

Modificació genètica; un pas per la medicina del futur



Irene Gómez Gràcia
Treball de recerca

Institut Lluís Vives

2017-2018

Índex

Agraïments	4
Introducció	5
Metodologia	6
Hipòtesi	6

PART TEÒRICA

1. Els gens	7
1.1 Què són?	7
1.2 Canvis a l'ADN	8
1.3 Noves tecnologies	10
2. Fent una mica d'història.....	11
3. Enginyeria genètica i tecnologia de l'ADN recombinant.....	12
3.1 Enzims de restricció.....	14
3.2 Tècniques de transferència o "blotting"	14
3.3 Seqüenciació de l'ADN	14
3.4 Reacció en cadena de la polimerasa (PCR).....	15
3.5 Clonació de l'ADN.....	15
4. Organismes genèticament modificats.....	16
4.1 Què són?.....	16
4.2 Aplicacions dels GMO.....	16
4.3 Els transgènics a l'actualitat	18
5. Biomedicina i transgènics.....	18
5.1 Aplicacions mèdiques.....	19
▪ Nutrició i salut	19
▪ Diagnòstic:	19
▪ Biofàrmacs	19
▪ Vacunes:	19
▪ Nous antibiòtics:.....	19
▪ Nous tractaments:.....	20
5.2 Biofàrmacs.....	20
• Què són?.....	20

•	Obtenció de biofàrmacs	20
•	Comença la revolució	21
•	Avantatges i aplicacions	22
5.3	Producció de proteïnes “recombinants”	23
•	Expressió dels gens	23
•	Sistemes d’expressió	24
6.	Biotecnologia microbiana.....	26
6.1	Què són els microorganismes?	26
6.2	Aplicacions dels microorganismes	26
a)	Enzims microbians.....	26
b)	Creació de proteïnes terapèutiques	27
6.3	Producció d’insulina recombinant	27
•	Què és la insulina?.....	27
•	Història de la insulina	28
•	Utilització de la insulina.....	29
6.4	Producció de Somatostatina (hormona del creixement)	30
•	Què és la somatostatina?	30
•	Futur de la hormona.....	30
7.	Vacunes	31
7.1	Com treballa el sistema immunitari?	31
7.2	Tipus de vacunes clàssiques:	32
i.	Vacunes atenuades	32
ii.	Vacunes inactivades	32
iii.	Vacunes de subunitats.....	32
7.3	Vacunes modernes	33
a)	Vacunes atenuades mitjançant modificació genètica.....	33
b)	Vacunes sintètiques	34
c)	Vacunes de subunitats o recombinants	35
d)	Vacunes d’ADN.....	37
7.4	Producció de vacunes modernes	38
8.	Anticossos monoclonals	39
8.1	Què són els anticossos?	39
8.2	La nova invenció: anticossos monoclonals.....	39
8.3	Producció d’anticossos monoclonals	40

8.4	Utilització dels anticossos monoclonals	41
9.	Proteïnes que intervenen als processos de coagulació	42
9.1	Factors sanguinis	42
9.2	Activador tissular del plasminogen	43
	• Obtenció a partir de tècniques recombinants.....	43

PART EXPERIMENTAL

Objectiu	44
1. Introducció	44
2. Proteïna recombinant: GFP	46
2.1 Què és la GFP?.....	46
2.2 Usos de la proteïna.....	47
3. Producció de proteïnes recombinants	47
3.1 Què és un plasmidi?	48
3.2 Sistema pGLO	49
a. pGLO	49
b. Regulació del pGLO	50
4. Disseny de l'experiment.....	51
5. Desenvolupament	51
5.1 Transformació dels bacteris	52
5.2 Sembrar	53
5.3 Creixement bacterià.....	56
6. Comprovació de la sobreexpressió.....	57
6.1 Obtenció de mostres	58
6.2 Electroforesi SDS-PAGE	59
6.2.1 Preparació del gel de poliàcrilamida.....	59
6.2.2 Electroforesi	60
6.2.3 Tinció del gel.....	61
7. Resultats obtinguts.....	61
Obtenció dels resultats i conclusió.....	62
Fonts d'informació	63

Agraïments

Vull destacar l'enorme ajuda que he rebut des de la Universitat de Barcelona, ja que gràcies al programa de Bojos per la Bioquímica de la fundació Catalunya La Pedrera, he pogut entrar dins d'un laboratori i realitzar la part pràctica, que m'ha servit per entendre la complexitat del que estàvem fent i motivar-me de cara al meu futur.

En especial, al Josep M. Fernández Novell, per haver pensat en una pràctica que pogués realitzar per al meu treball i ajudat a dur-la a terme.

Donar les gràcies també per la seva ajuda a la meva tutora, Isabel Fernández i a la professora de biologia, Isabel Farrés.

Per últim, agrair a la meva família el seu suport durant aquests mesos.

Introducció

Amb aquest treball de recerca m'he volgut centrar amb la modificació genètica dels organismes, un tema que sempre m'ha interessat i motivat. La biologia és la branca de la ciència que més m'interessa i el fet d'haver estat fent un curs de bioquímica a la Universitat de Barcelona m'ha motivat encara més per seguir endinsant-me en aquest món.

La manipulació de gens, els transgènics i l'enginyeria genètica són termes que estan molt de moda. Últimament tots en sentim a parlar i creen molta polèmica, confusió i controvèrsia, sobretot per temes ètics.

Volia saber més d'aquests éssers vius modificats i a mesura que he anat buscant, he trobat una part amagada d'aquests. Una aplicació que obra moltes portes a la medicina del futur. És per això que he decidit investigar més sobre els microorganismes manipulats genèticament.

Em plantejava també com es canvia el genoma d'un ésser viu, si realment és una tasca increïblement difícil com sembla, quins perills conté i de què ens pot servir.

Metodologia

He dividit el treball en dues parts. La primera part és una introducció teòrica a la modificació d'organismes i una recerca d'alguns dels fàrmacs i altres productes fabricats actualment en laboratoris a partir d'organismes modificats amb el fi de millorar la nostra qualitat de vida i curar malalties.

Aquest estudi és la base que m'ha calgut per entendre la segona part, que és una experimentació al laboratori de la universitat de Barcelona.

Amb l'ajuda dels investigadors del departament de bioquímica de la UB, he modificat el genoma d'un bacteri per què expressi una proteïna concreta, la GFP. Aquesta, té la característica que emet una llum verda fluorescent sota llum ultraviolada.

A la part teòrica m'he centrat en entendre bé el concepte de manipulació d'organismes, així com les diferents tècniques emprades aquests darrers anys. Sobretot, el que m'interessava recercar eren les aplicacions actuals que presenta la modificació d'organismes en el camp mèdic i quines perspectives de futur té.

Hipòtesi

L'objectiu de tota la investigació és estudiar com els coneixements de genètica i biotecnologia estan canviant el camp de la medicina i totes les aplicacions que tenen, i que ajuden a tanta gent a curar-se.

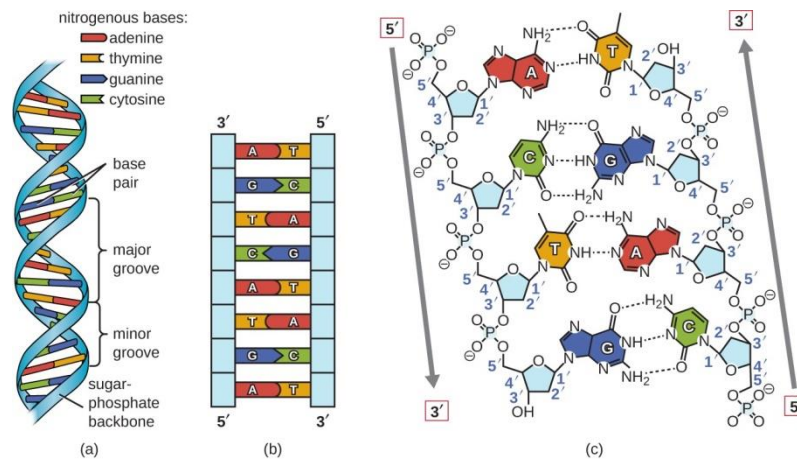
Demostrar si la manipulació d'organismes té una vessant on la producció industrialitzada i insostenible, la pèrdua de biodiversitat, la contaminació genètica i del sòl i la resistència a antibiòtics no hi entren i si aquesta possible vessant podria representar la medicina del futur.

PART TEÒRICA

1. Els gens

1.1 Què són?

Els gens són la base fonamental de tota la vida, determinen les propietats de tots els éssers vius i són seqüències d'ADN definides. Degut a que l'estructura i composició de l'ADN de tots els éssers vius és essencialment la mateixa, s'ha inventat una tecnologia que pot aïllar, canviar o reproduir un gen i probablement provocar un impacte sobre cada un dels aspectes d'aquest.



1. Estructura de la molècula d'ADN; Doble hèlix formada per polímers de nucleòtids. Els segments d'ADN porten la informació genètica, d'altres tenen propòsits estructurals i regulen la informació genètica i la seva duplicació.

Els gens es poden dividir en dues grans categories: estructurals i reguladors. Els gens estructurals codifiquen per a proteïnes que determinen les capacitats bioquímiques de l'organisme al catalitzar reaccions sintètiques o catabòliques, o de manera alternativa, exerceixen un paper més estàtic com a component de les estructures cel·lulars. En canvi, els gens reguladors controlen l'expressió dels gens estructurals, determinant la velocitat de producció dels seus productes proteics com a resposta a senyals intra o extracel·lulars.

Per tant, els gens estructurals sempre romanen actius, independentment de les condicions del medi i els reguladors, en canvi, la seva activitat està controlada per les necessitats de la cèl·lula o l'organisme.

1.2 Canvis a l'ADN

Els primers estudis de Watson i Crick, entre altres, a principis dels anys cinquanta, van conduir a la construcció del model de la doble hèlix, descrivint l'estructura molecular de l'ADN i fent hipòtesis sobre les implicacions que té dins dels éssers vius, per arribar a una comprensió de la replicació gènica. Des de llavors, ha hagut una gran quantitat de descobriments sobre les complexes interaccions requerides per a expressar la informació codificada a la molècula de l'ADN a l'expressió cel·lular o del organisme. Els canvis en la molècula de l'ADN que possibiliten l'aparició de codis complementaris per a una espècie, és el mitjà utilitzat pels organismes per a evolucionar i adaptar-se a noves condicions ambientals. En essència, els canvis a l'ADN d'un organisme poden ocórrer de dues maneres:

1. Per mutació: que consisteix en l'addició o eliminació d'un o més components químics de la molècula de l'ADN.
2. Per intercanvi d'informació genètica o d'ADN entre organismes similars, normalment per reproducció sexual i per transferència horitzontal en bacteris.

La recombinació genètica, tal i com ocorre durant la reproducció sexual normal, consisteix en el trencament i lligament de les molècules de ADN dels cromosomes, i tenen una importància molt gran a tots els éssers vius per a la reordenació del material genètic.

2. Manipulació genètica de la fruita.



La genètica clàssica va ser, fins fa poc, la única via mitjançant la qual l'herència podia ser estudiada o manipulada. Tot i així, durant els últims anys, les noves tècniques han permès la possibilitat de manipular genèticament organismes a taxes mai pensades, permetent inclús l'intercanvi d'ADN al laboratori entre diferents espècies.

La manipulació del material genètic en organismes pot ser ara aconseguida de tres maneres clarament definibles: a nivell d'organismes, cel·lular i molecular.

Manipulació d'organismes

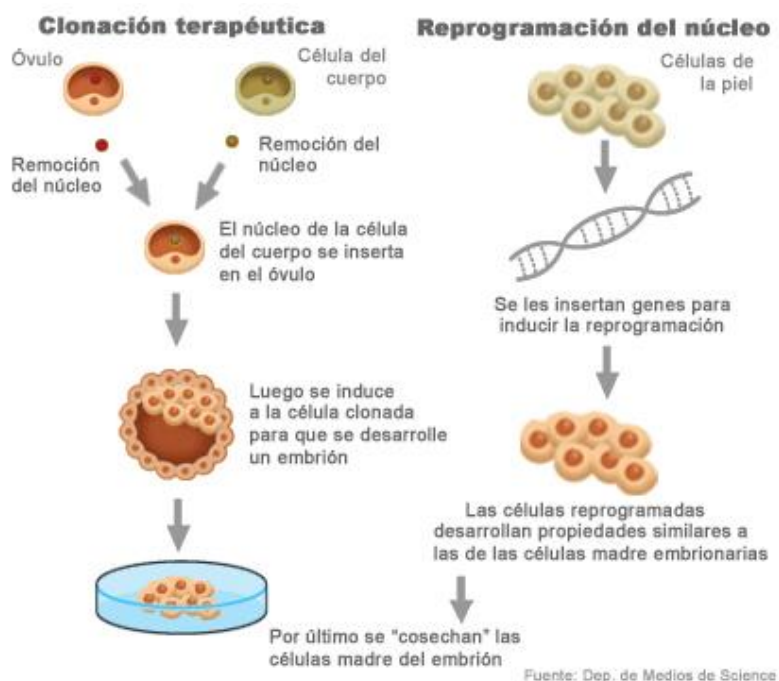
La manipulació genètica d'organismes complets ha estat succeint de manera natural per reproducció sexual des del principi dels temps. El procés evolutiu de la majoria dels éssers vius ha implicat la interacció entre els seus genomes i el medi ambient. El control actiu de la reproducció sexual s'ha practicat a l'agricultura durant segles. En

temps més recents s'ha utilitzat amb microorganismes de caràcter industrial, com els llevats. Aquest tipus de manipulació implica processos de selecció, mutació, creuaments sexuals, hibridacions, etc. Tot i així, és un procés altament aleatori i pot portar molt de temps aconseguir els resultats desitjats. Alguns exemples d'aplicacions de la manipulació d'organismes són la cria selectiva que ha fet l'home durant milers d'anys l'ésser humà amb el fi de millorar la producció dels cultius i del bestiar amb propòsits alimentaris. Sense donar-se compte i sense la necessitat de laboratoris cars i sofisticats, ni científics i experiments planejats, la humanitat porta manipulant els gens durant centenars d'anys.

La selecció de plantes i animals amb característiques específiques és escollir els organismes amb gens útils i aprofitar-se'n del seu potencial genètic per al benefici propi. En el camp de l'agricultura els beneficis han estat abundants amb la millora de les plantes i animals, mentre que a les indústries biotecnològiques s'ha aconseguit incrementar considerablement la productivitat, com és el cas de la producció d'antibiòtics i enzims.

