



Universidad Nacional de Chimborazo
Facultad de Ciencias de la Salud
Carrera de Enfermería
Biología

9/10

UNIDAD I

APRENDIZAJE AUTÓNOMO COLABORATIVO

Paralelo: _B_ Grupo No.: __1__

FECHA: 19/05/2025

Tema artículo científico sobre: Célula eucariota: Concepto, estructura y función

Título del Artículo Científico: Transfección de DNA en células eucariontes

Autores: A.Rocha, S.Ruiz, J.M.Coll

Publicado en la Revista: Research Gate Investigación Agrícola de producción animal.

Año: 2002

Volumen: 17

Número: 1-2

Páginas: 17

APELLIDOS Y NOMBRES	No. DE CÉDULA
ALEJO JIMÉNEZ SIDNEY MAITE	1900946607
ATUPAÑA BACUY MAYRA LIZETH	0606089779
CAIZAGUANO YUCAILLA GLENDA PAMELA	0650098767
CALI VARGAS ERIKA ALEXANDRA	0605565464

INTRODUCCIÓN:

La transfección de DNA en células eucariontes es una herramienta esencial en biotecnología, medicina y biología molecular. A pesar del desarrollo de diversos métodos, la eficiencia y reproducibilidad de estos procesos sigue siendo limitada debido a barreras celulares como las membranas plasmáticas, endosomales y nucleares. El uso de complejos DNA-liposomas catiónicos ha mejorado notablemente la eficiencia transfeccional, pero aún enfrenta obstáculos que reducen la expresión génica. Esta revisión analiza los mecanismos de entrada de estos complejos en las células y estrategias para mejorar su translocación hacia el núcleo, donde se produce la transcripción del transgén.

MATERIALES Y MÉTODOS:

Dado que el trabajo es una revisión, no se emplearon materiales experimentales directos. Sin embargo, se discuten en profundidad materiales comúnmente usados en estudios de transfección como: Liposomas catiónicos (DOTAP, DOPE, DOGS, etc.) Plásmidos de DNA Técnicas de apoyo: electroporación, ultrasonidos, bombardeo con micropartículas Agentes lisosomotrópicos (cloroquina, sacarosa, Ca^{++}) Péptidos con señales de localización nuclear (NLS)

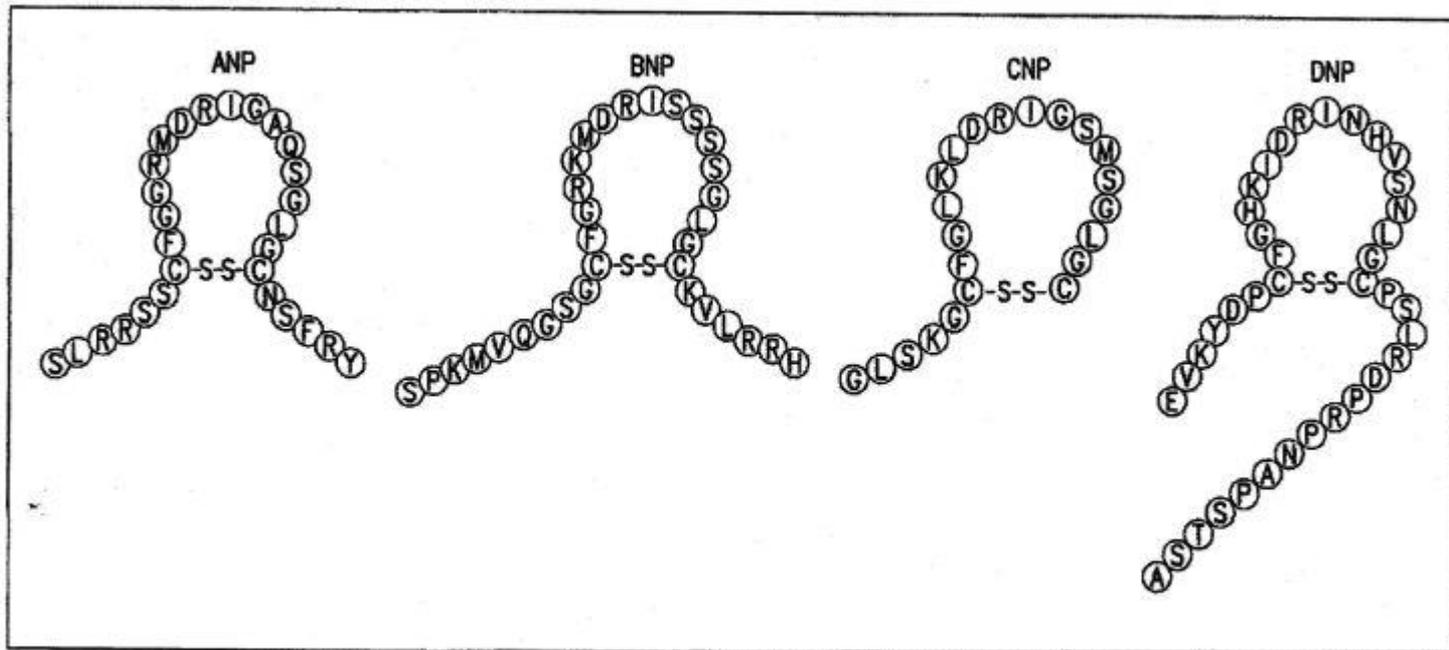


FIG. 1

Tabla 1**Algunos de los lípidos más usados para formar complejos DNA-liposomas catiónicos**

Nombre	Función	Fórmula
DOPE	neutral y fusogénico	1,2 dioleoil-3-fosfatidiletanolamina
DOTAP	lípidio catiónico	1,2 dioleoil-3-trimetilamonium propano
DOGS	lípidio catiónico	di-octadecilamidoglicil-espermina
Tfx	lípidio catiónico	tetrametilhidroxietil, 2,3 dioleoil, 1,4 butanediamonio ioduro
DPC	lípidio estructural	1,2 dioleoil - 3 - forfatidilcolina
Colesterol	lípidio estructural	colesterol

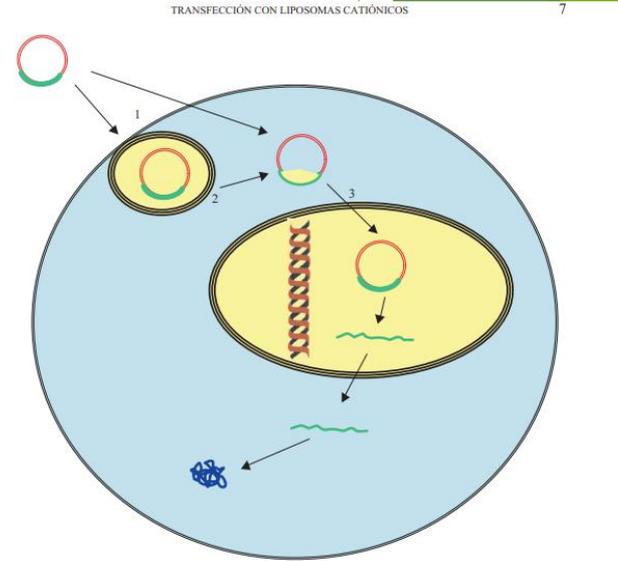
Tabla 2**Posibles métodos para incrementar la eficiencia de transfección del DNA acompañado con liposomas catiónicos**

Membrana	Método	Referencia
Plasmática	Ultrasonidos	(Lawrie <i>et al.</i> , 1999)
	Electroporación	(Colosimo <i>et al.</i> , 2000)
	Péptidos quiméricos	(Morris <i>et al.</i> , 1999)
Endosoma	pH (cloroquina)	(Luthman y Magnusson, 1983)
	Ca ⁺⁺	(Lam y Cullis, 2000)
	Péptidos quiméricos	(Haensler y Szoka, 1993)
Núcleo	Mitosis	(Tseng <i>et al.</i> , 1999)
	NLS	(Aronsohn y Hughes, 1997)
	Péptidos quiméricos	(Ogris <i>et al.</i> , 2001)

RESULTADOS:

El artículo es de tipo revisión bibliográfica. Se realizó una recopilación y análisis crítico de publicaciones científicas previas relacionadas con: Mecanismos de entrada celular de los complejos DNA-liposomas Factores celulares que afectan la eficiencia de la transfección Estrategias para superar las barreras intracelulares (uso de péptidos, ultrasonidos, modificaciones del DNA) Evaluación de variables que influyen en la eficiencia y seguridad del proceso

La transfección con liposomas catiónicos alcanza eficiencias de hasta ~50 % en condiciones óptimas. Se identificaron múltiples puntos críticos en el transporte intracelular: membrana plasmática, endosomas y membrana nuclear. Factores como el pH endosomal, el ciclo celular (mitosis), y la presencia de señales NLS son determinantes para el éxito del proceso. Métodos físicos como la electroporación y la sonicación mejoran la entrada celular. Agentes lisosomotrópicos y modificaciones del plásmido aumentan significativamente la expresión del transgén.



