl.lules de mamífers no són capaces de sintetitzar guanina a partir de la xantina, mentre que l'*Escherichia coli* pot portar a terme aquest pas ja que té un gen que codifica per l'enzim

xantin-guanin fosforibosiltransferasa (xgpt). L'equip de P.Berg (Mulligan R.C., Berg P.1981) va aïllar aquest gen, el va introduir a un plàsmid i va transfectar-lo a cèl.lules de ratolí i primats. Com a medi selectiu va utilitzar àcid micofenòlic i xantina. L'àcid micofenòlic bloqueja la síntesi de guanina a partir de IMP (Fig.2). Les cèl.lules en presència d'àcid micofenòlic només poden sintetitzar guanina a partir de la xantina si tenen l'enzim xgpt. Si bé aquest sistema selectiu va ésser introduït fa pocs anys cada vegada s'utilitza amb més gran freqüència degut a què es pot emprar en pràcticament tots els tipus cel.lulars.

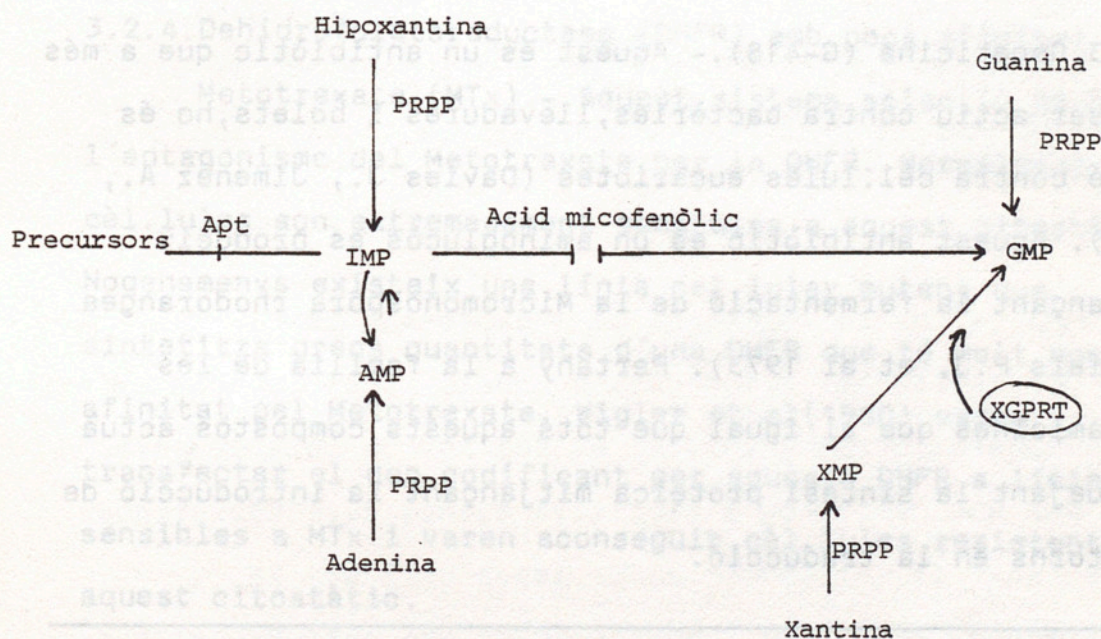


Figura 2.- XGPRT, xantin-guanin fosforibosiltransferasa, fosforibosilpirofosfato.

3.2.2. Transformació Cel.lular*.- La transfecció ha estat una eina fonamental per al descobriment dels oncogens. Línies cel.lulars no tumorigèniques es transformaven en tumorigèniques mitjançant la transfecció amb DNA de cèl.lules tumorals utilitzant la tècnica del fosfat càlcic. Aquesta metodologia va ésser introduïda per l'equip de Weinberg (Smotkin D, et al 1975) utilitzant com a cèl.lules receptores fibroblasts murins NIH 3T3. En aquest sistema no hi ha cap medi selectiu. Les cèl.lules transfectades es detecten mitjançant la formació de focus de fibroblasts que es fan més retràctils, refringents i s'acumulen unes sobre altres. Aquests focus es poden detectar microscòpicament i injectats a ratolins proliferen com tumors.