Manipulació cel·lular

La manipulació a nivell cel·lular de l'ADN ha estat utilitzada durant dècades i implica o bé la fusió cel·lular o el cultiu de cèl·lules i la regeneració de plantes senceres a partir d'aquestes cèl·lules. Aquest és un procés gairebé a l'atzar o directe a diferència de les manipulacions en organismes, podent identificar els canvis de manera molt més ràpida. Exemples biotecnològics exitosos d'aquests mètodes inclouen els anticossos monoclonals i la clonació de moltes espècies importants de plantes.



3. Clonació terapèutica

Manipulació molecular

Les manipulacions moleculars de l'ADN i el RNA han vingut ocorrent durant els últims trenta anys i han possibilitat una nova era en la manipulació genètica, fent possible, per primera vegada a la història, un control directe dels canvis. Aquest procés avarca l'àrea coneguda com a enginyeria genètica o tecnologia de l'ADN recombinant, que està produint a l'actualitat canvis dramàtics al camp de la biotecnologia. En aquest tipus de tècniques l'investigador és capaç de conèixer en gran part els canvis que es produiran. A l'actualitat és possible afegir o suprimir parts de la molècula d'ADN amb una gran precisió, i el producte pot identificar-se fàcilment. Les empreses industrials avui en dia estan implicades en la producció de nous tipus d'organismes i la producció de nous compostos de caràcter farmacèutic o químic.

A diferència de la recombinació genètica clàssica, les tècniques de "l'ADN recombinant", "enginyeria genètica" o "clonació de gens", ofereixen potencialment oportunitats il·limitades per a la creació de noves combinacions de gens, que, per el moment, no existeixen en condicions naturals.

Aquestes tecnologies gèniques, donen lloc a la formació de noves combinacions de material hereditari mitjançant la inserció d'àcids nucleics en un virus, plasmidi bacterià o algun altre sistema de vectors, de manera que permeti la seva incorporació en un organisme hoste.

1.3 Noves tecnologies

Durant les últimes dècades, la tecnologia de recombinació de l'ADN, també coneguda com enginyeria genètica, ha revolucionat la biologia. El camp de la salut és un dels més beneficiats amb el desenvolupament d'aquesta tecnologia. Les investigacions que es duen a terme a aquesta àrea estan enfocades al diagnòstic oportú de malalties, així com al seu possible tractament a través de la teràpia amb molècules recombinants i introducció de gens. A més, la manipulació de gens proporcionarà al futur una eina fonamental per a l'eliminació de malalties mortals per a l'home.

Parlem, per tant, un progrés molt ràpid de la biotecnologia, una ciència que es pot definir com a l'ús d'organismes vius, o els productes d'aquests, pel benefici humà (o pel benefici del seu entorn) amb el fi de desenvolupar un producte o resoldre un problema. La biotecnologia es considera com un ampli conjunt de camps importants com la microbiologia, bioquímica, biologia molecular, biologia cel·lular, immunologia, enginyeria de proteïnes, enzimologia, classificades com a tècniques de la nutrició i un ampli ventall de bioprocessos tecnològics.

Amb aquesta definició, tot i semblar una ciència molt moderna, podem veure que moltes de les aplicacions que presenta actualment la biotecnologia són antigues

pràctiques amb nous mètodes. L'ésser humà ha utilitzat organismes en el seu benefici en moltíssims processos al llarg de milers d'anys. La domesticació d'animals com cabres o ovelles, l'ús de microorganismes per a la fermentació i realització de pa, formatge, iogurt, begudes alcohòliques com la cervesa i el vi, etc.

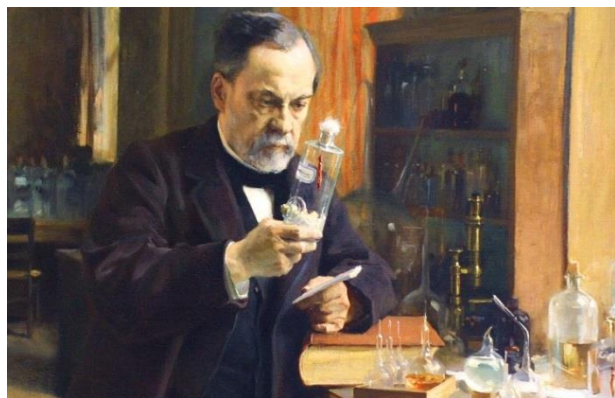
Tot i així, és la més innovadora de les tecnologies, i dona lloc a grans desenvolupaments de teràpies, tractaments per a nombroses malalties humanes i animals, al disseny de tests de diagnòstic per a incrementar la prevenció de malalties i el control de la pol·lució, la millora de molts aspectes de l'agricultura de plantes i animals, la neteja i millora del medi ambient, el disseny de processos de manufacturació industrial més nets, etc. Ofereix, per tant, innumerables oportunitats per al desenvolupament humà (sobretot dins dels camps de la nutrició, medicina i indústria), i no es pot negar que això pugui comportar un rebuig social/ètic, degut al perill que l'ús inapropiat pot suposar pels drets humans.

És per això que tot i que és una ciència que presenta certs perills en cas d'ús inadequat i molts interrogants en quant a on ens pot portar, posseeix unes cares potencialment bones, eficaces i prometedores. M'he volgut centrar en l'ús mèdic que tenen moltes aplicacions biotecnològiques i trobar les virtuts més esperançadores i satisfactòries.

2. Fent una mica d'història...

La revolució biotecnològica va començar a finals dels anys setanta, quan els científics van aprendre a alterar, de forma precisa, la constitució genètica dels organismes vius mitjançant processos fora de les pràctiques de reproducció tradicional.

Tot i que els sumeris i babilonis bevien cervesa des de l'any 6000 a. C i els egipcis coïen el pa des de l'any 4000 a.C, es considera que va ser Louis Pasteur el pare de la biotecnologia, establint les bases científiques d'aquesta, demostrant la capacitat de fermentació dels microorganismes entre 1857 i 1876. Durant aquells anys, Gregor Mendel va provar que la transmissió dels caràcters hereditaris obeeix a normes precises, naixent així la idea dels gens i al 1869, va ser aïllat per primer cop l'ADN.



4. Louis Pasteur, pare de la biotecnologia.

A finals del segle XIX es va començar a treballar amb bacteris i llevats, produint compostos orgànics com l'etanol, l'àcid acètic, el butanol i l'acetona mitjançant processos de fermentació de microorganismes.

A la dècada del 1940, es van aplicar complicades tècniques d'enginyeria al cultiu en massa de microorganismes per a excloure els microorganismes contaminants; per exemple, el cultiu d'antibiòtics, aminoàcids, àcids orgànics, enzims, esteroides, polisacàrids, vacunes i anticossos monoclonals.

A partir de llavors va néixer el que coneixem com a biotecnologia moderna, i van anar fent-se nous estudis sobre les propietats físiques de l'ADN mitjançant tècniques de difracció dels raigs X.

Rosalind Franklin, autora d'una fotografia de l'ADN mitjançant tècniques de raig X l'any 1952 va ser una peça clau per al descobriment d'aquest. Watson i Crick, l'any 1953, arrel de la feina feta per la científica van publicar els seus postulats de l'estructura de la doble hèlix de l'ADN. Durant els següents anys es van produir molts esdeveniments com el desxiframent del codi genètic, el descobriment dels plasmidis bacterians, i es desenvoluparen les tècniques de clonació de l'ADN a partir del descobriment de l'ADN lligasa, l'enzim que uneix fragments d'ADN.

A principis del anys 70, es va descobrir un enzim capaç de tallar segments específics de les cadenes d'àcids nucleics: els enzims de restricció. Aquests fragments s'uneixen a fragments d'origens diferents, per així poder-se formar un nou ADN anomenat recombinant. És a dir, els gens d'una espècie poden ser aïllats, i després ser modificats o trasplantats a cèl·lules vives d'una altra espècie.

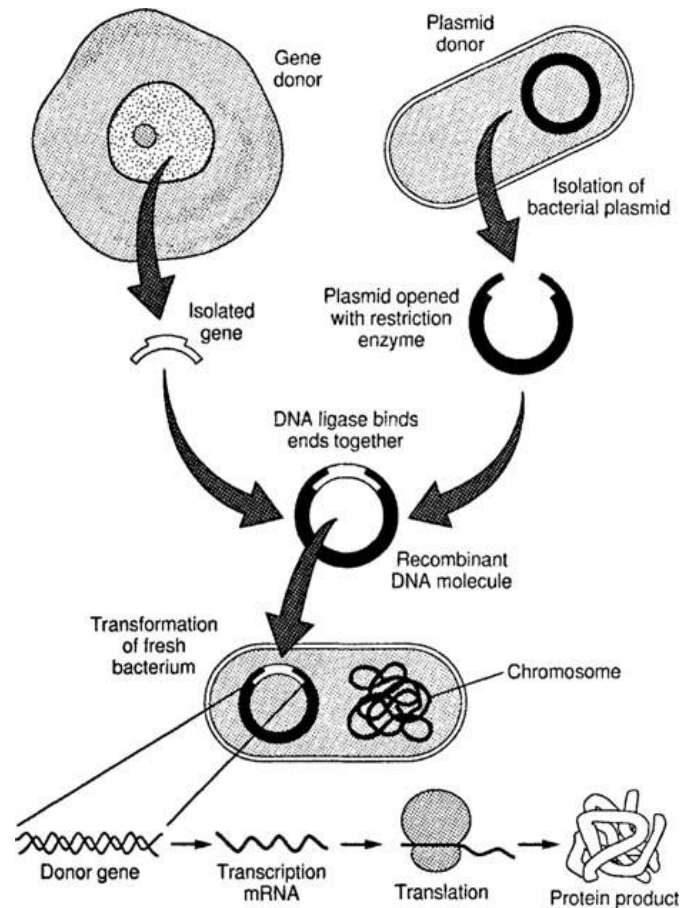
L'any 1977 es formà la primera companyia d'enginyeria genètica (Genentech), fundada per a utilitzar tots els mètodes de l'ADN recombinant en l'elaboració de productes farmacèutics. A partir de llavors, aquest ha sigut un camp que no ha part de créixer i desenvolupar-se.

3. Enginyeria genètica i tecnologia de l'ADN recombinant

La tecnologia genètica moderna pot ser utilitzada per a modificar els genomes d'organismes vius. Aquest procés és conegut com a enginyeria genètica. És una modificació induïda al laboratori, és a dir, no es produeix a l'atzar com ocorria abans. És per això que parlem d'enginyeria genètica moderna.

La idea de l'ADN recombinant va ser proposada per primera vegada per Peter Lobban, un estudiant graduat del doctor Dale Kaiser en bioquímica de la Universitat de Stanford. Aquesta tècnica dona lloc a la producció de DNA mitjançant una via artificial.

Per a facilitar l'estudi dels gens, aquests poden ser aïllats i amplificats. Un mètode per a fer-ho és la clonació del gen, inserint-lo en un altre molècula d'ADN que serveixi de vehicle o de vector que pot ser reproduït a cèl·lules vives. Quan aquests dos ADNs d'origens diferents són combinats, el resultat és una molècula d'ADN recombinant.



5. ADN recombinant

Aquesta tecnologia utilitza una sèrie de tècniques que tenen variacions per a cada procés en específic, però de manera general s'apliquen tècniques com:

- Extracció de DNA
- Fragmentació de l'ADN mitjançant nucleases de restricció o amplificació de DNA mitjançant PCR
- Unió dels fragments d'ADN a vectors de clonació
- Transformació de l'ADN recombinant a una cèl·lula hoste i selecció de cèl·lules transformades

La utilització d'aquestes tècniques és el resultat de l'ús d'alguns mecanismes que han permès la manipulació de l'ADN. Un dels mecanismes són els enzims de restricció.

3.1 Enzims de restricció

El descobriment d'aquests ha permès als investigadors manipular segments específics d'ADN, facilitant enormement l'estudi d'aquesta molècula de gran tamany.

Els enzims de restricció, o endonucleases de restricció, reconeixen seqüències de bases específiques a l'ADN de doble hèlix i tallen a llocs concrets les dues cadenes. Van ser obtinguts a partir d'una gran varietat d'organismes procariotes, en els quals la seva funció biològica consisteix en eliminar mitjançant la seva activitat d'endonucleasa, l'ADN extern que pogués ingressar dins del bacteri. L'ADN propi del microorganisme no es destrueix perquè els llocs reconeguts pels seus propis enzims de restricció es troben metilats¹.

S'han purificat i caracteritzat més de 100 enzims de restricció. S'utilitzen per a tallar molècules d'ADN i proporcionar fragments específics que es poden analitzar i sobretot manipular amb més facilitat que la molècula original.

3.2 Tècniques de transferència o "blotting"

Les tècniques de *Southern blot* i *Northern blot* s'utilitzen per a separar i caracteritzar ADN i ARN respectivament. L'objectiu de les dues és separar les molècules per el seu tamany i càrrega i posteriorment, la transferència a una membrana per a identificar un fragment específic d'ADN o ARN particular o una proteïna d'interès.

3.3 Seqüenciació de l'ADN

La seqüenciació de l'ADN es realitza mitjançant mètodes els quals la seva finalitat és la determinació de l'ordre dels nucleòtids (A, C, G i T) en una molècula d'ADN. La seqüència d'ADN constitueix la informació genètica hereditària del nucli cel·lular, els plasmidis (bacteris), el mitocondri i els cloroplasts (en plantes) que formen la base dels programes de desenvolupament dels éssers vius. Així doncs, determinar la seqüència d'ADN és útil a l'estudi de la investigació bàsica dels processos biològics fonamentals, així com en camps aplicats, com el diagnòstic de malalties hereditàries i la investigació forense.

Les tècniques actuals permeten realitzar aquesta seqüenciació a gran escala com el Projecte Genoma Humà.

¹ La metilació és l'addició d'un grup de metilè (-CH₃) a una molècula. És un procés fonamental per a la regulació del silenciament gènic i per tant pot provocar alteracions a la transcripció genètica sense necessitat de modificar la seqüència d'ADN. També poden ser metilades les proteïnes, regulant així la seva funció.

L'anàlisi de la seqüència de nucleòtids s'ha establert com a una tècnica extremadament útil per a la identificació, anàlisi i manipulació directa de l'ADN genòmic. Originàriament, els mètodes de separació i identificació es basaven en l'electroforesi en gel² i l'autoradiografia. Tot i així, els recents desenvolupaments en la tecnologia de seqüenciació han permès la automatització i la reducció de temps per a la obtenció de resultats. Així la introducció de substrats fluorescents permeten l'ús de sistemes de detecció per làser. La majoria dels seqüenciadors automatitzats a l'actualitat permeten l'obtenció de seqüències d'uns 1.000 parells de bases en unes 24 hores. Existeixen bases de dades públiques, tals com GenBank, que subministren nombrosos serveis *online* per a la identificació, alineament i comparació de seqüències. Els cromosomes individuals contenen molts milers de seqüències, algunes de les quals estan organitzades en gens mentre que d'altres semblen ser simplement seqüències flanquejants o regions espaiadores.