DISCUSIÓN:

La limitada eficiencia de la transfección con liposomas catiónicos está relacionada con las múltiples barreras celulares. Aunque los liposomas mejoran la entrada del DNA al citoplasma, no garantizan su acceso al núcleo, especialmente en células en reposo. Se destaca la importancia de sincronizar las células en mitosis o utilizar señales NLS para facilitar el transporte nuclear. La combinación de métodos físicos y químicos puede potenciar notablemente la expresión génica, aunque aún se requieren estudios para estandarizar condiciones y reducir la citotoxicidad.

CONCLUSIONES:

Los complejos DNA-liposomas representan una herramienta eficiente para la transfección génica, pero su efectividad depende de la superación de varias barreras celulares. El uso de métodos complementarios como ultrasonidos, agentes lisosomotrópicos y señales de localización nuclear puede mejorar significativamente la expresión de los transgenes. La optimización conjunta de los factores del complejo, del DNA y del entorno celular es clave para aumentar la reproducibilidad y eficacia del proceso.

Los lípidos catiónicos tienen una cabeza polar cargada positivamente que forma complejos con las cargas negativas del DNA y una parte hidrofóbica constituida por ácidos grasos. Generalmente se usa el ácido oleico (C18:1) debido a su mayor flexibilidad y menor temperatura de fusión. Los posibles métodos para incrementar la eficiencia de la transfección de una determinada construcción plasmídica que codifica un transgén con liposomas catiónicos (Felgner et al., 1987) se han clasificado en métodos para atravesar las membranas celular, endosomal y nuclear. Los péptidos pueden ser monofuncionales o quiméricos (péptidos con distintas actividades unidos covalente o no covalentemente). Las funciones que se escogen para el diseño de los péptidos quiméricos son condensación de DNA, fusión o desestabilización de membranas y secuencias de localización nuclear.

ANEXO

- ▶ https://www.researchgate.net/profile/Julio-Coll/publication/28124839_Estudios_sobre_translocacion_de_complejos_DNA-liposomas_a_traves_de_membranas_celulares_para_mejorar_la_transfeccion_en_celulas_eucariontes_Revision/links/0deec51e0638fd7756000000/Estudios-sobre-translocacion-de-complejos-DNA-liposomas-a-traves-de-membranas-celulares-para-mejorar-la-transfeccion-en-celulas-eucariontes-Revision.pdf

See discussions, stats, and author profiles for this publication at: <https://www.researchgate.net/publication/28124839>

Estudios sobre translocación de complejos DNA-liposomas a través de membranas celulares para mejorar la transfección en células eucariontes (Revisión)

Article

Source: OAI

CITATIONS

2

READS

450

3 authors, including:



Julio Coll

Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria

333 PUBLICATIONS 5,181 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)



Sophie Ruiz

Federico Villarreal National University

11 PUBLICATIONS 210 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)

Estudios sobre translocación de complejos DNA-liposomas a través de membranas celulares para mejorar la transfección en células eucariontes (Revisión)

A. Rocha, S. Ruiz, J.M. Coll *

Dpto. Biotecnología, INIA, SGIT. Crta. Coruña, km. 7. Madrid, España.
coll@inia.es

RESUMEN

El uso creciente de liposomas catiónicos como vehículos para la transfección a células de DNA plasmídico codificando transgenes, es debido a su alta eficiencia (~ 50 %) y reproducibilidad. La expresión de un transgén comienza con la interacción del complejo DNA-liposoma con la membrana plasmática por adsorción y/o interacciones electrostáticas. La entrada del DNA-liposoma a través de la membrana plasmática puede ser por endocitosis o por fusión de membranas. La endocitosis lleva a los DNA-liposomas primero a un endosoma que se convierte en lisosoma (pH ~ 5), lo que puede dar lugar a la degradación del DNA por DNAsas dependientes de pH. Una vez liberado el DNA al citoplasma celular, tiene que atravesar la membrana nuclear para poder transcribir el transgén, debido a que las RNA polimerasas residen en el núcleo. Para mejorar la eficiencia de la transfección se puede actuar a nivel del DNA (secuencias, promotores, secuencias de localización nuclear, etc.), del complejo DNA-liposomas (lípidos, ultrasonidos, electroporación, Ca⁺⁺) o de las células (pH de los endosomas, estado del ciclo celular, localización nuclear). Este trabajo revisa la ruta de entrada del DNA hasta el núcleo celular para mejorar la eficiencia de transfección/expresión.

Palabras clave: transfección, liposomas catiónicos, mitosis, pH, Ca⁺⁺, NLS, péptidos, transgenes.

INTRODUCCIÓN

En determinadas condiciones, las células eucariontes pueden internalizar DNA exógeno y un pequeño porcentaje de éste localizarse en el núcleo para la transcripción y expresión de sus transgenes. La incorporación covalente del DNA exógeno al genoma o no, hace que la expresión sea permanente o temporal (Singh *et al.*, 2001). La obtención de animales transgénicos, la obtención de biofactorías y la terapia génica además de variados

* Autor para correspondencia

Recibido: 4-12-01

Aceptado para su publicación: 7-5-02

estudios básicos, entre otras aplicaciones, se beneficiarían de un mayor control y mejora del transporte del DNA exógeno al núcleo celular.

Debido al tamaño y carga negativa del DNA y a la multitud de barreras membranosas y enzimáticas de la célula, su entrada y su consiguiente transcripción en el núcleo, donde residen las RNA polimerasas, es muy poco eficiente. Para aumentar estas eficiencias, se han desarrollado y siguen estudiándose una amplia variedad de métodos. Históricamente, estos métodos han utilizado fosfato cálcico, policondensationes de DNA (DEAE, polilisina), retrovirus, microinyección, etc. (García-Chaumont *et al.*, 2000; Ma y Diamond, 2001). Sin embargo, estos primeros métodos tienen problemas de toxicidad celular, baja reproducibilidad, complejidad de ejecución o bajas eficiencias de transfección. Para mejorar las bajas eficiencias de transfección de estos primeros métodos, se han empleado varias técnicas entre las que se encuentran la formación de complejos entre el DNA y los liposomas.

Las mejores eficiencias de expresión de transgenes utilizando complejos DNA-liposomas son menores del 50 % de las células transfectadas, pero la falta de control de las variables implicadas hace que su reproducibilidad sea baja y que los niveles de transfección más reproducibles sean del ~ 20 %. Se desconoce cuál es el paso limitante, puesto que los complejos DNA-liposoma penetran en el 100 % de las células transfectadas aunque no en todas penetran el mismo número de moléculas (Tseng *et al.*, 1999). Los métodos para mejorar la eficiencia de expresión de los transgenes introducidos por transfección de los complejos DNA-liposomas van dirigidos a modificaciones en el DNA, en el liposoma o en la célula. A su vez las modificaciones en la célula pueden clasificarse en aquellas que mejoran la translocación del DNA a través de la membrana: plasmática (liposomas, ultrasonidos, electroporación, bombardeo), endosomal (agentes lisosomotrópicos, Ca^{++}) y/o nuclear (control ciclo celular, NLS y péptidos).

Si no se obtienen los máximos rendimientos en cada una de las translocaciones membranosas mencionadas, la baja eficiencia del proceso global disminuye la expresión del DNA transfectado.

Ruta de los complejos DNA-liposoma catiónico dentro de la célula

Para que el transgén que codifica un DNA se exprese, la primera barrera que el complejo DNA-liposoma tiene que atravesar es la membrana plasmática (Fig. 1). Utilizando DNA y liposomas marcados se ha podido comprobar la colocalización de éstos en la membrana plasmática una vez adicionados a las monocapas celulares. La entrada posterior en la célula puede ser por endocitosis natural (ruta endosoma-liposoma), por fusión natural de membranas o incrementada por medios artificiales (ultrasonidos, electroporación, bombardeo). Después, para que el DNA llegue al citoplasma tiene que atravesar la membrana de los endosomas/liposomas. Por último para que el DNA pueda entrar en el núcleo tiene que atravesar la membrana nuclear (Nishikawa y Huang, 2001). Efectivamente, se comprueba que un tiempo después de la transfección, el DNA marcado se acumula en el núcleo donde los liposomas nunca se detectan (Marcusson *et al.*, 1998; Scherman *et al.*, 1998).