3.2.3. Geneticina (G-418).- Aquest és un antibiòtic que a més d'ésser actiu contra bacteries, llevadures i bolets, ho és també contra cèl.lules eucariotes (Davies J., Jimenez A., 1980). Aquest antibiòtic es un aminoglucòs es produeix mitjançant la fermentació de la *Micromonospora rhodorangea* (Daniels P.J. et al 1973). Pertany a la família de les gentamicines que al igual que tots aquests compostos actua bloquejant la síntesi proteica mitjançant la introducció de trastorns en la traducció.

* El terme transformació s'ha utilitzat també per a denominar les cèl.lules que havien estat transfectades, sia qual sia els canvis genotípics ó fenotípics que experimentessin. Degut a que aquesta terminologia induïa a confusió, en l'actualitat es té tendència a denominar cèl.lules transformades tan sols aquelles que han sofert un canvi cap a l'oncogenicitat, aplicant-se genèricament el terme de transfecció a la transferència de gens.

Pot ésser inactivat per les fosfotransferases bacterianes APH (3') I i APH(3')II codificats pels transposons Tn601 i Tn5 respectivament (Davies J., Smith D.I., 1978). Com es va comprovar que el Tn5 també conferia resistència a la neomicina, se li va dir gen neo (Jorgensen et al 1979). Aquest gen va ésser introduït a diferents plàsmids, els quals es varen transfectar a diversos tipus cel.lulars (Colbère-Garapin F. et al 1981; Southern P.J., Berg P. 1982). Les cèl.lules transfectades sobreviuen i proliferaven en un medi contenint Geneticina (G-418).

3.2.4. Dehidrofolato reductasa (DHFR) amb poca afinitat pel Metotrexate (MTx).- Aquest sistema selectiu es basa en l'antagonisme del Metotrexate per la DHFR. Normalment les cèl.lules son extremadament sensibles a aquest citostàtic. Nogensmenys existeix una línia cel.lular mutant que sintetitza grans quantitats d'una DHFR que té molt poca afinitat pel Metotrexate. Wigler et al (1980) varen transfectar el gen codificant per aquesta DHFR a línies sensibles a MTx i varen aconseguir cèl.lules resistents a aquest citostàtic.

4. La transferència de gens com instrument per l'estudi de la diferenciació cel.lular.

Un dels problemes més importants que te plantejada avui en dia la Biologia es el desxiframent dels mecanismes de diferenciació cel.lular i d'organogènesi. Aquestes dues temàtiques s'estan abordan des de varies angles. Sens dubte la transfecció està essent un instrument de gran valua per coneixer els mecanismes moleculars d'aquests procesos. Entre aquest els problemes a resoldre cal mencionar la regulació de l'expressió gènica, l'identificació de gens codificants de factors inductors de la regulació i la funció de receptors i altres proteïnes, per citar només alguns dels mes importants. Pasem doncs a veure breument com es poden analitzar aquests problemes mitjançant la transferència de gens.

4.1. Anàlisi de la regulació de l'expressió gènica.

Aquí no descriurem, per motius d'espai, totes les troballes que la transfecció ha aportat al anàlisi de la regulació, sinó que ens centrarem a descriure quines característiques ha de tenir el vector per poder ésser útil per la transfecció. Quan s'ha identificat un gen estructural i es vol introduir en una cèl.lula eucariota, lo que es fa es lligar-lo a un vector, clonar-lo i aleshores introduir-lo, en la cèl.lula eucariota mitjançant alguna de les tècniques anteriorment descrites.

A fi de que els vectors siguin útils per transferir gens a cèl.lules eucariotes han de tenir un promotor eucariota, un origen de replicació eucariota i un segment que assegurí el retallament (splicing) i la poliadenilació del transcript. En general aquests fragments de DNA s'obtenen a partir de virus que infectan cèl.lules de mamífers. Es a dir s'incorporen en el vector elements que confereixin en el plàsmid la capacitat de replicar-se i integrar-se dintre la cèl.lula eucariota. Seguint aquesta metodologia Paul Berg (1981) va desenvolupar una serie de vectors a partir del virus SV40. Altres autors (Colbere-Garapin et.al.1981) han utilitzat el virus de l'Herpes simplex(HSV). Obviament els plàsmids han de contenir també un segment necessari per la replicació a E.Coli (generalment un segment derivat del plàsmid pBR322) i un fragment que li confereixi resistència a la Tetraciclina o Ampicilina. En la fig.3 es representa genèricament la composició d'aquests tipus de plàsmids.