3.4 Reacció en cadena de la polimerasa (PCR)

PCR (Polymerase Chain Reaction) és una de les tècniques de la tecnologia a partir de l'ADN recombinat, descoberta l'any 1985 amb el fi de produir milions de còpies d'una seqüència específica de DNA en aproximadament dues hores *in vitro*, si es coneixen les seqüències que van a continuació d'aquesta seqüència blanca.

La PCR permet una amplificació massiva d'una seqüència que constitueix menys de la milionèsima part de l'ADN total d'un organisme superior. És una tècnica extremadament sensible, es pot amplificar i detectar una única molècula d'ADN.

3.5 Clonació de l'ADN

La primera tècnica desenvolupada per a ampliar l'ADN en quantitat és coneguda com a clonació. Un fragment d'ADN obtingut a partir d'un organisme extern és inserit en un vector (o transportador) compost per ADN, i el resultat obtingut (ADN recombinant) és utilitzat per a transformar cèl·lules hostes. A mesura que la cèl·lula hoste es divideix, a més de replicar el seu propi ADN, ella també replica l'ADN del vector, és a dir, l'ADN extern. Per tant, es podrien aïllar quantitats relativament grans d'aquest ADN extern.

Aquesta tecnologia, amb l'ús de totes aquestes tècniques, dona lloc a infinites aplicacions, donant lloc a la creació d' Organismes Genèticament Modificats (**OGM**).

² L'electroforesi en gel és un grup de tècniques de laboratori emprades per aïllar molècules presents en mesclades, basades en les seves propietats biofísiques tals com la mida, la forma, la càrrega elèctrica o el seu punt isoelèctric. L'electroforesi en gel té usualment un propòsit analític, però també tenen utilitat com a tècnica preparativa per a purificar parcialment molècules abans d'emprar altres tècniques com l'espectrometria de masses, la clonació, la seqüenciació d'ADN, etc.

4 Organismes genèticament modificats

4.1 Què són?

La OMS defineix els organismes genèticament modificats (OGM) com a organismes en els quals el material genètic (ADN) ha estat alterat d'una manera artificial. La tecnologia genètica, permet transferir gens seleccionats individuals d'un organisme a un altre, també entre espècies no relacionades.

Els organismes transgènics són organismes genèticament modificats que tenen inserit un tros d'ADN al seu genoma d'una altra espècie. És per això que tots els transgènics són genèticament modificats però no tots els OGM són transgènics. Els gens també poden ser inhibits per a que no expressin determinades característiques i no necessàriament han de tenir introduïts trossos d'ADN d'altres espècies dins del seu genoma.

Els organismes transgènics han estat obtinguts a partir d'una tècnica utilitzant cèl·lules vives, cultiu de teixits o molècules derivades d'un organisme, com per exemple, els enzims. Tot això és suficient per a obtenir, modificar o millorar un producte, o desenvolupar un microorganisme amb propòsits de recerca específics.



6. Polèmica dels GMO

4.2 Aplicacions dels GMO

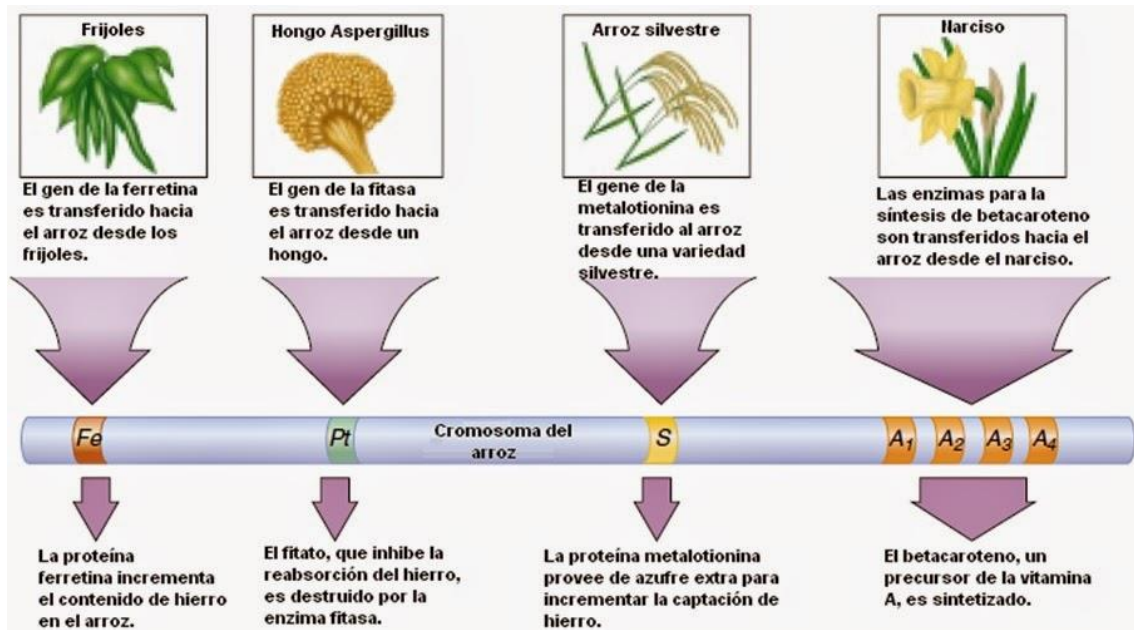
A l'actualitat, l'aplicació de la tecnologia de l'ADN recombinant és molt extensa, i afecta a tots els sectors de la producció;

- en agricultura i ramaderia: plantes i animals transgènics, clonacions
- en alimentació: aliments transgènics
- en indústries: biocombustibles, biosensors, etc.
- en el medi ambient: tractament de residus, conservació de genomes, etc.

-en medicina i farmacologia: teràpia gènica, noves vacunes, etc.

Aquesta habilitat de transformar gens en plantes ha donat lloc a la creació de característiques agronòmiques com la resistència a herbicides o a insectes i a les primeres espècies transgèniques; blat de moro, soja i cotó. Els investigadors han introduït gens procedents de bacteris a trossos de ADN per a protegir la planta contra plagues i malalties, i així també reduint l'aplicació de pesticides.

Un exemple d'espècie transgènica creada amb propòsits comercials, amb el fi d'augmentar el contingut nutricional dels aliments, és el cas de l'arròs daurat; un arròs modificat creat per a lluitar contra la malnutrició. Està modificat per a que produeixi grans quantitats de beta-carotè, una provitamina que l'organisme converteix en vitamina A. Segons afirmacions recents, 500.000 nens de tot el món queden cecs cada any degut a una carència de vitamina A. Actualment, els treballadors sans porten dosis d'aquesta vitamina d'un poble a l'altre per a combatre la ceguera. El simple fet d'afegir el nutrient a la reserva d'aliments pot resultar molt més eficaç i, en teoria, molt més efectiu.



7. Arròs daurat

No obstant, tot i que els aliments modificats genèticament són prometedors, tenen les seves limitacions. Per exemple, la provitamina a l'arròs daurat, ha de ser dissolta en greix abans de que pugui ser utilitzada per l'organisme. Pot ser que els nens que manquen de greix a la seva dieta no aprofitin tots els beneficis d'aquest arròs enriquit.

4.3 Els transgènics a l'actualitat

Quan a l'organisme en qüestió no només se li modifica el material genètic sinó que se li afegeix un tros d'un altra espècie parlem d'organismes transgènics. Pot ser, per tant, que una planta tingui un gen inhibidor i no produeixi una proteïna i llavors seria GM o que la planta tingui, per exemple, un gen d'un bacteri per a que produeixi una altra proteïna, i llavors seria transgènica.

L'increment d'ús d'animals transgènics a Europa és a causa del increment d'ús que estan tenint en recerca biomèdica bàsica. Aquests, són majoritàriament ratolins modificats per a que expressin gens addicionals.

Tot i que no tots els països ofereixen estadístiques sobre el nombre d'ús d'animals genèticament modificats, sabem que aquesta tecnologia s'ha disparat de manera que els nombres de ratolins i altres animals transgènics són cada vegada més utilitzats.

Les tècniques de ADN recombinant (enginyeries genètica, proteica i metabòlica) han donat lloc a la producció d'un gran nombre de pèptids, proteïnes i productes bioquímics procedents naturalment de cèl·lules que abans no els produïen. Aquesta tecnologia, que té aproximadament uns 25 anys, està convertint-se en una de les tecnologies més importants desenvolupades aquest segle.

5. Biomedicina i transgènics

Podem per tant afirmar que es poden modificar també els genomes amb propòsits mèdics, que la modificació genètica és capaç de millorar la nostra qualitat de vida, ja que aquesta tecnologia té també unes aplicacions importants, útils i potencials en el camp de la medicina.

Fa ja molts anys que les malalties humanes es consideren el producte de la interacció d'entre un component de predisposició genètica i un medi ambient desencadenant.

La importància de la genètica de cada individu en el desenvolupament d'una malaltia ha fet que cada vegada més s'utilitzi la genètica molecular en les activitats clíniques quotidianes; tant és així que s'estan introduint tècniques moleculars per a diagnòstics i la teràpia gènica és cada vegada més utilitzada com a tractament alternatiu per a algunes malalties.

Tot i així, crida l'atenció el poc que l'ambient mèdic coneix totes les tècniques que sorgeixen de la biologia molecular, molt utilitzades actualment en investigació.

Sens dubte, un dels avenços que s'ha obtingut aquests últims anys i un dels més prometedors dins de la investigació biomèdica ha sigut el desenvolupament d'animals transgènics i d'animals *knock-out*³.

5.1 Aplicacions mèdiques

Utilitzant les noves tècniques de l'ADN recombinant, les aplicacions que donen lloc dins del camp de la medicina són infinites, que es poden separar en grans grups:

- **Nutrició i salut:** la biotecnologia moderna pot contribuir a disminuir els problemes de desnutrició, atenuant carències nutricionals i millorant l'estat de salut de les persones afectades. També pot contribuir a solucionar problemes específics que afecten a grups de persones, com és el cas de determinades al·lèrgies o les persones diabètiques, o a reduir el contingut de compostos tòxics als productes de consum habitual.
- **Diagnòstic:** una de les aplicacions de major impacte de la tecnologia de l'ADN és en desenvolupament de noves tècniques per al diagnòstic clínic. Això ha permès comptar amb tecnologies més eficients i nous mètodes per al diagnòstic de malalties infeccioses i genètiques. Entre aquestes es troben:
 - les tècniques de base immunologia basades en la reacció antígen-cos. Els anticossos monoclonals tenen la propietat d'unir-se a l'antigen de manera molt específica amb la qual els mètodes d'anàlisi i diagnòstic desenvolupats a partir d'ells són molt precisos (tècnica ELISA, citometria de flux, immunofluorescència, etc.)
 - les tècniques de base genètica com la reacció en cadena de la polimerasa (PCR) que permet amplificar petites fraccions d'ADN per al seu posterior anàlisi.
- **Biofàrmacs:** entre els biofàrmacs, es troben aquells que compleixen una funció de substitució de molècules naturals com és el cas d'hormones, interferons, factors de coagulació, la uroquinasa, els anticossos monoclonals i els antígens per immunoteràpies.
- **Vacunes:** la tecnologia de l'ADN recombinant ha permès la invenció d'una nova generació de vacunes: les recombinants i les d'ADN. També s'apliquen tècniques d'enginyeria genètica per a eliminar o inactivar selectivament, els gens de la virulència d'un agent infeccios mantenenint l'habilitat de provocar una resposta immune.
- **Nous antibiòtics:** a partir de la identificació de substàncies produïdes per microorganismes, plantes i animals amb propietats antibiòtiques

³ S'anomena *knock-out* a la tècnica biotecnològica que consisteix en inhibir un gen amb el propòsit de veure l'efecte que tenia aquest a l'organisme.

amb rellevància clínica, és possible incrementar la seva acció antibiòtica, alterant la seva composició molecular.

- **Nous tractaments:** les immunoteràpies es basen en el control de la resposta immune a través de l'aplicació d'anticossos monoclonals per a la prevenció de malalties virals, al tractament de malalties autoimmunes i contra el càncer per a reduir la resposta immune evitant el rebuig al transplantament, etc.

Les teràpies gèniques busquen inhibir l'expressió d'un gen o la inactivació del seu producte o substituir un gen inactiu per un còpia funcional que s'expressi i sintetitzi la proteïna necessària.

Ja que és un camp, tot i la seva poca edat, molt estès i en desenvolupament continu, ens centrarem a explicar detalladament algunes d'aquestes aplicacions esmentades, les més esteses i utilitzades fins al moment.

5.2 Biofàrmacs

- **Què són?**

El terme "biofarmacèutic" va ser utilitzat per primera vegada l'any 1980 i es va utilitzar per a descriure una classe de proteïnes terapèutiques produïdes per tècniques biotecnològiques modernes, específicament per vida de la enginyeria genètica. Aquest terme pot també referir-se a altres macromolècules, per exemple, productes basats en l'àcid desoxiribonucleic (ADN) o àcid ribonucleic (ARN) o inclús una cèl·lula completa.

Tot i que el terme no va ser establert fins al cap d'uns anys, des de 1950 s'han anat investigant les proteïnes produïdes naturalment al cos humà i les seves aplicacions terapèutiques. Alguns exemples poden ser els interferons i les interleucines, els factors de creixement, etc. Després de tot, les proteïnes són els principals components de les funcions cel·lulars. La informació emmagatzemada a l'ADN dirigeix la maquinària sintetitzadora de proteïnes de la cèl·lula per a produir proteïnes específiques requerides per a l'estructura, regulació i funció d'aquesta.

- **Obtenció de biofàrmacs**

Els fàrmacs coneguts i utilitzats avui en dia són obtinguts a partir de nombroses vies, ja siguin naturals o sintètiques. És indubtable el fet de que durant varies dècades el desenvolupament de fàrmacs s'ha enfocat primordialment cap a la creació i manufacturació de petites molècules d'origen sintètic, no obstant, aquesta tendència comença a desviar-se cap a un altre camí: el desenvolupament de biofàrmacs.