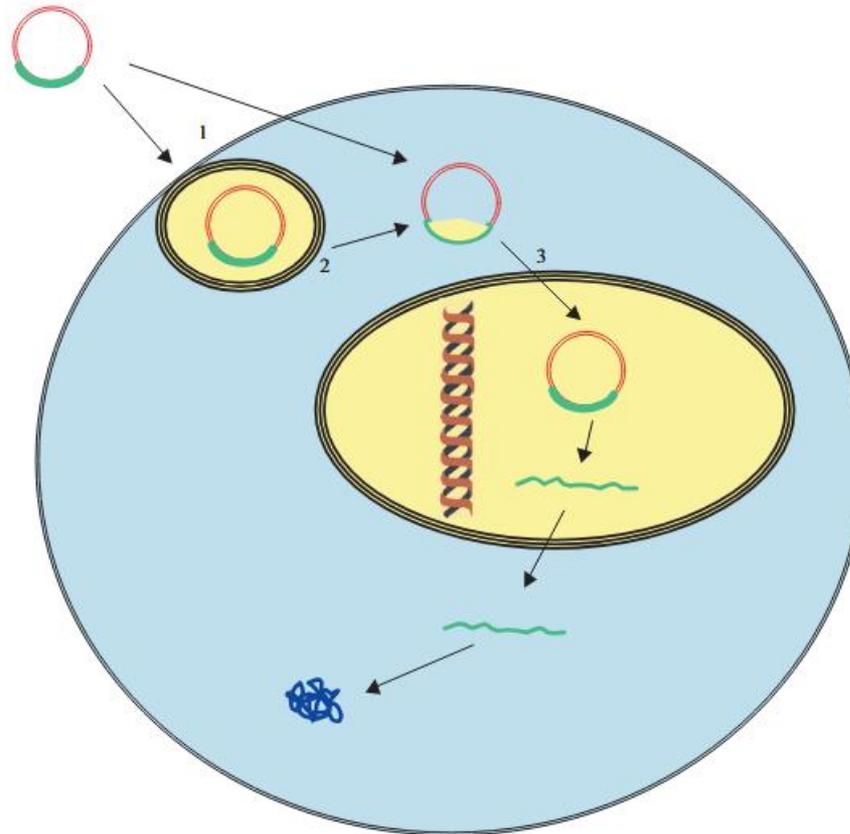


Fig. 1.—Ruta celular de los complejos DNA-liposoma para expresión

Se diseña primero un plásmido que contiene el transgén con promotores, intrones, terminadores y demás elementos de control para células eucarióticas. El plásmido, tiene que penetrar la membrana plasmática bien a través de la ruta endosoma/lisosoma (1, 2) o por fusión (1) y después la membrana nuclear (3). Sólo dentro del núcleo las RNA polimerasas pueden fabricar el RNA mensajero que se traducirá una vez de vuelta en el citoplasma. Para expresión permanente, el transgén tiene además que incorporarse covalentemente al DNA cromosómico (Hackett y Álvarez, 2000).

Utilización de liposomas catiónicos para transfección de DNA

El uso de complejos de DNA-liposomas formados por DNA (cargado negativamente) y liposomas catiónicos (cargados positivamente) ha mejorado la eficiencia y reproducibilidad de la transfección obtenida con métodos anteriores (Lasic *et al.*, 1997; Stamatatos *et al.*, 1988). Los lípidos catiónicos que se usan para el diseño de los liposomas tienen parte hidrofílica y parte hidrofóbica. El uso de liposomas catiónicos tiene las ventajas de que forman complejos electrostáticos con el DNA, se introducen espontáneamente en las células facilitando el transporte del DNA al núcleo y hacen al DNA resistente a las nucleasas condensándolo en partículas mayores de 50 nm de diámetro (Lebedeva *et al.*, 2000; Pedroso De Lima *et al.*, 2001). Es un método simple y reproducible (Felgner *et al.*, 1987).

Los liposomas se preparan mezclando en disolventes orgánicos el lípido catiónico (Tabla 1) con fosfatidilcolina y colesterol para aumentar su estabilidad (Katsel y Greenstein, 2000). Una vez evaporado el disolvente orgánico, se añade un tampón acuoso y se sonica, obteniéndose liposomas de varios tamaños que para una mayor homogeneidad se pueden extruir (Templeton *et al.*, 1997). Todas las manipulaciones se hacen en presencia de nitrógeno o en vacío para reducir la oxidación de los dobles enlaces de los ácidos grasos que componen los lípidos. Aunque los complejos DNA-liposomas se pueden conservar a 4 °C, se han diseñado liposomas capaces de resistir la liofilización y la posterior rehidratación (Anchordoquy *et al.*, 1997).

Tabla 1

Algunos de los lípidos más usados para formar complejos DNA-liposomas catiónicos

Nombre	Función	Fórmula
DOPE	neutral y fusogénico	1,2 dioleoil-3-fosfatidiletanolamina
DOTAP	lípido catiónico	1,2 dioleoil-3-trimetilamonium propano
DOGS	lípido catiónico	di-octadecilamidoglicil-espermina
Tfx	lípido catiónico	tetrametilhidroxietil, 2,3 dioleoil, 1,4 butanediamonio ioduro
DPC	lípido estructural	1,2 dioleoil - 3 - forfatidilcolina
Colesterol	lípido estructural	colesterol

La estructura de los complejos DNA-liposomas catiónicos es globular y multilamelar alternando una bicapa lipídica y una monocapa de DNA (Lin *et al.*, 2000; Radler *et al.*, 1997).

Modificaciones en el DNA para mejorar su utilización con liposomas

Los DNA que se usan para transfección con liposomas son plásmidos (DNA circulares de doble cadena superenrollados) que contienen secuencias para la expresión del transgene y ~ 3 Kb de secuencias bacterianas para la manipulación del plásmido en bacterias (Estepa *et al.*, 1994). Hay que tener cuidado de no degradar el DNA durante su prepa-

Tabla 2
Posibles métodos para incrementar la eficiencia de transfección del DNA
acomplejado con liposomas catiónicos

Membrana	Método	Referencia
Plasmática	Ultrasonidos	(Lawric <i>et al.</i> , 1999)
	Electroporación	(Colosimo <i>et al.</i> , 2000)
	Péptidos quiméricos	(Morris <i>et al.</i> , 1999)
Endosoma	pH (cloroquina)	(Luthman y Magnusson, 1983)
	Ca ⁺⁺	(Lam y Cullis, 2000)
	Péptidos quiméricos	(Haensler y Szoka, 1993)
Núcleo	Mitosis	(Tseng <i>et al.</i> , 1999)
	NLS	(Aronsohn y Hughes, 1997)
	Péptidos quiméricos	(Ogris <i>et al.</i> , 2001)

ración, ya que la transfección con DNA degradado-liposomas induce apoptosis en las células transfectadas (Schiaivone *et al.*, 2000).

Las modificaciones en los plásmidos para mejorar su utilización con liposomas se han dirigido a aumentar bien su transcripción por selección de los mejores promotores para atrapar las RNA polimerasas (Hansen *et al.*, 1991; Moav *et al.*, 1992) o bien su replicación mediante la inclusión de orígenes de replicación tales como el del virus SV40. Además se han descrito aumentos de hasta 1.000 veces en la expresión cuando se incluyen secuencias del promotor temprano de SV40 que actúan como señales de localización nuclear (Dean *et al.*, 1999). También se han utilizado miniplásmidos (Darquet *et al.*, 1997) que al eliminar secuencias bacterianas tienen aumentada su eficiencia de transfección ya que un mismo complejo liposomal puede vehicular un mayor número de moléculas de plásmido cuanto más pequeñas sean éstas.

Por otra parte, también se han utilizado plásmidos abiertos, lineales, procedentes de plásmidos circulares digeridos con una enzima de restricción de corte único, aunque éstos se utilizan generalmente para inducir expresión permanente. En este sentido, un nuevo concepto es la utilización de plásmidos DNA lineales pero cerrados covalentemente en sus extremos para aumentar su resistencia a las DNAsas (plásmidos MIDGE, Ready Vector). Estos plásmidos permiten reducir mucho su tamaño por lo que exhiben altos niveles de expresión.

Uso de ultrasonidos para mejorar la eficiencia de translocación de la membrana plasmática

Las ventajas del uso de la sonicación para la transfección del DNA son: i) es rápida, ii) es sencilla y barata, iii) es aplicable a diferentes células por ser un método mecánico y iv) podría ser aplicada *in vivo* localmente para terapia génica (Newman *et al.*, 2001). Ahora bien, para poder aplicar este método habría que entender mejor los efectos de la sonicación en las células y aclarar el mecanismo mediante el cual el DNA atraviesa las membra-

nas celulares. El primer efecto que se observa después de la aplicación de los ultrasonidos a las células es el calentamiento (Diederich y Hynynen, 1999). Un segundo efecto, es el aumento del espacio intercelular y más tarde perforaciones en las membranas al aumentar las intensidades/frecuencias (Frenkel y Kimmel, 2000; Martin *et al.*, 1983). Los ultrasonidos terapéuticos ($\sim W \text{ cm}^2$ a 3.000 KHz durante 30 a 90 s) producen un ensanchamiento del espacio intercelular así como la rotura de las conexiones entre células adyacentes (Frenkel y Kimmel, 2000). La cavitación parece ser la responsable de la entrada del DNA en las células (Frenkel *et al.*, 1999; Greenleaf *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 1998; Wyber *et al.*, 1997). Por ejemplo, utilizando $0,4-0,6 W \text{ cm}^2$ a 40 KHz durante 6-24 s se ha conseguido introducir DNA en las células de las aletas de las truchas (Fernández-Alonso, 2000). La perforación del espacio intercelular en tejidos requiere mayores intensidades ($2,2 W \text{ cm}^2$ a 3.000 KHz durante 30 a 90 s) (Frenkel y Kimmel, 2000). Sin embargo, la comparación de los distintos trabajos es difícil debido a la influencia desconocida que tienen las numerosas variables que intervienen (frecuencia, intensidad, duración, geometría, etcétera) y a los pocos estudios dedicados a examinar sistemáticamente los efectos de dichas variables (Wyber *et al.*, 1997).