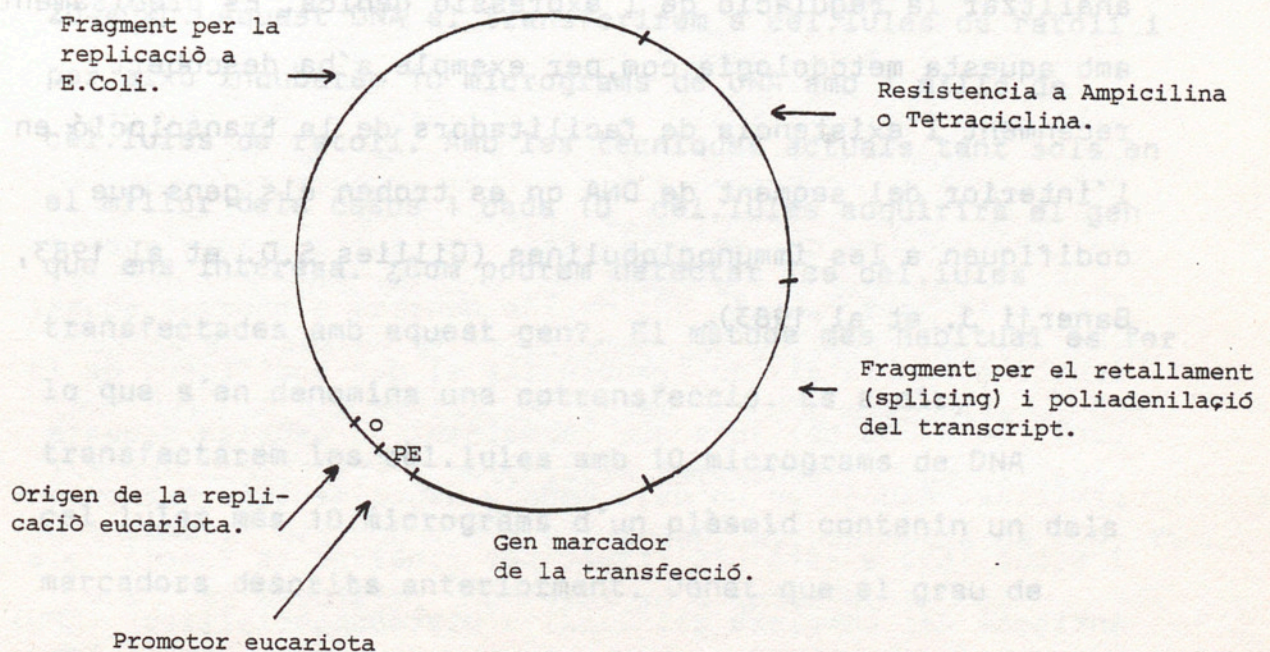


Figura 3.

Mitjançant aquests plàsmids s'han introduït a cèl.lules de mamífers alguns dels gens que abans hem esmentat com a marcadors selectius (Mulligan R.C., Berg P.1980, Southern P.J., Berg P., 1982, Hamer D.H., Leder P.,1979) ó bé d'altres d'interés per cert tipus d'estudis. Entre aquests darrers cal citar el gen de la B-globulina de conill (Mulligan R.C. et al 1979), Wold B. et al 1979) ó els gens d'immunoglobulines de ratolí (Oi et al 1983).

La contrucció de recombinants dels gens a transfectar permet analitzar quines son les característiques que han de tenir els promotors, quin és el paper que juguen els introns o les seqüències que enmarcan els gens estructurals. Es a dir, l'introducció, modificació o deleció de diverses seqüències en els gens d'estudi en qüestió i la posterior integració a un vector i transfecció és un dels instruments útils per analitzar la regulació de l'expressió gènica. Es precisament amb aquesta metodologia com, per exemple, s'ha descobert recenment l'existència de facilitadors de la transcripció en l'interior del segment de DNA on es troben els gens que codifiquen a les immunoglobulines (Gillies S.D. et al 1983, Banerji J. et al 1983).