L'ús de proteïnes terapèutiques o biofàrmacs per al tractament de diverses malalties ha anat creixent els últims 30 anys, a més, aproximadament un de cada quatre dels nous fàrmacs que es llancen al mercat és un biofàrmac. Aquests, es poden definir com a molècules biològiques amb fins terapèutiques obtingudes a partir d'organismes vius, ja siguin bacteris, fongs, cèl·lules animals, llevats, entre altres.

Encara que el potencial farmacèutic d'aquestes molècules reguladores va ser generalment apreciat, l'ús amb fins terapèutics resultava poc pràctic degut a les petites quantitats que s'obtenien per mitjans naturals. L'arribada de la tecnologia de l'ADN recombinant va superar molts dels límits que existien i va marcar el començament d'una nova etapa de les ciències farmacèutiques. Actualment, podem afirmar que tot i l'increment en la demanda, l'ús de proteïnes terapèutiques encara es troba a la seva etapa inicial.

Els productes farmacèutics i els enzims industrials van ser els primers productes biotecnològics al món del mercat fets mitjançant ADN recombinant. Tot i els importants avenços en l'ADN recombinant i les seves aplicacions en cèl·lules de mamífers, els llevats continuen representant hostes atractius per a la producció de proteïnes. Tant és així que s'han desenvolupat massivament al llarg d'aquests últims anys i actualment existeixen més de 10.000 companyies farmacèutiques produint en total uns 5.000 biofàrmacs.

- **Comença la revolució**

Podem dir que els biofàrmacs han revolucionat la medicina actual. Els anticossos monoclonals, les vacunes modernes i la teràpia gènica estan augmentant els seus camps en la biotecnologia moderna, especialment en les àrees de salut humana. Tot i així, el fet de treure al mercat un producte com aquests comporta una enorme quantitat de temps en investigació i recursos que fan el procés difícil i que comporta que una gran quantitat d'aquests medicaments no arribin mai a veure la llum al mercat.

Tot i així, el cost de la producció d'aquests biofàrmacs, utilitzant sistemes d'expressió de mamífers és molt alt. Encara així, mirant el nombre de medicaments aprovats pels Estats Units i/o la Unió Europea, al 2013 hi havia 20.

No només es troben dificultats en relació a la seguretat, cost i eficiència durant el desenvolupament de biofàrmacs, sinó també presenten dificultats relacionades amb la producció d'aquests mateixos. El disseny i la producció van molt lligats, ja que les característiques del fàrmac han de ser definides breument, ja que d'aquesta informació dependrà a gran mesura la ruta de producció i el desenvolupament del mètode d'obtenció a escales majors.

Aquesta revolució biotecnològica dona lloc a la recerca, desenvolupament, producció i inclús marketing dels processos o medicaments. Poderosos i nous instruments, juntament amb la biotecnologia, han desencadenat noves disciplines científiques (les -òmiques: genòmiques, proteòmiques, etc.), que fan possible l'examinació i exploració del comportament de les proteïnes i molècules.

Encara que a l'actualitat es troben en ús clínic gairebé un centenar de productes biofarmacèutics, es calcula que més de 60 milions de persones s'han beneficiat ja d'aquests productes d'un mercat global d'uns 12.000 milions d'euros. Aquest mercat està en un creixement continu, la tecnologia de l'ADN recombinant ha tingut un gran impacte positiu en la producció de proteïnes farmacèuticament importants, superant així problemes com la disponibilitat de fonts, la seguretat del producte i proveeix un alternativa a l'extracció directa de fonts inapropiades o perilloses (fluids humans i animals) i facilita la generació de proteïnes recombinants terapèutiques que presenten avantatges respecte les natives.

És per aquests motius que s'estima que aproximadament 500 productes es troben a assajos clínics. La majoria d'ells es destinen al càncer i a les malalties cardiovasculars i infeccioses. Encara que molts d'aquests productes imitaven als compostos naturals, cada vegada són més aquells en els que se'ls introdueixen mutacions per enginyeria de proteïnes per a millorar la seva eficàcia terapèutica. Gairebé tots els productes són proteïnes tot i que, poc a poc, es van començant a comercialitzar productes basats en àcids nucleics, com vacunes d'ADN, oligonucleòtids antisentit i ribozims.

- **Avantatges i aplicacions**

Són molts els avantatges que ofereix la tecnologia de l'ADN recombinant, no només permet la producció de proteïnes a gran escala utilitzant la mateixa metodologia, sinó també permet realitzar modificacions genètiques a les mateixes, fet que proveeix clares avantatges sobre les modificacions químiques. Les proteïnes generades mitjançant l'enginyeria genètica són biocompatibles i biodegradables i les preparacions finals no posseeixen contaminants que puguin ser nocius pel pacient.

5.3 Producció de proteïnes “recombinants”

La producció en gran quantitat de les proteïnes d’interès dona lloc als següents passos:

- 1) Identificació i clonació del gen d’interès
- 2) Elecció del sistema d’expressió adequat
- 3) Clonació del gen d’interès en un vector compatible amb el sistema d’expressió escollit

- **Expressió dels gens**

La comunitat científica busca resoldre els reptes que implica l’expressió de proteïnes. Donat l’inspirador desenvolupament i els avenços en la descodificació dels genomes, l’expressió dels productes dels gens en proteïnes funcionals, en especial amb rendiments elevats, continua sent un repte complex.

Les característiques particulars de cada un dels teixits del nostre cos, depenen de les proteïnes, que són expressades pels gens que tenim al nucli de les nostres cèl·lules.

Podem dir, per tant, que les malalties de base genètica són el resultat d’una expressió incorrecta d’aquests gens específics que codifiquen tals proteïnes.

Quan diem “expressió incorrecta” pot ser:

- expressió errònia de les proteïnes
- expressió de la proteïna adequada en un lloc equivocat (falla en l’expressió histo específica)
- expressió de la proteïna adequada però a deshora (falla en l’expressió crono específica)
- expressió d’una proteïna adequada però en quantitats anormalment altes o baixes.

Aquestes anormalitats són el resultat de mutacions a qualsevol regió del gen, sigui una regió codificant o no.

Són, llavors, els gens, els que tenen les seqüències que regulen l’expressió d’aquestes proteïnes, la seva funció adequada, la seva expressió en el lloc i temps correctes i en la seva quantitat justa.

Les mutacions que es produeixen en les regions codificants del gen, donen com a resultat la formació de proteïnes no funcionals o amb una funció alterada.

Les mutacions en les regions reguladores del gen (els ressaltadors i promotors), alteren el control transcripcional adequat del gen, donant com a resultat modificacions en la

quantitat de proteïna sintetitzada (en excés o en defecte), així com alteracions de la histoespecificitat i cronoespecificitat.

L'expressió de proteïnes requereix dues decisions importants inicials: la selecció de l'estratègia de clonació i la selecció del tipus de cèl·lula que s'utilitzarà per a l'expressió. Així mateix afegeix a altres requeriments la recerca d'un alt rendiment, com la necessitat de mètodes fàcils i factibles per una clonació ràpida i aïllament de proteïnes.

- **Sistemes d'expressió**

L'expressió gènica és el procés mitjançant el qual tots els organismes procariotes i eucariotes transformen la informació codificada als àcids nucleics en les proteïnes necessàries per al seu desenvolupament i funcionament.

Actualment, ha augmentat la demanda per a produir més proteïnes i en menys temps. Per un costat, des del món de la investigació es necessita confirmar les hipòtesis sobre la funció i estructura dels gens. Per altre, la indústria demana proteïnes actives per al seu ús en biotecnologia i recerca de nous fàrmacs. D'aquesta manera, cada vegada es produeixen més molècules o proteïnes en sistemes biològics per a utilitzar com a armes terapèutiques i vacunes.

Un sistema d'expressió és la suma dels factors que treballen junts per a fabricar un producte determinat del gen, pot ser una proteïna, una partícula d'ARN, etc. Compta amb un gen, codificat per l'ADN, i amb la maquinària necessària per a transcriure i traduir la informació. En aquest sentit, cada cèl·lula al cos humà és un sistema d'expressió. Tot i així, el terme es refereix generalment a l'expressió gènica al laboratori.

Molts medicaments fets a partir de proteïnes recombinants són produïts per varis sistemes d'expressió.

Els sistemes cel·lulars d'expressió de gens heteròlegs⁴ són generalment sistemes biològics procariotes o eucariotes. Per a seleccionar un sistema òptim d'expressió s'han de tenir en compte la productivitat, bioactivitat i les característiques fisicoquímiques de la proteïna d'interès, el cost i la bioseguretat del sistema.

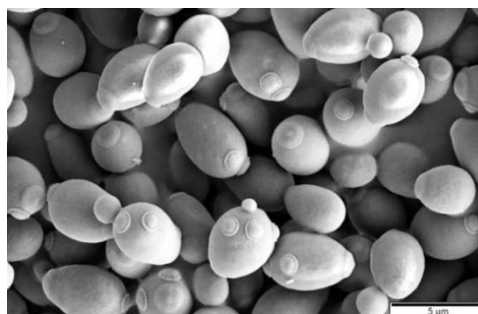
Els sistemes d'expressió procariotes són generalment molt més fàcils per a treballar i són útils en la majoria de les aplicacions. L'*Escherichia coli* ha estat sempre preferit per a la producció de proteïnes recombinants, ja que ofereix molts avantatges, incloent un índex de creixement més alt, requereix poc material, és fàcil de manejar, proporciona

⁴ Es refereix a aquells gens que tenen diferent origen i funció.

una producció alta i és de baix cost. Els llevats (*Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenulla polymorpha* i *Pichia pastoris*) són també molt comuns per a la producció, ja que com la *E. Coli*, creixen ràpid i són fàcils de manejar i accepten varies manipulacions genètiques.



8. *Escherichia coli*



9. *Saccharomyces cerevisiae*

Tot i així, presenten importants limitacions per a expressar proteïnes eucariotes completament funcionals. Això és degut a que no realitzen sobre les proteïnes la majoria de modificacions que realitzen les cèl·lules eucariotes i que permeten a les proteïnes plegar-se de manera correcta per a ser plenament funcionals. Per exemple, el bacteri *E. Coli* no realitza la N-glicosilació ni la O-glicosilació⁵, modificacions bàsiques a les glicoproteïnes d'organismes eucariotes superiors.

Les proteïnes recombinants produïdes en llevats es pleguen correctament i es glicosilen en una certa extensió, similar a la que s'expressen en les cèl·lules de mamífers.

Els sistemes d'expressió eucariotes són més complexes i se solen utilitzar quan no s'aconsegueix una expressió òptima mitjançant els sistemes d'expressió procariotes.

Aquests sistemes d'expressió influeixen altament sobre les condicions de cultiu òptiques per a l'expressió de la proteïna recombinant, donat que els hostes i els vectors d'expressió presenten diferents nivells de producció d'una mateixa proteïna recombinant sota condicions de cultiu idèntiques. Els sistemes d'expressió bacterians han estat utilitzats i segueixen sent àmpliament usats en la indústria.

⁵ La glicosilació és el procés enzimàtic que uneix sacàrids a les proteïnes, lípids o altres molècules orgàniques.

6. Biotecnologia microbiana

Donada la gran expansió de la biotecnologia en aquest camp, m'he decidit centrar en els actuals avenços mèdics realitzats a partir de microorganismes.

La modificació genètica d'un organisme és un tema molt complex i ampli. Tot i que hi ha actualment aplicacions d'animals i vegetals transgènics, que produeixen determinats productes per a la fabricació de fàrmacs, em centraré en la utilització de bacteris i llevats.

És per això que abans de entrar en aquestes aplicacions transgèniques, faré una introducció teòrica.

6.1 Què són els microorganismes?

Els microorganismes són diminuts organismes que només podem veure mitjançant microscopis. Tot i que els més abundants són els bacteris, també existeixen els virus, els fongs, -com els llevats-, les algues o els organismes unicel·lulars, els protozous.

Els bacteris porten més de 3.500 milions d'anys a la Terra i són molt més nombrosos que els humans. Es calcula que representen el 50% de la matèria viva del nostre planeta. Només s'han identificat, cultivat i estudiat al laboratori, menys d'un 1% de tots els bacteris. Ens trobem literalment rodejats d'ells; viuen a la nostra pell, la boca, intestins, a l'aire i a cada superfície que toquem.

L'ús aquests microorganismes com a eines biotecnològiques depèn de la seva estructura cel·lular; tant en estat natural com modificats genèticament, són molt útils.

6.2 Aplicacions dels microorganismes

a) Enzims microbians

Aquests, s'han utilitzat en aplicacions que van des de la producció d'aliments fins a la investigació en biologia molecular. Donat que els microbis són una font d'enzims, un dels primers usos que van tenir va ser en la biologia molecular les ADN polimerases i els enzims de restricció.

Aïllats primerament de la *E. Coli*, les ADN polimerases s'utilitzaven en un gran nombre de tècniques amb ADN recombinant, com per exemple, el marcatge de seqüències d'ADN per a investigació.

b) Creació de proteïnes terapèutiques

A més de ser útils per a duplicar l'ADN, els bacteris són utilitzats amb freqüència per a produir proteïnes en massa.

Hi ha moltes proteïnes terapèutiques amb aplicacions molt valuoses per tractar malalties dels éssers humans que són expressades i aïllades de bacteris. Un dels sistemes d'expressió bacterians més utilitzat és *Escherichia Coli* (*E. Coli*), el qual és regularment la primera opció al moment d'escollir el sistema. És el més utilitzat a escala industrial, de fet, produeix la meitat de les proteïnes comercialitzades actualment.

Els biofàrmacs aprovats desde 2004 a 2013 eren sobretot obtinguts de cèl·lules mamíferes (56%); *E. Coli* (24%); *S. Cerevisiae* (Llevat) (13%); Animals i plantes transgèniques (3%) i cèl·lules d'insectes (4%).

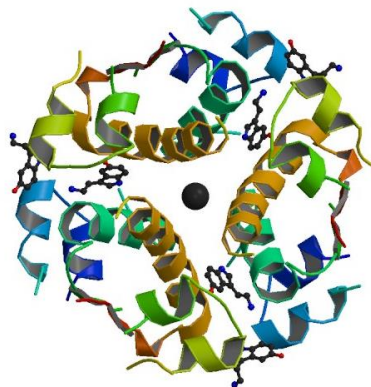
Un dels exemples més nombrosos i importants d'aquestes aplicacions de proteïnes recombinants per a usos mèdics és el cas de la insulina.