Los plásmidos sufren pocas alteraciones con el proceso de sonicación (Fernández-Alonso, 2000; Wyber *et al.*, 1997) y quedan protegidos contra dichas alteraciones cuando se acomplejan con liposomas (Wasan *et al.*, 1996). Aunque la combinación de la sonicación con liposomas aumenta unas 7 veces la eficiencia de la transfección celular (Lawrie *et al.*, 1999; Unger *et al.*, 1997), no se han publicado muchos trabajos sobre este tema.

Uso de la electroporación para la translocación de la membrana plasmática

Las variables físicas en la transferencia de DNA a las células por electroporación (Hama-Inaba *et al.*, 1987; Knutson y Yee, 1987) son: i) la duración del pulso eléctrico T (tiempo, 5-20 msec), que depende de la resistencia del medio (Ω) y de la potencia (Faradays, μF) del condensador ($T = \Omega \cdot \mu\text{F}$). La resistencia del medio inversamente proporcional a su concentración iónica ($\sim 20 \Omega$), depende además del volumen y del espesor de la cubeta usada para la electroporación y ii) la intensidad del campo eléctrico ($\sim 6.000 \text{ V/cm}$ en cubetas de 0,4 cm), que tiene gran influencia en el porcentaje de transfección óptimo coincidente con un 20-80 % de mortalidad celular (Chu *et al.*, 1987).

El medio de electroporación afecta a las células y a la entrada del DNA de varias maneras, ya que: su resistencia influencia T que a su vez influencia la supervivencia celular, su osmolaridad afecta la supervivencia celular, su concentración de iones afecta la estabilidad de las membranas durante el pulso eléctrico y el pulso eléctrico provoca una permeabilización temporal o aparición de poros en la membrana plasmática que permanece a bajas temperaturas durante varias horas que afecta a la supervivencia celular (Rols y Teissie, 1998).

La eficiencia de entrada del DNA en la célula también depende de la concentración de DNA (óptimo de $1-40 \mu\text{g/ml}$), la hipotonicidad del medio (Golzio *et al.*, 1998), la presencia de etanol (Golzio *et al.*, 2001), DMSO (Melkonyan *et al.*, 1996) o suero (Delteil *et al.*, 2000), del número de pulsos y de su duración. Aunque el número de pulsos aumenta proporcionalmente la entrada del DNA en la célula, su duración es el parámetro más importante ya que sólo cuando los pulsos se aplican durante unos 5 ms se puede detectar dicha entrada (Rols y Teissie, 1998).

Una vez que el DNA ha entrado en las células ha de expresarse y para ello tiene que llegar al núcleo. Se ha demostrado que las células de ciclo celular corto (crecimiento rápido) expresan el transgén introducido por electroporación más eficientemente que las de crecimiento lento (Colosimo *et al.*, 2000). El incremento de expresión cuando las células se incuban con colchicina antes de la electroporación, confirma el requerimiento de mitosis (no hay membrana nuclear) para este efecto.

No se ha experimentado el efecto de la electroporación sobre la penetración ni la expresión de complejos DNA-liposoma.

Uso del bombardeo con complejos DNA-liposomas para mejorar la translocación de la membrana plasmática

Sólo se ha usado el bombardeo con partículas de oro recubiertas de DNA para introducir genes, en tejidos *in vivo* (Gómez-Chiarri y Chiaverini, 1999; Gómez-Chiarri *et al.*, 1996) pero no se ha empleado el bombardeo con complejos DNA-liposoma.

Control de pH en la ruta endosoma/lisosoma: agentes lisosomotrópicos

La endocitosis de los complejos DNA-liposomas resulta en su procesamiento a través de la ruta endosoma/lisosoma. Esta ruta conlleva una posible degradación del DNA en el lisosoma por actuación de sus enzimas dependientes de bajo pH, por lo que los compuestos que promueven la translocación del DNA fuera del endosoma o que controlan el pH del lisosoma, aumentan la eficiencia de la expresión (Morales *et al.*, 1999).

En este sentido, el tratamiento de las células con 20-100 μM de cloroquina, un agente lisosomotrópico que evita la disminución de pH del lisosoma, es el método que más se ha usado. Los tratamientos con cloroquina durante y después de la transfección aumentan un 40 % la eficiencia de expresión de la transfección con complejos de DNA-liposomas (Luthman y Magnusson, 1983). La cloroquina también incrementa 1,5 veces la expresión de complejos RNA-péptidos y de RNA-liposomas (Bettinger *et al.*, 2001). Debido a que la exposición a cloroquina por más de 4 h a 10-100 μM causa muerte celular, la sacarosa (5-500 mM), el cloruro amónico (10-40 mM) o la polivinilpirrolidona (0,01 -1 mg/ml) también se han usado como agentes lisosomotrópicos alternativos (Ciftci y Levy, 2001).

Otra alternativa para escapar del endosoma/lisosoma, es la utilización en los liposomas de lípidos que se vuelven fusogénicos cuando el pH baja a valores lisosomales (Kono *et al.*, 2001; Simoes *et al.*, 2001) o lípidos con enlaces SH desestabilizables en el medio reductor de los lisosomas debido a la activación de enzimas específicas (Tang y Hughes, 1998).

Mejora de la expresión por adición de calcio (Ca^{++})

El Ca^{++} parece tener 2 efectos sobre la transfección: condensar el DNA cuando se añade antes de la transfección y aumentar su expresión cuando se añade postransfección. En los primeros métodos de transfección celular, sólo se empleaba su capacidad de formación de precipitados muy finos de complejos DNA- Ca^{++} sobre las células. Después se

ha demostrado que la presencia de Ca^{++} después de la transfección en concentraciones < 10 mM, es capaz de aumentar 3-20 veces la eficiencia de expresión de los complejos DNA-liposomas. Este efecto se ha demostrado en 5 líneas celulares y usando 6 formulaciones distintas de lípidos catiónicos (Lam y Cullis, 2000). El efecto es específico y no depende solamente de las cargas del Ca^{++} puesto que otros iones tales como Mg^{++} o Na^{+} no lo exhiben y el efecto se inhibe específicamente con EGTA (quelante específico del Ca^{++}).

Además se ha observado que la inhibición de la transfección por la presencia de suero en el medio de cultivo puede ser contrarrestada en presencia de 2 mM de Ca^{++} (Haberland *et al.*, 2000). Parece ser que el Ca^{++} no se necesita para la entrada del DNA y que el suero no inhibe ni el ligamiento ni el paso de la membrana citoplasmática de los complejos DNA-liposomas pero si el escape del DNA de los endosomas y/o la expresión del DNA (Haberland *et al.*, 2000). Es posible que esta actividad postransfeccional del Ca^{++} sea debida a su capacidad lisosomotrópica. Al inhibir o reducir los lisosomas estaría actuando a favor de la transferencia del DNA desde el endosoma al citoplasma (Haberland *et al.*, 1999).

Influencia de la mitosis: ausencia de membrana nuclear

Sorprendentemente, la mayoría de las células en una monocapa son capaces de internalizar los complejos DNA-liposoma pero sólo un 20 % exhibe expresión del transgén (Scherman *et al.*, 1998 2113). Existe por lo tanto una heterogeneidad celular que influye la eficiencia de transfección. Puesto que en una monocapa de una línea celular la principal causa de heterogeneidad celular se debe al estado del ciclo celular de cada célula, es de suponer que el ciclo celular tenga alguna influencia en la baja expresión del transgén. Confirmando estas observaciones, se sabe que las células en crecimiento siempre se transfectan mejor que las que están en reposo.