4.2. Identificació de gens.

Les dues formes més usuals d'identificar gens estructurals és a través de l'aïllament del mRNA o bé utilitzant la transferència de gens. Aci ens centrarem només en aquest segon aspecte. Com hem exposat abans els oncogens es varen identificar mitjançant la transferència de gens. En aquest cas era relativament senzill detectar la presència de cèl.lules transfectades. La formació de focus de creixement cel.lular ens indica clarament quines son les cèl.lules transfectades. El problema esdeve molt més complexe quan volem detectar gens codificants per proteïnes de membrana, proteïnes secretades ó bé citoplàsmiques. El principal problema en que topem es el de la baixa eficiència de transfecció. Posem, per exemple, el cas de que ens interesi aïllar el gen codificant d'una proteïna de membrana característica de les cèl.lules humanes. El procés que seguirem serà extreure el DNA de les cèl.lules humanes mitjançant una tècnica que ens produirà fragments de 20-40kb. Aquest DNA el transferirem a cèl.lules de ratolí i per això incubarem 10 micrograms de DNA amb 1 milló de cèl.lules de ratolí. Amb les tècniques actuals tant sols en el millor dels casos 1 cada 10 cèl.lules adquirirà el gen que ens interessa. ¿Com podrem detectar les cèl.lules transfectades amb aquest gen?. El mètode més habitual és fer lo que s'en denomina una cotransfecció. Es a dir, transfectarem les cèl.lules amb 10 micrograms de DNA cel.lular més 10 micrograms d'un plàsmid contenen un dels marcadors descrits anteriorment. Donat que el grau de

cotransfecció es al voltant del 80 per cent, (Pellicer et al 1980) es a dir, vuit de cada deu cèl.lules transfectades incorporen els dos tipus de DNA, cultivarem les cèl.lules en medi selectiu (HAT, o àcid micofenòlic,...) i només amb les cèl.lules que sobreviuen pasarem a analitzar si han estat transfectades amb el gen codificant per la proteïna de membrana. En aquest cas ho farem per immunofluorescència, incubarem les cèl.lules amb un anticòs específic marcat amb fluoresceïna.

Un cop identificades les cèl.lules de ratolí que expresen la proteïna humana es passarà a l'aïllament del gen que la codifica. Per això hi han varies mètodes que no detallarem aquí per manca d'espai, però entre els que cal citar l'identificació de les seqüències repetitives Alu humanes (Schmid C.W., Jelinek W.R. 1982).

4.3. Estudi de la relació entre estructura i funció dels productes gènics.

La clonació gènica permet obtenir gran quantitat d'una mateixa proteïna i poder, d'aquesta manera, fer estudis estructurals. Nogensmenys que moltes vegades es coneix molt bé l'estructura de les molècules, en tant que poca cosa se sap de la seva funció. Una de les maneres d'abordar aquest problema consisteix en transfectar el gen codificant de la proteïna a una cèl.lula que normalment no expressa aquesta proteïna. Aquest es un dels models experimentals que en l'actualitat s'està utilitzant per conèixer la funció dels antigens del complex principal d'histocompatibilitat (CPH) (Goodenow R.S. et al 1982).

Altre problema que es planteja és el de coneixer quines són les parts actives d'una molècula, i en el cas de que aquesta sigui multifuncional s'ha d'esbrinar quina funció té cada part de la molècula. Per això, lo que actualment es fa es introduir modificacions a la seqüència de DNA que codifica per la proteïna en qüestió i transfectar el gen modificat. Un cop transfectades les cèl.lules es verifiquen les característiques funcionals de les mateixes. Aquest tipus d'anàlisi s'ha dut recentment a terme amb els antigens de classe I del CPH. (Murre C. et al 1984).