6.3 Producció d'insulina recombinant

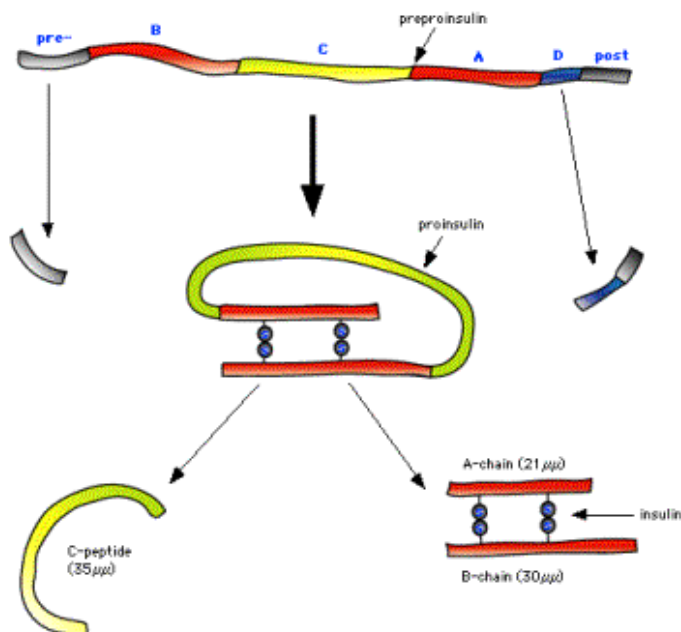
- Què és la insulina?

La insulina és una hormona produïda per les cèl·lules beta del pàncrees i juga un paper molt important en la regulació del metabolisme dels carbohidrats i greix al cos. La insulina humana està composta per 51 aminoàcids i té un pes molecular de 5808 Da. És sintetitzada com un únic polipèptid, conegut com a proinsulina a les cèl·lules β del pàncrees. Aquesta, va al reticle endoplasmàtic on passa a ser

proinsulina. Allà, també es plega de manera que forma 3 ponts disulfur i és transportada cap a la cara trans de l'aparell de Golgi, on és convertida en insulina activa per les endopeptidases. D'aquesta manera, la insulina madurada, conforma una cadena de 21 aminoàcids (A-chain) i una altra de 30 aminoàcids (B-chain).



10. Estructura molecular de la insulina



11. Esquema de la producció de la insulina

Com que la insulina consisteix en dues cadenes (A i B), les cadenes individuals, actualment, són produïdes separatament i són després ser agrupades mitjançant ponts disulfur per a crear la insulina resultant activa. Alternativament, es podria només produir la proinsulina, el precursor natural de la insulina, i enzimàticament eliminar el pèptid connector (C-chain) per a produir el producte final. Amb la col·laboració de Genentech, Inc, les dues rutes han estat aconseguïdes.

Actualment, la insulina és produïda sobretot a partir d'*E. Coli* i *S. Cerevisiae* per al tractament de pacients amb diabetis.

• Història de la insulina

Des de començaments dels anys 20, els pacients amb diabetis han estat tractats amb insulina, que llavors era obtinguda de pàncrees de bovins o porcs. La seva seqüència, però, no és exactament la mateixa; la insulina del porc té un aminoàcid diferent. La del toro, en té tres. Dos anys després del descobriment de la diabetis es va incorporar la insulina com a tractament. Per una part, eliminava el síndrome principal de la malaltia del sucre, però també tenia efectes secundaris no desitjats. Així, alguns diabètics desenvolupaven al·lèrgia a la hormona animal, ja que era una proteïna exògena per al sistema immunitari, contra la qual es podien formar anticossos.

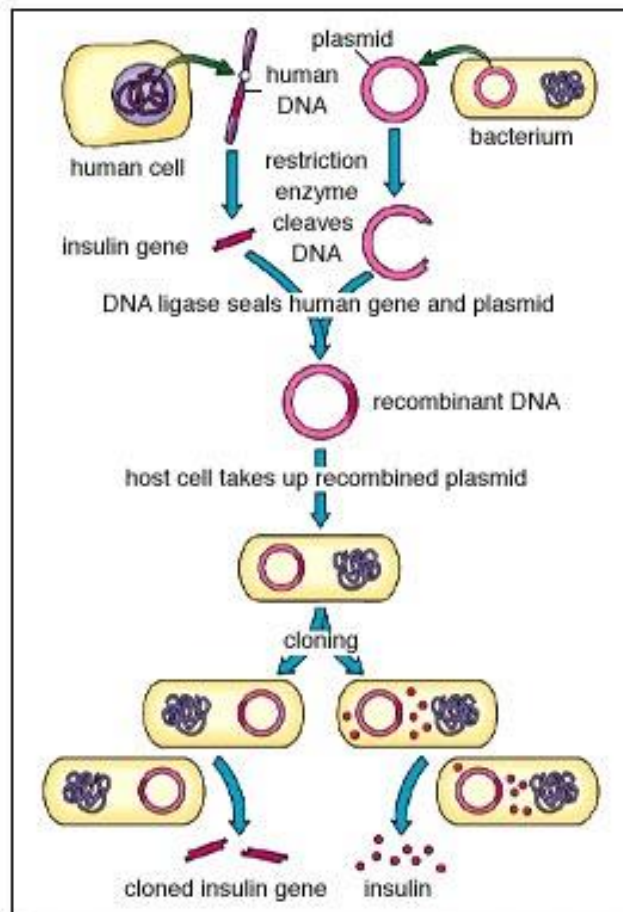
La solució podria ser convertir la insulina de porc, amb l'ajut d'enzims, en insulina humana. Els investigadors de Hoechst Inc. van trobar, a principis dels anys 1980, una manera de fer-ho, però treballaven diàriament amb gairebé 12.000 pàncrees de porcs de més de 100.000 animals d'escorxador.

El desenvolupament en el camp de la enginyeria genètica va fer possible la producció d'insulina en el bacteri de la *E. coli* i en el llevat de cervesa, *S. cerevisiae* al 1979.

- **Utilització de la insulina**

Si hi ha una alteració en la funció de la insulina (per malaltia del pàncrees, per l'edat o per un estil de vida poc saludable), la quantitat de glucosa en sang pot augmentar perillosament. Valors molt elevats de glucosa provoquen deshidratació, doncs el cos intenta eliminar l'excés de glucosa amb la orina. El valor del pH canvia dràsticament a la sang i les cèl·lules es veuen afectades.

La diabetis és la malaltia número 1 de la civilització, amb caràcter d'epidèmia mundial. L'índex de pacients diabètics està pujant de manera alarmants, conseqüentment, la necessitat d'insulina es calcula que incrementarà a més de 16000kg/any i la productivitat actual d'administració d'insulina no serà suficient. A més, seria òptim el desenvolupament de l'administració de la hormona per una via alternativa, més pràctica, com per exemple oral o per inhalació.



12. Producció d'insulina recombinant

6.4 Producció de Somatostatina (hormona del creixement)

- **Què és la somatostatina?**

La Somatostatina és una hormona, més coneguda com la hormona del creixement (growth hormone, GH), que estimula el creixement dels ossos i del teixit muscular, i ha estat extremadament difícil d'extreure a partir d'animals; per a aïllar 0,005g de la hormona, es requereixen mig milió de cervells d'ovelles.

Mitjançant la clonació del gen humà de la somatostatina en bacteris, aquesta mateixa quantitat pot ser obtinguda a partir de 9 litres de mitjà de fermentació de microorganismes transgènics. Un de cada 5.000 nens experimenta dwarfisme, l'enanisme resultant del dèficit de la hormona de creixement; per això, una disponibilitat còmoda d'aquest producte biofarmacèutic suposa un benefici immens per aquests nens. Les ventes anuals són actualment d'aproximadament 100 milions de dòlars.

- **Futur de la hormona**

És possible que arribi a desenvolupar-se un gran mercat sobre la base de l'evidència de que durant els últims anys s'ha detectat que la somatostatina és capaç d'incrementar la massa muscular en individus normals, una disminuir del greix corporal, augmentar la densitat òssia i els nivells energètics i millorar la funció del sistema immune, unes propietats que ja estan sent aprofitades per alguns atletes. També existeixen dades indicatives de que l'administració regular d'aquesta hormona pot millorar la qualitat de vida de les persones ancianes. A part, s'ha demostrat que contribueix a l'augment de pes de porcs i vaques i estimula la producció de llet a les vaques.

Encara que s'ha obtingut en quantitat exitosament en organismes procariotes, la bioactivitat obtinguda d'aquesta manera ha estat escassa.

7. Vacunes

Segons la Organització Mundial de la Salut, cada any moren més de 17 milions de persones per malalties infeccioses, sobretot en els països subdesenvolupats. L'ús d'antibiòtics i vacunes ha demostrat ser molt eficaç pel tractament de nombroses malalties infeccioses del home causades per microorganismes. Tot i així, els patògens (microbis causants d'una malaltia) resistents a la majoria d'antibiòtics i vacunes utilitzats per la gent, han augmentat i posen en dubte l'eficàcia d'aquests. Les malalties infeccioses causades per microbis ens afecten a tots, i són responsables d'un 60% de les morts de nens menors de quatre anys a tot el món.

7.1 Com treballa el sistema immunitari?

El sistema immunològic de l'home i dels animals és realment complex. Nombroses cèl·lules de tot el cos treballen conjuntament de manera complexa per a reconèixer materials externs que entren al nostre cos, preparant l'atac a aquells que els neutralitzi o destrueixi.

Les substàncies estranyes que estimulen la resposta, s'anomenen antígens, i s'inclouen tots els bacteris, fongs, virus o molècules individuals com les proteïnes, lípids que es troben al pol·len. En general, el sistema immunològic respon als antígens fabricant anticossos. Aquesta resposta es coneix com immunitat mitjançada per anticossos. Quan els limfòcits B es troben exposats als antígens, un tipus de glòbuls blancs o leucòcits, reconeixen al antigen i s'uneixen a ell.

Els limfòcits T tenen un paper essencial a l'hora d'ajudar a les cèl·lules B a reconèixer i respondre a l'antigen. Després de trobar-se exposades a l'antigen, les cèl·lules B es diferencien per formar cèl·lules plasmàtiques, que produeixen i segreguen anticossos. La majoria dels anticossos són alliberats al corrent sanguini.

Un dels principals objectius de la producció d'anticossos és proporcionar una protecció duradora contra els antígens, durant el procés de desenvolupament de les cèl·lules B, algunes d'aquestes cèl·lules es converteixen en cèl·lules "memòria", que tenen la capacitat de reconèixer cossos estranys anys més tard, i responen davant d'ells creixent i produint més cèl·lules plasmàtiques i anticossos que doten a l'organisme d'una protecció a llarg termini contra els antígens.

Cada anticòs protegeix contra un antigen específic per el qual va ser fabricat, i aquestes proteïnes tenen diverses maneres de respondre davant d'aquests. S'anomenen anticossos policlonals, perquè cada un deriva de diferents línies de cèl·lules B.

Molts anticossos s'adhereixen i cobreixen l'antigen, de manera que són engolits per els macròfags, cèl·lules molt eficaces en la fagocitosi. Després, són degradats pels lisosomes. Alguns, quan detecten que l'antigen és una cèl·lula estranya, posen en marxa una sèrie de mecanismes per trencar-la (lisis cel·lular).

Estem, per tant, contínuament exposats als antigens, pels quals el nostre sistema immunològic desenvolupa anticossos, però a vegades, la producció natural d'anticossos no és suficient per a protegir-nos de patògens com la verola, el virus de l'hepatitis i el VIH. La biotecnologia pot ajudar al sistema immunològic mitjançant vacunes.

7.2 Tipus de vacunes clàssiques:

Són parts de patògens o organismes complets que estimulen al sistema immune per a que fabriqui anticossos de reserva i cèl·lules de memòria immunes que puguin treballar quan estiguin exposades al patògen real, en el cas de que ocorri.

7.2.1 Vacunes atenuades

Les vacunes atenuades requereixen la utilització de bacteris o virus vius i debilitats. La principal característica que presenten és que els agents immunitzants poden replicar-se a l'organisme sense causar la malaltia. Aquestes vacunes proporcionen, en teoria, una vacunació ideal de llarga duració i molt intensa, ja que donen lloc a una infecció similar a la natural.

7.2.2 Vacunes inactivades

Les vacunes inactivades es fan utilitzant al microorganisme sencer mort o inactiu mitjançant diversos mètodes físics i químics, com la calor.

En comparació amb les vacunes atenuades, no presenten el risc de desencadenar la malaltia després de la vacunació. La resposta immunitària provocada per aquest tipus de vacunes sol ser menys intensa i duradora i presenta la necessitat d'administrar varies dosis de record per aconseguir una immunització completa.

7.2.3 Vacunes de subunitats

Les vacunes de subunitats, que es fabriquen injectant porcions d'estructures virals i bacterianes, molt sovint proteïnes o lípids del propi microbi. Aquestes vacunes s'acostumen a utilitzar quan han estat aïllats els components responsables de la patogenicitat de l'agent infecciós, ja que d'aquesta manera s'evita el risc de desencadenar la malaltia.

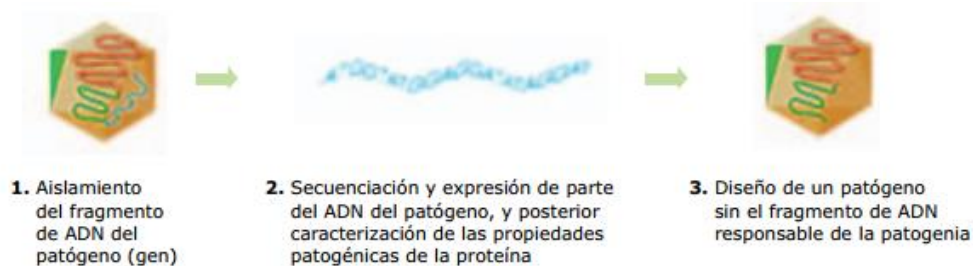
7.3 Vacunes modernes

Encara que la majoria de les vacunes actuals consisteixen en els tres tipus de vacunes clàssiques anteriors, les investigacions que es porten a cap actualment aposten per vacunes més segures i capaces de desencadenar una resposta immunològica eficaç i duradora. Els avenços en biologia molecular i en concret amb el desenvolupament de la tecnologia de l'ADN recombinant, han permès el disseny de noves vacunes.

Fins fa pocs anys, la síntesi química de l'antigen i l'aïllament de la proteïna antigènica a partir de la seva font natural eren els únics mètodes disponibles per a la obtenció de components immunitzants a les vacunes.

a) Vacunes atenuades mitjançant modificació genètica

La tecnologia de la genètica inversa⁶ ha permès el desenvolupament de vacunes recombinants mitjançant la identificació al genoma de zones relacionades amb fenotips virulents i mutants. Així, s'han desenvolupat virus i bacteris modificats genèticament de manera que els seus gens relacionats amb la patogènia es troben modificats o eliminats. Encara que les tècniques d'enginyeria genètica són les mateixes per a la modificació d'un virus i bacteris, la modificació dels bacteris és més complexa deguda al seu gran tamany del genoma. Les vacunes atenuades mitjançant la mutació genètica es troben actualment en fase experimental.