Por otra parte, utilizando células sincronizadas por doble bloqueo con timidina (2,5 mM), se demostró que la eficiencia de transfección aumenta 3-10 veces después de la mitosis (Tseng *et al.*, 1999). Con poblaciones celulares separadas por centrifugación, también se demostró que la actividad mitótica incrementa de 30 a 500 veces la expresión de los complejos DNA-liposomas transfectados (Brunner *et al.*, 2000; Mortimer *et al.*, 1999). La transfección de células Hela sincronizadas en G1 o en G2/M con complejos DNA(GFP)-liposoma y análisis de su expresión por FACS demostraron resultados similares (Tseng *et al.*, 1999), confirmados por otros estudios usando células permeabilizadas por digitonina (Escriou *et al.*, 2001). Se supone que en todos estos casos la desaparición de la membrana nuclear durante la mitosis contribuye a una mayor penetración del DNA en el núcleo. Sin embargo, no toda la expresión obtenida es debida a este fenómeno, ya que existen células pre-mitóticas que también expresan el transgén y además nunca se llega al 100 % de células con expresión sino a un máximo del 40 % (Tseng *et al.*, 1999). La desaparición temporal de la membrana nuclear durante la oogénesis también se ha aprovechado para aumentar la eficiencia de transfección de genes en oocitos inmaduros utilizando retrovirus como vectores para producir ganado transgénico (Chan *et al.*, 1998).

Uso de señales de localización nuclear (NLS) en péptidos y en DNA

Las mejoras en el transporte de DNA del citoplasma al núcleo se han demostrado tanto utilizando complejos DNA-péptidos como secuencias específicas en el DNA.

El ejemplo más eficaz ha sido el uso de péptidos correspondientes a las señales peptídicas de localización nuclear (NLS) del antígeno T de SV40 (Aronsohn y Hughes, 1997). La formación de complejos por interacciones iónicas entre el DNA y los péptidos NLS aumentan la eficiencia de transporte del DNA al núcleo, tanto que la inyección intracitoplasmática de sólo 10 moléculas de DNA-NLS (0,06 fg de plásmido) son suficientes para producir peces cebra con un transgén integrado (Liang *et al.*, 2000). El uso de complejos DNA-NLS permite una reducción de 10^5 veces en las cantidades de DNA necesarias para detectar la transfección (Collas y Allestrom, 1998; Liang *et al.*, 2000). Estos resultados se confirmaron utilizando el ensayo de transporte al núcleo en células permeabilizadas con digitonina (Sebestyen *et al.*, 1998). El ligamento covalente entre NLS y el DNA sin embargo, no causa dichos efectos.

También los complejos melitina-polietilenimina provocan una mejora (~ 4 veces) en el transporte nuclear de las secuencias DNA gracias probablemente a que la melitina posee una secuencia NLS (Ogris *et al.*, 2001).

Sin embargo, no se han publicado trabajos en los que se añadan NLS a complejos DNA-liposomas para aumentar su localización nuclear.

Todavía se conocen poco las señales similares que en las secuencias del DNA también favorecen el transporte del DNA al núcleo. Los primeros experimentos se realizaron con secuencias del virus SV40 (Dean, 1997). Utilizando células permeabilizadas con 40 µg/ml de digitonina o con núcleos aislados se ha demostrado que la transferencia del DNA al núcleo requiere no sólo proteínas citoplasmáticas sino también secuencias específicas en el DNA (Dean, 1997; Wilson *et al.*, 1999). Estas secuencias consisten en secuencias repetidas de 72 pares de bases localizadas en el promotor de SV40 (Dean *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2001). La presencia de estas secuencias de DNA es capaz de aumentar la expresión de transgenes en varios tipos celulares y utilizando varios métodos de transfección (liposomas catiónicos, péptidos, inyección) y además en células que no están en división celular (Dean *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2001; Vacik *et al.*, 1999).

Uso de péptidos quiméricos

Los péptidos quiméricos combinan péptidos cortos capaces de ligar reversiblemente al DNA, condensarlo, dirigirlo a células específicas, translocar el DNA al citoplasma o dirigirlo al núcleo celular (Luo y Saltzman, 2000; Morris *et al.*, 2000). El diseño de péptidos quiméricos puede seguir 2 estrategias: una única secuencia peptídica (varias secuencias de péptidos unidas covalentemente) o varios péptidos que se autoensamblan no covalentemente entre sí.

Péptidos quiméricos basados en la unión covalente de péptidos de fusión virales y secuencias NLS se han usado con éxito para transfección. Se han utilizado los péptidos de fusión virales de la hemaglutinina HA del virus de la influenza (Haensler y Szoka, 1993), de la pG de VSV (Schuster *et al.*, 1999) y de la gp41 de HIV (Morris *et al.*, 1999; Morris *et al.*, 1997) (Tabla 3). Varias poliaminas catiónicas de diferentes tamaños y estructuras tales como polilisina, poliarginina, espermidina, espermina, temporinas (Rinaldi

Tabla 3

Ejemplos de péptidos con actividad condensadora de DNA, endosomolítica, inductores de fusión o promotores de poros

Secuencia	Origen	Referencia
GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ	melitina	(Ogris <i>et al.</i> , 2001)
GLFEAIAAGFIENGWEGMIDGGGC	influenza HA(INF)	(Hacnsler y Szoka, 1993)
KFTIVFPHNQGHWKNVPSNYHYCP	VSV pG	(Schuster <i>et al.</i> , 1999)
GALFLGFLGAAGSTMGAWSQPKSKRKV	HIV gp41	(Morris <i>et al.</i> , 1999)
WEAALAEALAEALAEHLAEALAEALAA	GALA	(Hacnsler y Szoka, 1993)
GLFEALLELESLESLWLEEA	covalente: JTS1(pores)	(Gottschalk <i>et al.</i> , 1996)
HHHHHWYG	covalente	(Midoux <i>et al.</i> , 1998)
WEAKLAKALAKALAKHLAKALAKACEA	covalente	(Wyman <i>et al.</i> , 1997)
(LARI) ₆ KLLKLLLKLWLKLLKLLL	covalente	(Niidome <i>et al.</i> , 1997)
(K) ₁₉ VAYISRGVSTYYSDTVKGRFTRQKYNKRA	anti-DNA Ab	(Avrameas <i>et al.</i> , 1999)
palmitoil-SPKRSPKRSPKR + INF	no covalente	(Wilke <i>et al.</i> , 1996)
YKAKKKKKKKKWK + JTS1	no covalente	(Gottschalk <i>et al.</i> , 1996)

et al., 2001), dendrímeros, protamina, polietileneimine (Boussif *et al.*, 1999; Boussif *et al.*, 1995; Lemkine y Demeneix, 2001), etc., también se han usado para condensar DNA junto con péptidos NLS (Midoux *et al.*, 1998; Niidome *et al.*, 1997; Wyman *et al.*, 1997).

La polilisina, por ejemplo, es capaz de compactar DNA hasta formar partículas de 100-200 nm. Para aumentar su endocitosis y su transferencia a células específicas, la polilisina puede ligarse covalentemente al tripéptido RGD que interacciona con los receptores celulares de las integrinas (Colin *et al.*, 2000; Harbottle *et al.*, 1998), a la galactosa para transferencia a hepatocitos, a anti-CD3 o CD5 para linfocitos T, a la transferrina para hepatocitos (Wagner *et al.*, 1998), etc. (Brown *et al.*, 2000).

La glicosilación de las aminas de la polilisina y de la polialilamina introduce grupos hidrofílicos que disminuyen su citotoxicidad *in vivo* y aumentan la eficiencia de transfección *in vitro* varios órdenes de magnitud. Otra estrategia consiste en acoplar polilisina a un péptido derivado de un anticuerpo que liga DNA (Avrameas *et al.*, 1999). También se han usado anticuerpos anticitoesqueleto para dirigir los DNA-liposomas al citoplasma demostrándose un incremento en la eficiencia de expresión (Khaw *et al.*, 2001).

Se ha descrito una molécula híbrida obtenida mediante ligamiento covalente de un derivado lipídico (dioleoil fosfatidiletanolamina) y un péptido fusogénico derivado del veneno de la abeja (melitina) (Lam *et al.*, 2001; Ogris *et al.*, 2001). Este reactivo es insensible a la presencia de suero y forma partículas con una carga positiva entre 50-250 nm. Acomplejado con DNA, la dioleoil-melitina transfecta eficientemente varios tipos celulares (Legendre *et al.*, 1997).

Para incrementar la translocación del DNA a través de las membranas lisosomales, se han utilizado péptidos fusogénicos virales que cambian de conformación con la bajada de pH induciendo fusión o lisis de membranas (Tabla 1). Otra estrategia importante es el uso de péptidos que a pH neutro son capaces de fusionar con la membrana plasmática tales como el péptido de fusión de la gp41 de HIV (Morris *et al.*, 1999).

También se han usado péptidos asociados no covalentemente por medio de interacciones electrostáticas y/o hidrofóbicas. Por ejemplo, el péptido de influenza (INF) con un péptido condensador palmitoilado (Wilke *et al.*, 1996) o el péptido formador de poros

(JTS1) con un péptido condensador (Gottschalk *et al.*, 1996), etc. Para autoensamblar péptidos y proteínas con el DNA de una manera más controlada, intermedia entre la unión covalente y la no covalente, se ha usado DNA biotilado y estreptavidina-transferrina (Sato *et al.*, 2000).