5. Línies de treball del nostre Laboratori.

Les tècniques de transfecció que hem descrit al inici del article han sigut infructuoses en quan a la seva aplicació a cèl.lules en suspensió, i fonamentalment a limfòcits. Tanmateix recentment s'ha descrit la transfecció de línies de cèl.lules plasmàtiques (Oi U.T. et al 1983), si bé amb eficiències molt baixes del ordre de 10^{-4} - 10^{-6} . Guiats per l'afany de trobar una nova tècnica que permetès una eficient transfecció de limfòcits i durant una recent estada a The Salk Institute de California vaig passar a punt amb Rod Langman una nova tècnica per transfectar limfòcits. Aquesta tècnica es basa en el tractament amb polietilenglicol (PEG), tant del DNA com de les cèl.lules. El PEG precipita el DNA (Lerman L.S. 1973) i augmenta la permeabilitat cel.lular. L'incubació del DNA i les cèl.lules amb presència de PEG, fa que el DNA precipiti i penetri en l'interior de les cèl.lules. Al passar a punt aquesta tècnica varem utilitzar l'antibiòtic geneticina com a medi selectiu i com a DNA donant es va emprar el plàsmid pSV2neo donat per en P.Berg.

L'eficiència que varem obtenir va ésser molt alta, del voltant del 10%. La tècnica es va provar amb la línia murina de limfòcits T, Bw5147.

Un fet sorprenent es que en aquest cas el plàsmid no s'integra, sinó que es replica en l'interior de la cèl.lula. En l'actualitat estem estudiant aquí en el laboratori de Barcelona, quins son els mecanismes que permeten replicar autonomament el plàsmid, per altre banda estem intentant generalitzar aquesta tècnica a altres línies limfoides, un tercer punt que volem analitzar però encara no està començat es la transfecció a limfòcits de gens eucariotes humans, concretament, gens de classe I del CPH.

6. Perspectives.

La transferència de gens com a metodologia encara està en una fase molt preliminar. Les eficiències obtingudes son encara molt baixes, el mètode no es generalitzable a tots els tipus cel.lulars, l'integració en el genoma cel.lular, es fa en forma no controlada, i tampoc es pot controlar el nombre de còpies que s'incorporen. Aquests son alguns del principals punts metodològics que cal resoldre.

La transfecció és i continuarà essent un gran instrument d'anàlisi. Només en alguns casos molt concrets podrà tenir una aplicació "in vivo", com a eina terapèutica. Cal dir que experimentalment s'han fet ja diversos treballs d'aquest tipus (Palmiter R.D. et al 1982). Nogensmenys que les aplicacions terapèutiques no podran portar-se a terme fins que no es tinguin resols els punts anteriorment esmentats.

BIBLIOGRAFIA

Avery, O.T., McCleod, C.M., McCarty M. (1944). Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. Induction of transformation by a deoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type III. J. Exp. Med. 79, 137-158

Banerji J., Olson L., Schaffner W. (1983). A lymphocyte-specific cellular enhancer is located downstream of the joining region in immunoglobulin heavy chain genes (1983). Cell. 33, 729-740.

Berg P. (1981). Dissections and reconstructions of genes and chromosomes. Science 213, 296-303

Capecchi M.R. (1980). High efficiency transformation by direct microinjection of DNA into cultured mammalian cells. Cell 22, 479-488.

Colbère-Garapin F., Horodniceanu F., Kourisky P., Garapin A-C (1981). A new dominant hybrid selective marker for higher eukaryotic cells. J. Mol. Biol. 150, 1-14.

Daniels P.J.L., Yehashel A.J., Morton J. (1973). The structure of antibiotic G-418 13th Interscience Conference on antimicrobial agents and chemotherapy, Abstract 137.

Davies J., Jimenez A. (1980). A new selective agent for eucariotic cloning vectors. Am. J. Trop. Med. Hyg. 29(5) suppl. 1089-1092

Davies J. Smith D.I. (1978). Plasmid determined resistance to antimicrobial agents. Annu. Rev. Microbiol. 32, 469-518.

Gillies S.D., Morrison S.L., Oi U.T., Tonegawa S. (1983). A tissue-specific transcription enhancer element is located in the major intron of a rearranged immunoglobulin heavy chain gene. Cell, 33, 717-728.

Goodenow R.S., McMillan M., Nicolson M., Taylor Sher B., Eakle K., Davidson N., Hood L. (1982). Identification of the class I genes of the mouse major histocompatibility complex by DNA-mediated gene transfer. Nature 300, 231-237

Graham F.L., Van der E. b. (1973). A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. Virology 52, 456-467.