13. Vacunes atenuades mitjançant la modificació genètica

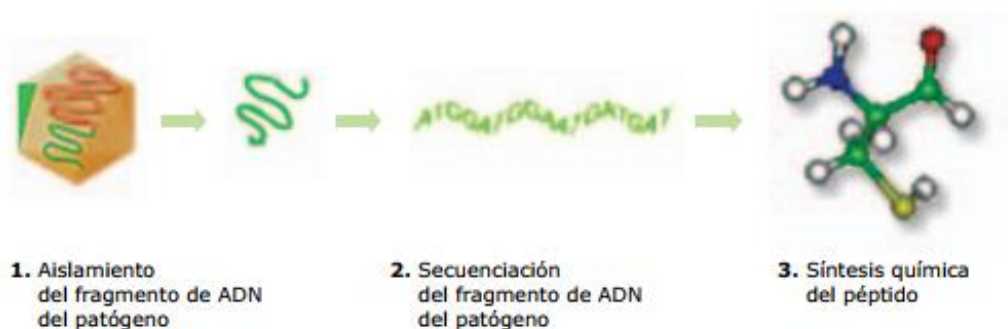
⁶ La genètica inversa és una disciplina genètica en la que, partint del coneixement d'un fragment d'ADN clonat o seqüenciat, investiga la seva funció biològica, alterant aquest ADN mitjançant mutació, generalment a nivell massiu. Per tant, és la utilització d'eines de genètica per a identificar gens i les seves funcions a partir de la selecció de mutacions. Una vegada caracteritzat el gen d'interès, es poden utilitzar tècniques d'ADN recombinant per a desenvolupar noves vacunes.

b) Vacunes sintètiques

Les vacunes sintètiques consisteixen en la còpia de la seqüència genotípica que conté informació sobre les proteïnes antigèniques procedents de patògens, i la seva síntesi posterior mitjançant mètodes químics. Les proteïnes bacterianes o virals amb capacitat antigènica presenten múltiples fragments que determinen la seva especificitat i activitat, però un sol número limitat d'aquestes està relacionat amb una resposta protectora eficaç. Mitjançant l'enginyeria genètica i la utilització d'anticossos monoclonals, és possible identificar fragments amb capacitat immunològica i posteriorment sintetitzar-los químicament, fent que adoptin una configuració espacial adequada per a poder ser reconeguts pel sistema immunològic de l'individu.

La síntesi o producció de proteïnes complexes és una estratègia que permet augmentar la immunogenicitat⁷ de fraccions proteiques antigèniques. Ha estat utilitzada amb la malària i el pèptid gp120 del virus del sida.

Tot i que s'ha avançat molt en la química de les proteïnes, la principal desavantatge d'aquesta tècnica consisteix en els pèptids sintetitzats posseeixen una configuració estructural lineal a l'espai, característica que rarament es dona als pèptids presents de manera natural a la naturalesa. Els anticossos solen reconèixer les estructures tridimensionals i resulta més complicat que detectin les estructures lineals. És per aquest motiu que les característiques de les proteïnes dels antígens sintetitzats químicament poden no ser les mateixes que les dels antígens naturals, resultant, per tant, una pèrdua d'activitat de la vacuna.



14. Vacunes sintètiques

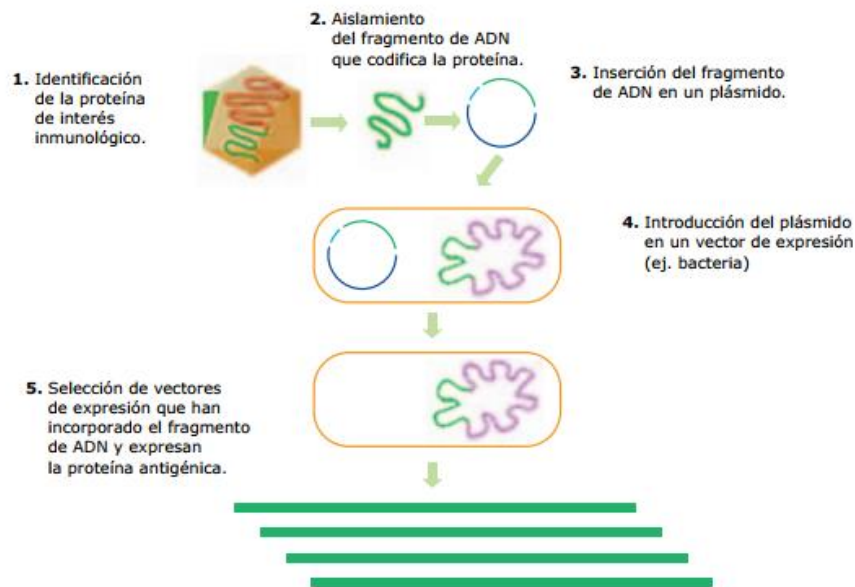
⁷ S'anomena immunogenicitat a la capacitat que té el sistema immunitari de reaccionar davant un antigen, un estímul bioquímic de naturalesa generalment proteica.

c) Vacunes de subunitats o recombinants

Una vacuna de subunitats o recombinant és un plasmidi bacterià dissenyat per a expressar un gen (o gens) d'interès que codifiquin, per exemple, per una proteïna immunològica d'un patogen determinat. L'obtenció de les vacunes de subunitats es basa en la identificació de les proteïnes de l'agent infecciós desitjat que són capaces d'induir la resposta immunitària d'una manera semblant a la que ho faria l'agent infecciós complet. Aquestes vacunes poden tenir d'un a més de vint antígens.

Aquestes proteïnes s'obtenen a partir d'un procés d'enginyeria genètica on els gens que codifiquen per aquestes proteïnes es seleccionen per a poder clonar i expressar a hostes alternatius com bacteris (*Escherichia Coli*), llevats (*Saccharomyces Cerevisiae*) o baculovirus. Els vectors d'expressió més utilitzats són aquests microorganismes per la seva gran capacitat d'expressió.

Es poden obtenir vacunes de subunitats de dues maneres diferents; es pot fer créixer al microorganisme al laboratori i posteriorment, trencar-lo químicament i recollir els antígens importants o es poden sintetitzar les molècules antigèniques de microorganisme utilitzant tècniques d'ADN recombinant. Aquestes vacunes s'anomenen de subunitats recombinants.



15. Vacunes de pèptids recombinants

La immunitat a les vacunes pot aparèixer amb el temps, particularment quan es tracta de vacunes inactivades, que freqüentment no produeixen una resposta immune forta.

Per aquest motiu, moltes vacunes requereixen un “reforç” cada pocs anys per a tornar a estimular el sistema immune.

A mesura que els científics han anat aprenent, els assajos amb vacunes de subunitats recombinants s’han fet més populars. L’any 1986, gràcies a la tecnologia genètica, es va inventar la primera vacuna a partir d’ADN recombinant per a l’Hepatitis B.

El virus de l’hepatitis B es transmet per la sang degut a l’exposició a fluids corporals, relacions sexuals i transfusions sanguínies contaminades. Actualment, la majoria de les vacunes de subunitats, incloent la de l’hepatitis B, es fan mitjançant estratègies d’ADN recombinant en les que la vacuna és produïda en microbis.

En el cas de la vacuna contra l’hepatitis B, els científics van clonar els gens per les proteïnes de la superfície externa del virus per a obtenir plasmidis. Els llevats transformats per aquests plasmidis s’utilitzaven per a expressar grans quantitats de proteïnes virals com proteïnes de fusió, que són purificades més tard i s’utilitzaven per a vacunar a la gent contra l’hepatitis B. Aquest enfocament és una estratègia habitual per produir vacunes de subunitats, tot i que a vegades les proteïnes de fusió són expressades a bacteris o cultiu de cèl·lules mare.

Actualment, continua la investigació d’una vacuna de subunitats recombinants contra el virus de l’hepatitis C.

La primera vacuna aprovada contra el càncer va ser el Gardasil, una vacuna recombinant de subunitat contra el càncer cervical. Té com a objectiu quatre branques específiques del virus del papil·loma humà (HPV), que causa al voltant del 70% dels càncers cervicals i afecta a 1 de cada 130 dones, a prop de mig milió de dones al món.

Per a prevenir les malalties ocasionades per virus, aquesta tecnologia és la més prometedora. S’està fent recerca amb la grip, el pòlio, la hepatitis B, herpes, i recentment amb el SIDA. L’assoliment de vacunes que ofereixin bons resultats contra aquestes malalties importants, esteses per tot el món, aportaria enormes beneficis comercials per a les companyies productores. Les majors possibilitats es refereixen al SIDA o a l’herpes, pels quals encara no es disposa ni d’una vacuna ni d’una teràpia que proporcioni una cura definitiva.

També s’estan portant a cap estudis en relació a certes vacunes bacterianes, així com a les destinades a prevenir les malalties parasitàries. La malària, encara avui és la malaltia infecciosa que preval més al món; la seva prevenció constitueix un problema complex i exigent.

TABLA 5
Vacunas recombinantes

<i>Proteína</i>	<i>Utilidad terapéutica</i>	<i>Nombre comercial (Compañía)</i>	<i>Año</i>
HBsAg	Hepatitis B	Recombivax (Merck)	1986
Vacuna combinada entre hepatitis B recombinante y <i>H. influenza</i> B	Hepatitis B y <i>H. influenza</i> tipo B	Comvax (Merck) Procomvax (Pasteur Merieux MSD)	1996
Vacuna combinada entre hepatitis B recombinante, toxina diftérica, toxina tetànica, y <i>B. pertussis</i>	Tétanos, <i>B. pertussis</i> , difteria y hepatitis B	Tritanrix-HB (GlaxoSmith-Kline)	1996
Vacuna combinada entre toxinas diftérica, tetànica y hepatitis B recombinante	Tétanos, difteria y hepatitis B	Primavax (Pasteur Merieux MSD)	1998
OspA (lipoproteína de <i>B. burgdorferi</i>)	Enfermedad de Lyme	Lymrix (SmithKline Beecham)	1998
Vacuna con tres toxinas recombinantes	Tétanos, <i>B. pertussis</i> , y difteria	Triacelluvax (Chiron)	1999
Antígenos S, pre-S1, pre-S2 de hepatitis-B	Hepatitis B	Medeva Pharma	2000
Vacuna de hepatitis A inactivada y hepatitis B recombinante	Hepatitis A y B	Twinrix (GlaxoSmith-Kline)	2001
Vacuna combinada de toxinas diftérica, tetànica, <i>B. pertussis</i> , hepatitis B recombinante y virus de la polio inactivado	Difteria, tétanos, <i>B. pertussis</i> , hepatitis B y polio	Pediarix (GlaxoSmithKline)	2002
Vacuna conjugada anti neumocócica 7-valente con la proteína diftérica CRM-197	Inmunización contra neumococo en niños y ancianos	Prevenar (Wyeth-Lederle)	2002

16. Taula de vacunes recombinants

d) Vacunes d'ADN

Aquestes, són vacunes de desenvolupament molt recent, i consisteixen en la injecció directa d'ADN a través d'un plasmidi o d'un vector d'expressió aquest ADN codifica una proteïna viral antigènica d'interès, que indueix l'activació del sistema immune. D'aquesta manera, es poden induir tants anticossos neutralitzants com immunitat, mesurada pels limfòcit T citotòxics (resposta cel·lular).

Funciona a l'inserir l'ADN de bacteris o virus dins de cèl·lules humanes o animals. Algunes cèl·lules del sistema immunitari reconeixen la proteïna que sorgeix de l'ADN estrany i ataquen, tant a la pròpia proteïna com a les cèl·lules afectades. Donat que aquestes cèl·lules viuen un temps llarg, si l'agent patògen (el que crea la infecció), que normalment produeix aquelles proteïnes, es troba durant un període llarg, serien atacades instantàniament pel sistema immunitari.

Un avantatge de les vacunes d'ADN és que són molt fàcils de produir i emmagatzemar, són molt més estables que les vacunes atenuades, inactivades o de partícules proteiques i al tenir un cost més baix, facilita la seva difusió en països en vies de desenvolupament. Apart, només s'expressa l'antigen que es vol. Com succeeix a les vacunes de partícules proteiques i a diferència de les vacunes atenuades i inactivades,

només s'expressa aquell antigen seleccionat prèviament com a patogen i capaç de produir immunitat efectiva.

Són molt segures i poden ser generades amb un grau de puresa molt elevat sense augmentar gaire els costos, cosa que permet més seguretat, i no poden tornar-se virulentes.

Aquest tipus de vacuna va començar a ser coneguda a la dècada del 1990 i encara avui continuen realitzant-se nombrosos estudis dins del camp de l'experimentació. Tot i que no són d'ús clínic per el moment, les seves expectatives són prometedores.

La gran majoria de vacunes en el seu ús actual estan dirigides contra patògens que poden ser controlats eficaçment amb anticossos. Malgrat tot, l'evolució paral·lela d'aquests microorganismes, que continuen desenvolupant mecanismes de resistència contra les vacunes actuals, és també inevitable. L'eliminació de molts d'aquests nous patògens doncs, requereix noves investigacions i d'una nova varietat de vacunes, anomenades de segona i tercera generació que siguin capaces d'activar mecanismes immunològics més específics.

Les vacunes d'ADN són un tipus de vacunes de nova generació que representen un conjunt d'estratègies innovadores per aconseguir l'activació específica de la resposta immunològica cel·lular i podrien ser aplicades a través de liposomes (cremes), injeccions o a través de biobalística. Tot i així, tenen els seus inconvenients, per la qual cosa encara estan en fase d'estudi.

Està limitat a proteïnes, és a dir, no pot induir la immunitat davant antígens no proteics com polisacàrids i pot haver una tolerància a l'antigen, és a dir, que el cos hagi reconegut la proteïna com a pròpia i no es desenvolupi la resposta immune cercada amb la vacuna.