CONCLUSIONES

Los complejos DNA-liposomas catiónicos penetran espontáneamente en la mayoría de las células aunque con desigual eficiencia (Tseng *et al.*, 1999). Dicha penetración puede aumentarse utilizando métodos mecánicos (ultrasonidos, electroporación, bombardeo, etcétera) (Colosimo *et al.*, 2000; Lawrie *et al.*, 1999). Sin embargo, para aumentar eficiencias de expresión del 20-50 % al 80-100 %, es necesario que el DNA exógeno atraviese también las membranas del endosoma/lisosoma y la nuclear. Para atravesar la membrana endosomal antes de que el endosoma pase a lisosoma y evitar que el DNA se degrade, se utilizan agentes lisosomotrópicos tales como el cloruro amónico, la cloroquina, la sacarosa o el Ca^{++} (Ciftci y Levy, 2001; Lam y Cullis, 2000; Luthman y Magnusson, 1983). También se han usado con éxito lípidos o péptidos que son fusogénicos sólo al bajo pH del lisosoma (Kono *et al.*, 2001; Simoes *et al.*, 2001). La necesidad de llegar hasta las RNA polimerasas del núcleo para que se efectúe la transcripción del DNA exógeno, hace que la electroporación, los complejos DNA-liposomas (Brunner *et al.*, 2000; Mortimer *et al.*, 1999; Tseng *et al.*, 1999), la inyección (Chan *et al.*, 1998) o la penetración en células permeabilizadas (Escriou *et al.*, 2001) requieran ausencia de las membranas nucleares (durante la mitosis o la meiosis) para exhibir máximas eficiencias de expresión. El uso de secuencias NLS tanto en péptidos (Liang *et al.*, 2000) como en el DNA (Dean *et al.*, 1999), sin embargo, puede aumentar la eficiencia de transporte al núcleo incluso cuando las células están en reposo (Aronsohn y Hughes, 1997). El uso de estos procedimientos tanto aislados como en combinación puede aumentar las eficiencias de expresión de la transfección y su reproducibilidad.

Los lípidos catiónicos tienen una cabeza polar cargada positivamente que forma complejos con las cargas negativas del DNA y una parte hidrofóbica constituida por ácidos grasos. Generalmente se usa el ácido oleico (C18:1) debido a su mayor flexibilidad y menor temperatura de fusión.

Los posibles métodos para incrementar la eficiencia de la transfección de una determinada construcción plasmídica que codifica un transgén con liposomas catiónicos (Felgner *et al.*, 1987) se han clasificado en métodos para atravesar las membranas celular, endosomal y nuclear.

Los péptidos pueden ser monofuncionales o quiméricos (péptidos con distintas actividades unidos covalente o no covalentemente). Las funciones que se escogen para el diseño de los péptidos quiméricos son condensación de DNA, fusión o desestabilización de membranas y secuencias de localización nuclear.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece a J. Coll P. su mecanografía, Este trabajo fue financiado por los proyectos europeos FAIR CT98-4003 y CT98-4398, por el proyecto FEDER IFD97-467, por los proyectos INIA, SC00046 y CPE03016C4 y por el proyecto CICYT ACU01-003.

SUMMARY

Cationic DNA-Liposomas (Review)

The increasing use of cationic liposomes as vectors for plasmid DNA transfection codifying transgenes is due to its high efficiency (~ 50 %) and reproducibility. The expression of a transgén begins with the interaction of the DNA-liposome with the plasma membrane by adsorption and/or electrostatic interactions. The entry of the DNA-liposome might be by endocytosis or membrane fusion. The endocytosis carry the DNA-liposomes first to an endosome to be converted into lysosome (pH ~ 5) where the DNA can be degraded by pH dependent DNAses. After the DNA is delivered to the cytoplasm, it has to transverse the nuclear membrane to be transcribed because the RNA polymerases are inside. To improve the efficiency of the whole process, we can act at the levels of DNA (sequences, promoters, enhancers, nuclear localization signals), of the DNA-liposome complex (lipids, ultrasound, electroporation, Ca⁺⁺) or of the cells (pH of the endosomes, mitosis, nuclear localization). This work reviews all the possibilities that determine the DNA fate to the cellular nucleus to improve the efficiency of transfection/expression.

Key words: transfection, cationic liposomes, mitosis, pH, Ca⁺⁺, NLS, peptides, transgenes.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANCHIORDOQUY J., CARPENTER J.F., KROLL D.J., 1997. Maintenance of transfection rates and physical characterization of lipid/DNA complexes after freeze-drying and rehydration. *Archv.Biochem.Biophys.* 348, 199-206.
- ARONSOHN A.J., HUGHES J.A., 1997. Nuclear localization signal peptides enhance cationic liposome-mediated gene therapy. *Journal Drug Targeting.* 5, 163-169.
- AVRAMEAS A., TERNYNCK T., GASMI L., BUTTIN G., 1999. Efficient gene delivery by a peptide derived from monoclonal anti-DNA antibody. *Bioconjugation Chemistry.* 10, 87-93.
- BETTINGER T., CARLISLE R.C., READ M.L., OGRIS M., SEYMOUR L.W., 2001. Peptide-mediated RNA delivery: a novel approach for enhanced transfection of primary and post-mitotic cells. *Nucl.Ac.Res.* 29, 3882-3891.
- BOUSSIF O., DELAIR T., BRUA C., VERON L., PAVIRANI A., KOLBE H.V., 1999. Synthesis of polyallylamine derivatives and their use as gene transfer vectors *in vitro*. *Bioconjugation Chemistry.* 10, 877-883.
- BOUSSIF O., LEZOUALC'H F., ZANTA M.A., MERGNY M., SCHIERMAN D., DEMEINEX B., BEHR J.P., 1995. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyimethyliminine. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 92, 7297-7301.
- BROWN M.D., SCHIATZLEIN A., BROWNLIE A., JACK V., WANG W., TETLEY L., GRAY A.I., UCHEGBU I.F., 2000. Preliminary characterization of novel amino acid based polymeric vesicles as gene and drug delivery agents. *Bioconjugation Chemistry.* 11, 880-891.
- BRUNNER S., SAUER T., CAROTA S., COTTEN M., SALTIK M., WAGNER E., 2000. Cell cycle dependence of gene transfer by lipoplex, polyplex and recombinant adenovirus. *Gene Therapy.* 7, 401-407.
- CHIAN A.W.S., HOMAN E.J., BALLOU L.U., BURNS J.C., BREMEL R.D., 1998. Transgenic cattle produced by reverse-transcribed gene transfer in oocytes. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 95, 14028-14033.
- CHU G., HAYAKAWA H., BERG P., 1987. Electroporation for the efficient transfection of mammalian cells with DNA. *Nucl.Ac.Res.* 15, 1311-1317.
- CIFTCI K., LEVY R.J., 2001. Enhanced plasmid DNA transfection with lysosomotropic agents in cultured fibroblasts. *International Journal Pharmacology.* 218, 81-92.