- Hamer D.H., Leder P.(1979). Expression of the chromosomal mouse B-globulin gene cloned in SV40. Nature 281, 35-40.
- Jorgensen R.A., Rothstein S.J., Rejnikoff W.S.(1979). A restriction enzyme cleavage map of Tn5 and location of a region encoding neomycin resistance. Molec.Gen.Genet. 177, 65-72
- Lerman L.S.(1973). Chromosomal analogues: Long-range order in Ψ -condensed DNA. Cold Spring Harbor Symp.Quant.Biol. XXXVII, 59-73.
- Lester,S.C., Le Van, Steglich, Demars R.(1980). Expression of human genes for adenine phosphoribosyltransferase and hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase after genetic transformation of mouse cells with purified human DNA. Somat Cell Genet. 6, 241-259.
- Mulligan R.C., Berg P.(1981). Selection for animal cells that express the Escherichia coli gene coding for xantine-guanine phosphoribosyltransferase. Proc.Nat.Acad.Sci. 78, 2072-2076.
- Mulligan R.C.,Berg P.(1980). Expression of a bacterial gene in mammalian cells. Science 209,1422-1427
- Mulligan R.C.,Howard B.H.,Berg P.(1979). Synthesis of rabbit B-globulin in cultured monkey kidney cells following infection with a SV40 B-globulin recombinant gene.Nature 277, 108-114.
- Murre C., Reiss C.S.,Bernabeu C., Bo Chen L.,Burakoff S.J.,Seidman J.G.(1984). Nature 307, 432-436.
- Oi U.T., Morrison S.L., Herzenberg L.A., Berg P.,(1983). Immunoglobulin gene expression in transformed lymphoid cells. Proc.Natl.Acad.Sci. 80, 825-829.
- Palmiter R.D.,Brinster R.L., Hammer R.E., Trumbauer M.E., Rosenfeld M.G., Biruberg N.C., Evans R.M.(1982). Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes. Nature 300, 611-615.

Pellicer A., Robins D., Wold B., Sweet R., Jackson J., Lowy I., Roberts J.M., Sim G.K., Silverstein S., Axel R. (1980). Altering genotype and phenotype by DNA-mediated gene transfer. Science 209, 1414-1422.

Schaffner W. (1980). Direct transfer of cloned genes from bacteria to mammalian cells. Proc.Natl.Acad.Sci. 77, 2163-2167

Schmid C.W., Jelinek W.R. (1982). The Alu family of dispersed repetitive sequences. Science 216, 1065-1070.

Smotkin D., Gianni A.M., Rozenblatt, Weinberg R.A. (1975). Infections viral DNA of murine leukemia virus. Proc.Nat. Acad.Sci. 72, 4910-4913.

Southern P.J., Berg P. (1982). Transformation of mammalian cells to antibiotic resistance with a bacterial gene under control of the SV40 early region promoter. J.Mol.Appl.Genet., 1, 327-341.

Szybalska E.H., Szybalski W. (1962). Genetics of human cell lines, IV. DNA-mediated heritable transformation of a biochemical trait. Proc.Natl.Acad.Sci., 48, 2062-2034

Wigler, M., Silverstein, S., Lee L.S., Pellicer A., Cheng T., Axel R. (1977). Transfer of purified Herpes virus thymidine kinase gene to cultured mouse cells. Cell 11, 223-232.

Wigler M., Pellicer A., Silverstein S., Axel R., Urlaub G., Chasin L. (1979). DNA-mediated transfer of the adenine phosphoribosyltransferase locus into mammalian cells. Proc.Nat.Acad.Sci. 76, 1373-1376

Wigler M., Perucho M., Kurtz D., Dana S., Pellicer A., Axel R., Silverstein S. (1980). Transformation of mammalian cells with an amplifiable dominant-acting gene. Proc.Natl.Acad.Sci. 77, 3567-3570.

Willecke, K., Klomfass M., Mieran R., Doehmer J. (1979). Intraspecies transfer via total cellular DNA of the gene for hypoxanthine phosphoribosyltransferase into cultured mouse cells. Mol.gen.Genet. 170, 179-185.

Wold B., Wigler M., Lacy E., Maniatis T., Silverstein S., Axel R. (1979). Introduction and expression of a rabbit B-globulin gene in mouse fibroblasts. Proc.Natl.Acad.Sci. 5684-5688.