7.4 Producció de vacunes modernes

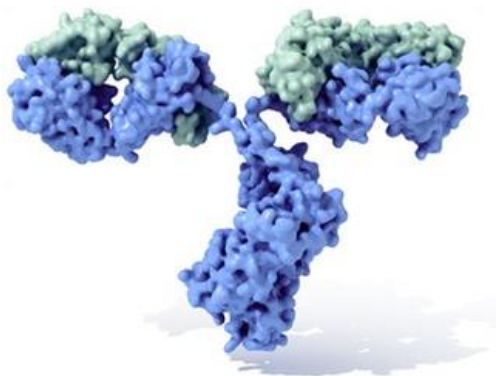
La producció de vacunes es porta a cap mitjançant un sistema d'alt cost i baix volum, en el que s'apliquen molts principis bàsics de la biotecnologia. La fabricació a gran escala suposa un problema continu sobretot amb les vacunes de malalties víriques, perquè per a la seva producció es requereixen animals o cèl·lules humanes cultivades. Els avenços més recents en la tecnologia dels fermentadors estan revolucionant ràpidament en aquest camp, i amb tota probabilitat, augmentaran enormement la producció de vacunes en un futur pròxim.

8 Anticossos monoclonals

Una altra de les importants aplicacions mèdiques de la biotecnologia és la producció d'anticossos.

8.1 Què són els anticossos?

És conegut que certes cèl·lules d'organismes vertebrats (limfòcits B) tenen la capacitat de secretar anticossos que poden inactivar molècules estranyes contaminants (antígens) a l'organisme de l'animal.



17. Estructura de la immunoglobulina

L'anticòs té una estructura en forma d' "Y" i utilitza una part de la seva estructura per a unir-se a l'antigen invasor i l'altre part per a disparar la resposta de l'organisme amb el fi d'eliminar el complex antigen-anticòs. S'ha calculat que les espècies de mamífers poden generar fins a 100

milions d'anticossos diferents, assegurant-se d'aquesta manera que la majoria dels antígens invasors seran reconeguts per algun dels anticossos. Els anticossos presenten elevades capacitats d'afinitat i especificitat per als antígens reconegut. En mamífers constitueixen una de les principals defenses contra organismes patògens i altres molècules de caràcter tòxic.

Els intents de cultivar les cèl·lules productores d'anticossos en medis artificials han estat generalment infructuosos, produint la mort de les cèl·lules o bé perdent la capacitat de produir anticossos. Avui en dia és conegut que cada subtipus de limfòcits B produeix un únic anticòs.

8.2 La nova invenció: anticossos monoclonals

Tot i això, l'any 1975, Georges Köhler, Cesar Milstein i Niels K. Jerne van demostrar de manera exitosa la producció d'anticossos purs (monoclonals) i permetent el cultiu de cèl·lules híbrides a partir d'un producte de la fusió (hibridoma) de limfòcits B (cèl·lules productores d'anticossos) amb cèl·lules plasmàtiques tumorals de mieloma múltiple.

Amb aquesta fusió de dues cèl·lules, una programada per a produir un anticòs específic però que no es multiplica indefinidament i l'altre immortal amb gran capacitat de creixement però que no produeix immunoglobulina (cèl·lula de mieloma), van combinar les informacions genètiques necessàries per a la síntesis de l'anticòs desitjat i

una capacitat de síntesis proteica, donant lloc a la seva multiplicació tant *in vitro* com *in vivo*. Al 1984 van ser guardonats amb el premi Nobel de medicina per el seu excel·lent assoliment científic.

La formació d'anticossos monoclonals (mAB) és una de les àrees de major èxit des d'un punt de vista comercial de la biotecnologia.

Aquests anticossos són tots idèntics i homogenis perquè són produïts per un sol tipus de cèl·lula del sistema immune, és a dir, tots els clons procedeixen d'una sola cèl·lula mare. És possible produir anticossos monoclonals que s'uneixin específicament amb qualsevol molècula amb caràcter antigènic.

Si una substància estranya (antigen) s'injecta al cos d'un humà, alguna de les cèl·lules B del sistema immune es transformaran en cèl·lules plasmàtiques i començaran a produir anticossos que s'uniran al antigen. Cada cèl·lula B produeix un sol tipus d'anticòs, així diferents limfòcits B produiran anticossos estructuralment diferents, que s'uneixen a diferents parts de l'antigen.

8.3 Producció d'anticossos monoclonals

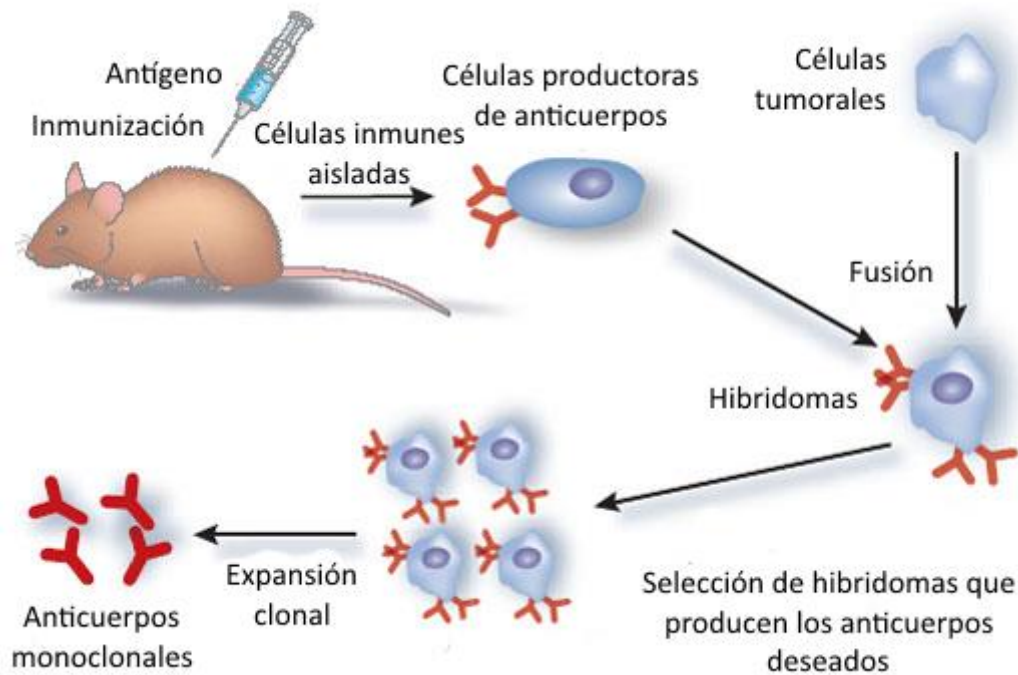
Per a produir anticossos monoclonals, primer s'extreuen cèl·lules B de la melsa⁸ d'un animal que ha estat exposat al antigen. Aquestes cèl·lules B són fusionades amb cèl·lules tumorals de mieloma múltiple (un tipus de càncer) amb presència de PEG (polietilenglicol). Les cèl·lules tumorals poden créixer indefinidament en cultius cel·lulars. Aquesta fusió fa a les membranes cel·lulars més permeables. Aquestes cèl·lules fusionades híbrides, poden multiplicar-se ràpida i indefinidament i produir gran quantitat d'anticossos. Són suficientment diluïts i cultivats per obtenir un nombre diferent de determinats colònies, les quals produeixen un sol tipus d'anticòs. Els anticossos de diferents colònies són analitzats per a conèixer la capacitat que tenen per unir-se a l'antigen determinat i per seleccionar-se i aïllar-se de manera efectiva. Aquests anticossos poden ser produïts en cultius cel·lulars o en animals.

Aproximadament l'1% de les cèl·lules aïllades a la melsa dels animals són productores d'anticossos i el 10% dels hibridomes finals consisteixen en cèl·lules secretores d'anticossos. Existeixen tècniques específiques per a identificar a les cèl·lules d'hibridoma que secreten l'anticòs d'interès, el clonat i posterior propagació d'aquesta cèl·lula en grans poblacions i, en conseqüència, la obtenció de grans quantitats de l'anticòs desitjat.

Existeixen més de 17 anticossos monoclonals aprovats per la FDA, però el número d'anticossos en fase d'assaig clínic és molt elevat degut al nombre d'aplicacions

⁸ La melsa és un òrgan ubicat a l'abdomen, la funció del qual és la destrucció de glòbuls vermells vells i servir de reservori de sang. Els limfòcits B són els glòbuls blancs que es diferencien a la melsa i a la medul·la òssia.

clíniques que presenten. Poden ser utilitzats per a detectar la presència i quantitat de les substàncies a les que s'uneixen mitjançant tècniques com el *Western blot* o proves d'immunofluorescència i són també utilitzats per a purificar substàncies.



18. Procés de producció d'anticossos monoclonals

8.4 Utilització dels anticossos monoclonals

S'utilitzen en investigació biomèdica, com la identificació i clonació de gens, la identificació i aïllament de proteïnes, l'activació d'enzims, coneixement de l'estructura molecular, etc. Per al diagnòstic, en medicina, gràcies a la especificitat i capacitat il·limitada de reconèixer estructures químiques com hormones, vitamines; pot servir, per tant, per a detectar malalties infeccioses, monitoritzar drogues, detectar al·lèrgens, com a marcadors tumorals i infarts de miocardi, aplicacions forenses, etc. Són també útils com a catalitzadors, biosensors (per a detectar molècules com contaminació de metalls pesats a l'aigua i aliments, detecció de gasos tòxics) i per al tractament, ja que són capaços de destruir cèl·lules, incloses les tumorals.

S'espera que el mercat anticossos monoclonals continuï creixent com ho ha estat fent fins ara, a taxes molt elevades i, considerant només el capítol sanitari, el mercat mundial anual pot ser de varis centenars de milions de dòlars durant la pròxima dècada. Es tracta indubtablement d'una de les àrees amb majors aplicacions comercial i d'utilitat de la biotecnologia moderna.

9 Proteïnes que intervenen als processos de coagulació

9.1 Factors sanguinis

Quan a l'organisme es produeix una hemorràgia, un factor crític per a detenir-la és l'activació de la cascada de coagulació sanguínia. Aquest sistema està compost per una dotzena de proteïnes presents al plasma, que actuen com un sistema d'amplificació, de tal manera que un petit estímul inicial dona lloc a la formació final d'un coàgul de fibrina. La falta o deficiència d'una de les proteïnes d'alguns dels passos intermedis d'aquesta cascada d'amplificació, impedeix la formació d'aquest coàgul i, per tant, condueix a un problema greu per al organisme. Al centre d'aquesta cascada es troben els factors VII, VIII, i IX, els quals la seva carència genera els tipus més freqüents de problemes hemofílics que condueixen a hemorràgies prolongades.

La deficiència del factor VIII genera la hemofília A (hemofília clàssica), que suposa un 80% dels casos d'hemofília a món i la deficiència del factor IX condueix al altre tipus més freqüent, la hemofília B.

Aquesta malaltia genètica recessiva que impedeix una coagulació correcta de la sang, es combat mitjançant l'aportació del factor deficitari i per tant, la seva producció a partir de tècniques recombinants és necessària si és que no es vol extreure de sang de donants, com es feia abans.

Al tractar-se d'un hemoderivat, el risc de que els pacients hemofílics agafessin malalties virals (hepatitis, VIH i altres virus) al administrar-los el producte era molt alt i de fet, es van registrar bastants casos d'infeccions virals als pacients tractats amb aquests productes. Per conseqüent, era prioritari el desenvolupament dels factors VIII i IX recombinants i el primer d'aquests va arribar al mercat l'any 1992.

L'ús de les proteïnes recombinants és també més segur, ja que no provoca un risc de transmissió d'infeccions ni fa sagnar com a efecte secundari.

Si tan problemàtica és l'absència d'una coagulació correcta, també l'excés d'una formació de coàguls pot conduir a l'aparició de trombosi, que al seu pas pel cervell a cor solen ser mortals. Per a destruir aquests coàguls, l'organisme utilitza el sistema fibrinolític, utilitzant la plasmina que procedeix del plasminògen activat per les denominades proteïnes activadores de plasminògen (tPA, activador del plasminògen tissular i uPA activador del plasminògen urinari), que es troben a diferents fluids del cos. Actualment, també es fan servir la hidrulina i la estreptoquinasa, que són més barates però menys específiques.

9.2 Activador tissular del plasminogen

Els activadors tissulars del plasminogen (t-PA) són unes proteïnes (peptidases) implicades en la dissolució de coàguls de sang. Específicament, és una serina proteasa que es troba a les cèl·lules que recobreixen l'interior dels vasos sanguinis. Com un enzim, catalitza la conversió de plasminogen a plasmina, que és l'enzim principal per a la dissolució de coàguls de sang.

El t-PA és molt utilitzat en medicina per al tractament d'ictus (isquèmies cerebrals), infarts de miocardi provocats per a coàguls de sang, o TEP (embolisme pulmonar). Es troba en molts òrgans i teixits però la seva concentració és molt variable. Es poden trobar nivells alts al úter, cor, múscul estriat, ronyó, ovari, pulmó, tiroides, etc. Han estat purificats i caracteritzats de diferents maneres a partir de diferents fonts, incloent cor de porc, teixit vascular postmortem i sang després d'exercici físic, així com de cultius de cèl·lules endotelials.

- **Obtenció a partir de tècniques recombinants**

Tot i així, recentment, el gen que expressa el t-PA ha estat clonat i inserit en *E. Coli* mitjançant tècniques de DNA recombinant. Això permet l'obtenció d'importantes quantitats obrint perspectives optimistes per la seva aplicació terapèutica. El t-PA recombinant (Rec-t-PA) és indistingible de l'activador natural aïllat de les cèl·lules de melanoma humà, tant des del punt de vista bioquímic com en el que representa als seus efectes específics.

Totes aquestes proteïnes estan sent desenvolupades mitjançant tecnologies recombinants, que permetran treure al mercat noves proteïnes coagulants o anticoagulants més eficaces.

PART EXPERIMENTAL

Objectiu

En aquesta segona part, he volgut realitzar una pràctica al laboratori per a demostrar que la transformació genòmica bacteriana és possible mitjançant tècniques bioquímiques.

Als laboratoris de la UB he pogut realitzar la transformació d'una colònia de bacteris per a que tinguessin al seu genoma el gen d'una proteïna exògena i comprovar-ne la seva sobreexpressió.

1. Introducció

Com ja he comentat, l'enginyeria genètica és la tecnologia que involucra la manipulació de l'ADN d'un organisme per a introduir un ADN exogen, és a dir, l'ADN d'un altre organisme. La manipulació del material genètic d'un organisme es pot aconseguir introduint o eliminant gens específics (*knock-in* o *knock-out*) del genoma d'un altre organisme.

Els bacteris són organismes procariotes que posseeixen una gran capacitat metabòlica. Aprofitant la seva alta taxa de síntesi de proteïnes, es poden fabricar proteïnes del nostre interès que no es troben codificades en el genoma del bacteri usat. El genoma bacterià és l'ADN que duu la informació per a sintetitzar les proteïnes essencials per la vida del bacteri i és igual per a tots els individus del mateix tipus.