- COLIN M., MAURICE M., TRUGNAN G., KOMPROBOST M., AL E., 2000. Cell delivery, intracellular trafficking and expression of an integrin-mediated gene transfer vector in tracheal epithelial cells. *Gene Therapy*. 7, 139-152.
- COLLAS P., ALLESTROM P., 1998. Nuclear localization signals enhance germline transmission of a transgene in zebrafish. *Transgenic research*. 7, 303-309.
- COLOSIMO A., GONCZ K.K., HOLMES A.R., KUNZELMANN K., NOVELLI G., MALONE R.W., BENNETT M.J., GRUENERT D.C., 2000. Transfer and expression of foreign genes in mammalian cells. *BioTechniques*. 29, 314-318.
- DARQUET A.M., CAMERON B., WILS P., SCHIERMAN D., CROUZET J., 1997. A new DNA vehicle for non viral gene delivery: supercoiled minicircle. *Gene Therapy*. 4, 1341-1349.
- DEAN D.A., 1997. Import of plasmid DNA into the nucleus is sequence specific. *Exp.Cell Res*. 230, 293-302.
- DEAN D.A., BYRD J.N., DEAN B.S., 1999. Nuclear targeting of plasmid DNA in human corneal cells. *Current Eye Research*. 19, 66-75.
- DEAN D.A., DEAN B.S., MULLER S., SMITH L.C., 1999. Sequence requirements for plasmid nuclear import. *Exp.Cell Res*. 253, 713-722.
- DELTEIL C., TEISSIE J., ROLS M.P., 2000. Effect of serum on *in vitro* electrically mediated gene delivery and expression in mammalian cells. *Biochim.Biophys.Acta*. 1467, 362-368.
- DIEDERICH C.J., HYNYNEN K., 1999. Ultrasound technology for hyperthermia. *Ultrasound Medical Biology*. 25, 871-887.
- ESCRIOU V., CARRIERE M., BUSSONE F., WILS P., SCHIERMAN D., 2001. Critical assessment of the nuclear import of plasmid during cationic lipid-mediated gene transfer. *Journal Gene Medicine*. 3, 179-187.
- ESTEPA A., LORENZO G., COLL J.M., 1994. Revision sobre inmunización con plásmidos de expresión transitoria. *Investigación Agraria*. 9, 261-268.
- FELGNER P.L., GADEK T.R., HOLM M., ROMAN R., CHAN H.W., WENZ M., NORTHROP J.P., RINGOLD G.M., DANIELSEN M., 1987. Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*. 84, 7413-7417.
- FERNÁNDEZ-ALONSO M., 2000. Expresión en vectores eucariontes de genes para vacunación DNA por inmersión en el modelo trucha/rabdovirus. pIID Thesis, Universidad de Navarra, Pamplona, Spain. pIID Thesis, 169p.
- FRENKEL V., KIMMEL E., 2000. Ultrasound-induced intercellular space widening in fish epidermis. *Ultrasound Medical Biology*. 26, 473-480.
- FRENKEL V., KIMMEL E., IGER Y., 1999. Ultrasound-induced cavitation damage to external epithelia of fish skin. *Ultrasound Medical Biology*. 25, 1295-1303.
- GARCÍA-CHAUMONT C., SEKSEK O., GRZYBOWSKA J., BOROWSKI E., BOLARD J., 2000. Delivery systems for antisense oligonucleotides. *Pharmacological Therapy*. 87, 255-277.
- GOLZIO M., MORA M.P., RAYNAUD C., DELTEIL C., TEISSIE J., ROLS M.P., 1998. Control by osmotic pressure of voltage-induced permeabilization and gene transfer in mammalian cells. *Biophysical Journal*. 74, 3015-3022.
- GOLZIO M., TEISSIE J., ROLS M.P., 2001. Control by membrane order of voltage-induced permeabilization, loading and gene transfer in mammalian cells. *Bioelectrochemistry*. 53, 25-34.
- GÓMEZ-CHIAIRRI M., CHIAVERINI L.A., 1999. Evaluation of eukaryotic promoters for the construction of DNA vaccines for aquaculture. *Genetic analysis: Biomolecular Engineering*. 15, 121-124.
- GÓMEZ-CHIAIRRI M., LIVINGSTON S.K., MURO-CACHO C., SANDERS S., LEVINE R.P., 1996. Introduction of foreign genes into the tissue of live fish by direct injection and particle bombardment. *Dis.Aquatic Organ*. 27, 5-12.
- GOTTSCHALK S., SPARROW J.T., HAUER J., MIMS M.P., LELAND F.E., WOO S.L., SMITH L.C., 1996. A novel DNA-peptide complex for efficient gene transfer and expression in mammalian cells. *Gene Therapy*. 3, 448-457.
- GREENLEAF W.J., BOLANDER M.E., SARKAR G., GOLDRING M.B., GREENLEAF J.F., 1998. Artificial cavitation nuclei significantly enhance acoustically induced cell transfection. *Ultrasound Medicine Biology*. 24, 587-595.
- HABERLAND A., KNAUS T., ZAITSEV S.V., BUCHBERGER B., LUN A., HALLER H., BOTTGER M., 2000. Histone III-mediated transfection: serum inhibition can be overcome by Ca⁺⁺ ions. *Pharmaceutical Research*. 17, 229-235.
- HABERLAND A., KNAUS T., ZAITSEV S.V., STAHN R., MISTRY A.R., COUTELLE C., HALLER H., BOTTGER M., 1999. Calcium ions as efficient cofactor of polycation-mediated gene transfer. *Biochim.Biophys.Acta*. 1445, 21-30.
- HACKETT P.B., ÁLVAREZ M.C., 2000. The molecular genetics of transgenic fish. *Recent advances in Marine Biotechnology*. ed.Fingerman, M.nagabhushanam, R. 4: Aquaculture. part B Fishes, 77-145.

- HAENSLER J., SZOKA F.C., 1993. Polyamidoamine cascade polymers mediate efficient transfection of the cell in culture. *Bioconjugation Chemistry*. 4, 372-379.
- IIAMA-INABA H., TAKAHASHI M., KASAI M., SHIOMI T., ITO A., IIANAKA F., SATO K., 1987. Optimum conditions for electric pulse-mediated gene transfer to mammalian cells in suspension. *Cell Structure Function*. 12, 173-183.
- IIANSEN E., FERNANDES K., GOLDSPIK G., BUTERWORTH P., UMEDA P.K., CHIANG K.-C., 1991. Strong expression of foreign genes following direct injection into fish muscle. *FEBS Lett*. 290, 73-76.
- IARBOTTLE R.P., COOPER R.G., HART S.L., LADHOFF A., MCKAY T., KNIGHT A.M., WAGNER E., MILLER A.D., COUTELLE C., 1998. An RGD-oligolysine peptide: a prototype construct for integrin-mediated gene delivery. *Gene Therapy*. 9, 1037-1047.
- KATSEL P.L., GREENSTEIN R.J., 2000. Eukaryotic gene transfer with liposomes: effect of differences in lipid structure. *Biotechnology Annual Review*. 5, 197-220.
- KHAW B.A., DASILVA J., VURAL I., NARULA J., TORCHILIN V.P., 2001. Intracytoplasmic gene delivery for *in vitro* transfection with cytoskeleton-specific immunoliposomes. *Journal Control Release*. 75, 199-210.
- KNUTSON J.C., YEE D., 1987. Electroporation: parameters affecting transfer of DNA into mammalian cells. *Analytical Biochemistry*. 164, 44-50.
- KONO K., TORIKOSHI Y., MITSUTOMI M., ITOH T., EMI N., YANAGIE H., TAKAGISHI T., 2001. Novel gene delivery systems: complexes of fusogenic polymer-modified liposomes and lipoplexes. *Gene therapy*. 8, 5-12.
- LAM A.M.I., CULLIS P.R., 2000. Calcium enhances the transfection potency of plasmid DNA-cationic liposome complexes. *Biochim.Biophys.Acta*. 1463, 279-290.
- LAM Y.H., WASSALL S.R., MORTON C.J., SMITH R., SEPAROVIC F., 2001. Solid-state nmr structure determination of melittin in a lipid environment. *Biophysical Journal*. 81, 2752-2761.
- LASIC D.D., STREY H., STUART M.C.A., PODGORNIK R., FREDERICK P.M., 1997. The structure of DNA-liposome complexes. *Journal American Chemical Society*. 119, 832-833.
- LAWRIE A., BRISKEN A.F., FRANCIS S.E., TAYLER D.I., CHAMBERLAIN J., CROSSMAN D.C., CUMBERLAND D.C., NEWMAN C.M., 1999. Ultrasound enhances reporter gene expression after transfection of vascular cells *in vitro*. *Circulation*. 99, 2617-2620.
- LEBEDEVA I., BENIMETSKAYA L., STEIN C.A., VILENCHIK M., 2000. Cellular delivery of antisense oligonucleotides. *European Journal Pharmacological Biopharmacy*. 50, 101-119.
- LEGENDRE J.Y., TRZECIAK A., BOHRMANN B., DEUSCHLE U., KITAS E., SUPERSAXO A., 1997. Dioleoylmelittin as a novel serum-insensitive reagent for efficient transfection of mammalian cells. *Bioconjugation Chemistry*. 8, 57-63.
- LEMKINE G.F., DEMENEIX B.A., 2001. Polyethylenimines for *in vivo* gene delivery. *Current Opinion Molecular Therapy*. 3, 178-182.
- LI S., MACLAUGHLIN F.C., FEWELL J.G., GONDO M., WANG J., NICOL F., DEAN D.A., SMITH L.C., 2001. Muscle-specific enhancement of gene expression by incorporation of SV40 enhancer in the expression plasmid. *Gene Therapy*. 8, 494-497.
- LIANG M., ALESTROM P., COLLAS P., 2000. Glowing zebrafish: integration, transmission and expression of a single luciferase transgene promoted by non-covalent DNA-nuclear transport peptide complexes. *Molecular Reproduction Development*. 55, 8-13.
- LIN A.J., SLACK N.L., AHMAD A., KOLTOVER I., GEORGE C.X., SAMUEL C.E., SAFINYA C.R., 2000. Structure and structure-function studies of lipid/plasmid DNA complexes. *Journal Drug Targeting*. 8, 13-27.
- LIU J., LEWIS T.N., PRAUSNITZ M.R., 1998. Non-invasive assessment and control of ultrasound-mediated membrane permeabilization. *Pharmaceutical Research*. 15, 918-924.
- LUO D., SALTZMAN M., 2000. Synthetic DNA delivery systems. *Nature Biotechnology*. 18, 33-37.
- LUTHIMAN H., MAGNUSSON G., 1983. High efficiency polyoma DNA transfection of chloroquine treated cells. *Nucl.Ac.Res*. 11, 1295-1308.
- MA H., DIAMOND S.L., 2001. Non viral gene therapy and its delivery systems. *Current Pharmacological Biotechnology*. 2, 1-17.
- MARCUSSON E.G., BHAT B., MANOHARAN M., BENNETT C.F., DEAN N.M., 1998. Phosphorothioate oligodeoxyribonucleotides dissociate from cationic lipids before entering the nucleus. *Nucl.Ac.Res*. 26, 2016-2023.
- MARTIN C.J., PRATT B.M., WATMOUGH D.J., 1983. Observations of ultrasound-induced effects in the fish *Xiphophorus maculatus*. *Ultrasound Medical Biology*. 9, 177-183.
- MELKONYAN H., SORG C., KLEMP T., 1996. Electroporation efficiency in mammalian cells is increased by dimethyl sulfoxide (DMSO). *Nucleic Acids Research*. 24, 4356-4357.

- MIDOUX P., KICHLER A., BOUTIN V., MAURIZOT J.C., MONSIGNY M., 1998. Membrane permeabilization and efficient gene transfer by a peptide containing several histidines. *Bioconjugation Chemistry*. 9, 260-267.
- MOAV B., LIU Z., GROLL Y., HACKETT P.B., 1992. Selection of promoters for gene transfer into fish. *Mol.Mar.Tech.Biotech.* 1, 338-345.
- MORALES C.R., ZHAO Q., LEFRANÇOIS S., 1999. Biogenesis of lysosomes by endocytic flow of plasma membrane. *Biocell*. 23, 149-160.
- MORRIS M.C., CHALOIN L., HEITZ F., DIVITA G., 2000. Translocating peptides and proteins and their use for gene delivery. *Current Opinion Biotechnology*. 11, 461-466.
- MORRIS M.C., CHALOIN L., MERY J., HEITZ F., DIVITA G., 1999. A novel potent strategy for gene delivery using a single peptide vector as a carrier. *Nucl.Ac.Res.* 27, 3510-3517.
- MORRIS M.C., VIDAL P., CHALOIN L., HEITZ F., DIVITA G., 1997. A new peptide vector for efficient delivery of oligonucleotide into nontransformed mammalian cells. *Nucl.Ac.Res.* 25, 2730-2736.
- MORTIMER I., TAM P., MACLACHLAN I., GRAHAM R.W., SARAVOLAC E.G., JOSHI P.B., 1999. Cationic lipid-mediated transfection of cells in culture requires mitotic activity. *Gene Therapy*. 6, 403-411.
- NEWMAN C.M., LAWRIE A., BRISKEN A.F., CUMBERLAND D.C., 2001. Ultrasound gene therapy: on the road from concept to reality. *Echocardiography*. 18, 339-347.
- NIIDOME T., OHMORI N., ICHINOSE A., WADA A., MIHARA H., HARAYAMA T., AOYAGI H., 1997. Binding of cationic alpha-helical peptides to plasmid DNA and their gene transfer abilities into cells. *J.Biol.Chem.* 272, 15307-15312.
- NISHIKAWA M., HUANG L., 2001. Nonviral vectors in the new millennium: delivery barriers in gene transfer. *Human Gene Therapy*. 12, 861-870.
- OGRIS M., CARLISLE R.C., BETTINGER T., SEYMOUR L.W., 2001. Melittin enables efficient vesicular escape and enhanced nuclear access of nonviral gene delivery vectors. *J.Biol.Chem.*
- PEDROSO DE LIMA M.C., SIMOES S., PIRES P., FANECA H., DUZGUNES N., 2001. Cationic lipid-DNA complexes in gene delivery: from biophysics to biological applications. *Advances Drug Delivery Reviews*. 47, 277-294.
- RADLER J.O., KOLTOVER I., SALDITT T., SAFINAYA C.R., 1997. Structure of DNA-cationic liposome complexes: DNA intercalation in multilamellar membranes in distinct interhelical packing regimes. *Science*. 275, 810-814.
- RINALDI A.C., DIGIULIO A., LIBERI M., GUALTIERI G., ORATORE A., BOZZI A., SCHININA M.E., SIMMACO M., 2001. Effects of temporins on molecular dynamics and membrane permeabilization in lipid vesicles. *Journal Peptide Research*. 58, 213-220.
- ROLS M.P., TEISSIE J., 1998. Electroporation of mammalian cells to macromolecules: control by pulse duration. *Biophysical Journal*. 75, 1415-1423.
- SATO Y., YAMAUCHI N., TAKAHASHI M., NIITSU Y., 2000. In vivo gene delivery to tumor cells by transferrin-streptavidin-DNA conjugate. *FASEB Journal*. 14, 2108-2118.
- SCHERMAN D., BESSODES M., CAMERON B., HERSCOVICI J., HOFLAND H., PITARD B., SOUBRIER F., WILS P., CROUZET J., 1998. Application of lipids and plasmid design for gene delivery to mammalian cells. *Current Opinion Biotechnology*. 9, 480-485.
- SCHIAVONE N., PAPUCCI L., LUCIANI P., LAPUCCI A., DONNINI M., CAPACCIOLI S., 2000. Induction of apoptosis and mitosis inhibition by degraded DNA lipotransfection mimicking genotoxic drug effects. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 270, 406-414.
- SCHUSTER M., WU G.Y., WALTON C.M., WU C.H., 1999. Multicomponent DNA carrier with a vesicular stomatitis virus G-peptide greatly enhances liver-targeted gene expression in mice. *Bioconjugation Chemistry*. 10, 1075-1083.
- SEBESTYEN M.G., LUDTKE J.J., BASSIK M.C., ZHANG G., BUDKER V., LUKHITANOV E.A., HAGSTROM J.E., WOLF J.A., 1998. DNA vector chemistry: the covalent attachment of signal peptides to plasmid DNA. *Nature Biotechnology*. 16, 808-815.
- SIMOES S., SLEPUSHKIN V., DUZGUNES N., PEDROSO DE LIMA M.C., 2001. On the mechanisms of internalization and intracellular delivery mediated by pH-sensitive liposomes. *Biochemical Biophysical Acta*. 1515, 23-37.
- SINGH M., BALRAM S., ARIATTI M., 2001. Lipoplex-mediated stable gene transfer into HeLa cells. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. 20, 889-891.
- STAMATATOS L., LEVENTIS R., ZUCKERMAN M.J., SILVIUS J.R., 1988. Interactions of cationic lipid vesicles with negatively charged phospholipid vesicles and biological membranes. *Biochemistry*. 27, 3917-3925.
- TANG F., HUGHES J.A., 1998. Introduction of a disulphide bond into a cationic lipid enhances transgene expression of plasmid DNA. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 242, 141-145.

- TEMPLETON N.S., LASIC D.D., FREDERICK P.M., STREY H.II., ROBERTS D.D., PAVLAKIS G., 1997. Improved DNA:liposome complexes for increased systemic delivery and gene expression. *Nature Biotechnology*. 15, 647-652.
- TSENG W.C., HASELTON F.R., GIORGIO T.D., 1999. Mitosis enhances transgene expression of plasmid delivered by cationic liposomes. *Biochimica Biophysica Acta*. 1445, 53-64.
- UNGER E.C., MCCREERY T.P., SWEITZER R.II., 1997. Ultrasound enhances gene expression of liposomal transfection. *Investigation Radiology*. 32, 723-727.
- VACIK J., DEAN B.S., ZIMMER W.E., DEAN D.A., 1999. Cell-specific nuclear import of plasmid DNA. *Gene Therapy*. 6, 1006-1014.
- WAGNER E., OGRIS M., ZAUNER W., 1998. Polylysine-based transfection systems utilizing receptor-mediated delivery. *Advances Drug Delivery Reviews*. 30, 97-113.
- WASAN E.K., REIMER D.L., BALLY M.B., 1996. Plasmid DNA is protected against ultrasonic cavitation-damage when complexed to cationic liposomes. *Journal Pharmacological Science*. 85, 427-433.
- WILKE M., FORTUNATI E., VANDENBROEK M., HOOGEVEEN A.T., SCHOLTE B.J., 1996. Efficacy of a peptide-based gene delivery system depends on mitotic activity. *Gene Therapy*. 3, 1133-1142.
- WILSON G.L., DEAN B.S., WANG G., DEAN D.A., 1999. Nuclear import of plasmid DNA in digitonin-permeabilized cells requires both cytoplasmic factors and specific DNA sequences. *J.Biol.Chem.* 274, 22025-22032.
- WYBER J.A., ANDREWS J., D'EMMANUELE A., 1997. The use of sonication for the efficient delivery of plasmid DNA into cells. *Pharmaceutical Research*. 14, 750-756.
- WYMAN T.B., NICOL F., ZELPATHI O., SCARIA P.V., PLANK C., SZOKA F.C., 1997. Design, synthesis and characterization of a cationic peptide that binds to nucleic acids and permeabilizes bilayers. *Biochemistry*. 27, 3008-3017.