Molts bacteris tenen gens no essencials en petits trossos circulars de doble cadena d'ADN, a més del seu ADN cromosòmic, aquestes peces, conegudes com a plasmidis són petits elements genètics, en els quals la seva replicació és independent del cromosoma bacterià. Poden introduir-se fins a l'interior de bacteris i actuar com a vectors recombinants en el camp de l'enginyeria genètica.

Un dels mecanismes de transferència genètica entre les cèl·lules procariotes és la transformació. Mitjançant aquest mecanisme, la cèl·lula és capaç d'adquirir fragments d'ADN i incorporar-los al seu genoma. Aquesta nova informació genètica moltes vegades proveeix a l'organisme d'una nova característica que es pot identificar després de la transformació.

El terme de transformació genètica vol dir, literalment, canvi causat pels gens i involucra la inserció d'un o més gens a l'organisme en ordre de canviar les característiques d'aquest. A l'enginyeria genètica o tecnologia de l'ADN recombinant, s'utilitzen enzims per a tallar i aïllar un gen determinat obtingut de qualsevol ésser viu –que té la informació per a fabricar una proteïna particular- i introduir-lo a les cèl·lules

d'un organisme diferent a l'inicial. En conseqüència, aquest organisme tindrà un ADN recombinant a partir del qual fabricarà una nova proteïna. A la proteïna produïda a partir de l'ADN recombinant se la denomina proteïna recombinant (PR).

La producció d'aquestes PR en bacteris és una tecnologia que va sorgir fa uns 30 anys i va respondre a la necessitat de proveir proteïnes d'usos terapèutics amb un abast assegurat (que no depenguessin de fonts animals) i de qualitat constant. La primera PR aprovada per a l'ús humà va ser la insulina humana produïda en *E. Coli* per l'empresa *Genentech*. Des de llavors, la tecnologia de la producció de PR ha tingut un avenç molt important. El fet de que l'*E. Coli* sigui una gran plataforma per a la producció de proteïnes recombinants és donat pel gran coneixement que hi ha sobre aquest;

- i. El seu genoma és conegut des de fa varis anys, fet que amplia considerablement les possibilitats de la seva manipulació genètica
- ii. Existeix una gran quantitat de coneixement acumulat també sobre la seva fisiologia i metabolisme
- iii. Es tenen varis vectors ben establerts per a la producció de PR
- iv. Tenen la capacitat de créixer ràpid en medis molt simples, i amb alts nivells de producció de PR

Un exemple de recombinació genètica és el procés mitjançant el qual el bacteri *E. Coli* és recombinat amb un gen anomenat pCFP que codifica per a la GFP.

A la meua part pràctica, amb l'ajuda del professor de bioquímica i biologia molecular de la Universitat de Barcelona Josep M. Fernández Novell, vaig realitzar la transformació d'una colònia d'*E. Coli* amb el fi de que expressessin una proteïna exògena. A més, vam realitzar la comprovació de la sobreexpressió d'aquesta.

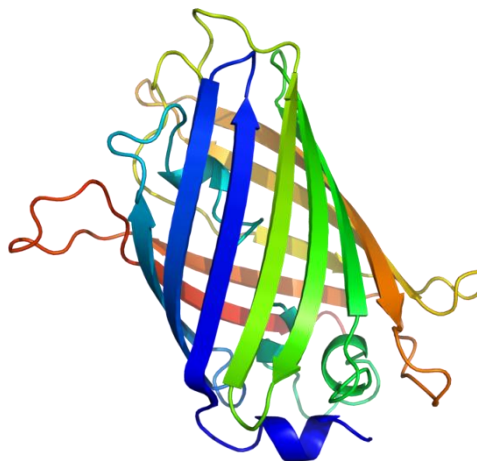
2. Proteïna recombinant: GFP

2.1 Què és la GFP?

Estem parlant d'introduir un gen d'una proteïna bioluminescent anomenada proteïna verda fluorescent (GFP, Green Fluorescent Protein) al genoma d'un microorganisme.

La GFP és una substància present de manera natural a les meduses de l'oceà Pacífic nord anomenada *Aequorea Victoria*, la qual emet una llum verda al exposar-se a la llum ultraviolada. És a dir, posseeix la capacitat d'absorbir la llum blava i emetre llum verda com a resposta. Aquesta activitat es coneix com a fluorescència.

19. Estructura tridimensional de la GFP.



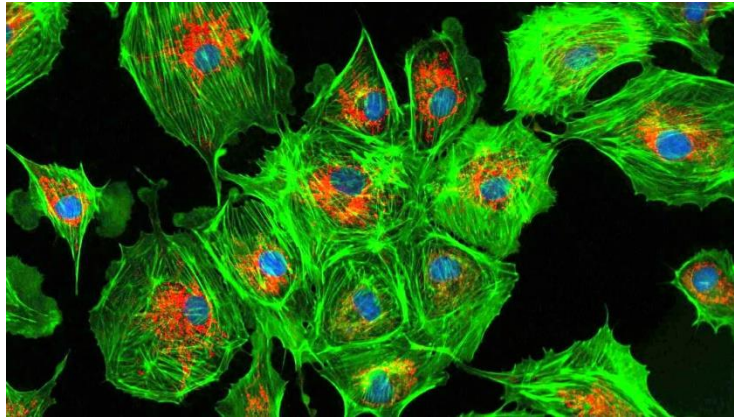
El descobriment i desenvolupament d'aquesta proteïna va ser un gran avenç biològic digne a destacar, i és per això que els investigadors Osamu Shimomura, Martin Chalfie i Roger Y. Tsien van ser guardonats amb el premi Nobel de química l'any 2008.

Osamu Shimomura va ser el primer en aïllar-la i descobrir que, sota la llum ultraviolada, brillava de color verd fluorescent. L'estatunidenc Martin Chalfie va demostrar la seva utilitat a l'hora d'il·luminar diferents fenòmens biològics. Un dels seus primers experiments va consistir en donar color a sis cèl·lules, fins a aquell moment transparents, del *Caenorhabditis Elegans*, un dels cucs més estudiats als laboratoris científics.

El més jove dels tres guardonats, Roger Y. Tsien, també va dedicar gran part de la seva trajectòria professional a aquesta proteïna. Gràcies a ell, el marcador pot il·luminar les cèl·lules i les proteïnes amb diferents colors, no només el verd fluorescent. El poder de combinar diferents colors resulta fonamental. Per exemple, et permet marcar les cèl·lules implicades en un procés i després, de colors diferents, les que participen en una fase primerenca, mitja o tardana. Amés, també permet introduir en una mateixa cèl·lula diferents variants per, per exemple, visualitzar en vermell el contorn cel·lular, en blau el nucli, en groc el citoesquelet i en verd l'ADN, i veure com es coordinen entre ells.

2.2 Usos de la proteïna

La utilització de la GFP porta gairebé una dècada utilitzant-se i és una tècnica que ha revolucionat la biologia cel·lular i molecular. A l'actualitat, és bastant comú que els experts injectin el gen que produeix aquesta proteïna per visualitzar cèl·lules nervioses o el moviment de les cèl·lules canceroses.



20. Ús de la GFP com a marcadora de les diferents parts de les cèl·lules.

Els investigadors solen utilitzar la proteïna com a eina de suport dels seus estudis, no com a teràpia, amb la que poden valorar l'eficàcia de la inserció d'altres gens, com actua un tractament a nivell biològic o com els vasos sanguinis donen suport a certs tumors. El dany neuronal que pateixen els pacients amb Alzheimer o la creació de cèl·lules productores d'insulina són altres dels camps destacats per la Fundació Nobel i en els que la fluorescència ha resultat essencial.

En definitiva, la utilització d'aquesta proteïna resol molts problemes d'identificació. Dins de la neurobiologia, a l'estudi del càncer i a la biologia general és molt útil ja que permet visualitzar el procediment biològic de la incorporació de gens.

3. Producció de proteïnes recombinants

Amb el desenvolupament de mètodes que permeten la transferència de gens específics d'una cèl·lula a l'altre, i la inducció de l'expressió dels mateixos en el nou hoste, la indústria farmacèutica ha adquirit un gran potencial. Com ja he explicat, han iniciat ja una producció de polipèptids humans amb bacteris o llevats, etc.

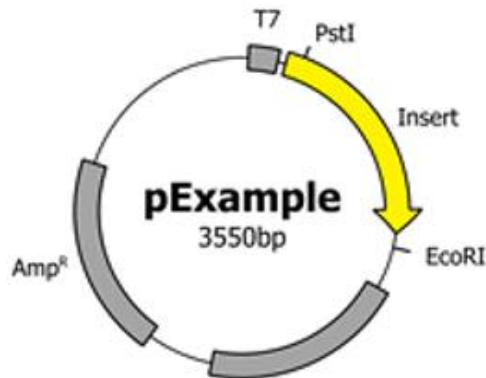
El primer pas per a transformar un bacteri és la clonació de l'ADN de la proteïna en un vector d'expressió.

Un vector d'expressió es un plasmidi que, a més de contenir les característiques comunes, ha de tenir unes seqüències que permetin la transcripció i traducció de l'ADN inserta en aquell vector, permetent d'aquesta manera l'expressió de la proteïna.

3.1 Què és un plasmidi?

El plasmidi és una molècula circular d'ADN que té una existència independent a la cèl·lula. Actua com a vector per a traslladar informació genètica a l'interior de la cèl·lula, per exemple, la capacitat de suportar concentracions tòxiques d'un antibiòtic, com el cloramfenicol o l'ampicil·lina.

Hi ha diferents tipus de plasmidis, en concret, en *E. Coli*, s'han aïllat més de 300. Són molt abundants en els bacteris, i porten a dins varis gens, molt sovint responsables de característiques útils per a la cèl·lula. S'utilitzen per a seleccionar aquelles cèl·lules que tenen un plasmidi de les que no les tenen.



21. Vector plasmídic circular, amb els seus components bàsics: Amp^R, resistència a ampicil·lina per a la selecció; Insert, lloc de clonació múltiple, amb llocs de restricció per a varis enzims de restricció diferents, on s'introdueix el fragment d'ADN d'interès; T7, promotor que reconeix l'ARN polimerasa II de l'*E. Coli*, EcoRI i PstI, llocs de tall pels enzims de restricció.

Tot vector d'expressió per a *E. Coli* ha de tenir, a més del gen d'interès:

1. una seqüència que serveix com a origen de replicació: punt inicial per a la duplicació de l'ADN plasmidial i perquè es pugui autoreplicar
2. un marcador de selecció: un gen que confereix una resistència a un antibiòtic o qualsevol altre marcador
3. un promotor: una seqüència que indiqui l'inici de la transcripció i la traducció
4. un polilinker: una zona del plasmidi que es pugui tallar mitjançant enzims de restricció que permeti la inserció dels fragments del DNA que es vol clonar dins del sistema
5. un terminador transcripcional.

Cada plasmidi té una representació esquemàtica de les propietats: pes, polilinkers, orígens de replicació; EcoRI, EcoRV, etc.

Per a poder utilitzar els plasmidis en el camp de l'enginyeria genètica s'han modificat o dissenyat molts de manera que continguin un número limitat de punts de restricció i gens de resistència a antibiòtics específics.

Hi ha altres vectors, a part dels plasmidis, que poden ser utilitzats com a vehicles de clonació, com els bacteriòfags i els còsmids.

Com s'expressa una proteïna humana en una cèl·lula procariota?

És necessari obtenir la seqüència codificant de la proteïna en qüestió. Això es pot realitzar mitjançant una tècnica anomenada RT-PCR.

Lavors la seqüència codificant o el gen d'interès ha de ser inserta en el vector, en un promotor procariota, que és reconegut per l'ARN polimerasa del bacteri.

Aquest bacteri produirà en alts nivells aquesta proteïna d'interès, que després podrà ser purificada i identificada.

Per a identificar els bacteris que contenen el plasmidi recombinant i expressen la proteïna d'interès dels que no, es poden fer créixer diferents colònies bacterianes, aïllar-ne les proteïnes i mitjançant tècniques bioquímiques identificar-ne o no la presència de la recombinant.

3.2 Sistema pGLO

a. pGLO

El plasmidi de la GFP que utilitzem és el pGLO :

Gene Expression

- **Beta Lactamase**
– Ampicillin resistance
- **Green Fluorescent Protein (GFP)**
– *Aequorea victoria* jellyfish gene
- **araC regulator protein**
– Regulates GFP transcription



22. Esquema del plasmidi utilitzat: pGLO

Aquest plasmidi, a part de contenir el gen per la proteïna verda fluorescent procedent de la medusa *Aequorea Victoria*, presenta un marcador de selecció, obtingut gràcies al gen que codifica la β -lactamasa. Aquest, és un enzim que proporciona resistència als antibiòtics i que pot estar codificat per plasmidis. Les cèl·lules transformades segregaran β -lactamasa al medi proporcionant resistència a l'antibiòtic ampicil·lina i per tant podran créixer amb presència d'aquesta.

b. Regulació del pGLO

Els científics poden regular l'expressió de les proteïnes recombinants utilitzant un interruptor genètic anomenat promotor induïble. Al nostre plasmidi (pGLO), el sistema especial de regulació de gens, per a controlar l'expressió de la proteïna a les cèl·lules, és un gen que codifica per tal de que afegint arabinosa al medi de cultiu, les cèl·lules transformades s'activin.

Aquestes seqüències permeten un control precís de l'expressió gènica, degut a que el gen només estarà en "on" en presència de petites molècules com arabinosa, tetraciclina o IPTG.

L'expressió gènica està estretament regulada a tots els organismes per a permetre l'adaptació a diferents condicions i per a evitar una superproducció de proteïnes innecessàries. Els gens implicats amb la degradació dels diferents nutrients són un bon exemple de gens amb una alta regulació. Per exemple, l'arabinosa és una font d'energia i carboni per al bacteri. Els gens bacterians que codifiquen els enzims per a degradar l'arabinosa no s'expressen sempre, només quan hi ha arabinosa al medi, que llavors s'activen i es tornen a inactivar quan s'esgota l'arabinosa.

Aquest monosacàrid inicia la transcripció d'aquests gens induint la unió de l'ARN polimerasa. Al plasmidi pGLO, alguns dels gens implicats amb la degradació de l'arabinosa han estat substituïts pels gens que codifiquen per la proteïna GFP a la medusa. Quan els bacteris transformats amb el plasmidi pGLO estan creixent en presència d'arabinosa, el gen GFP s'activa i amb conseqüència, emeten el color verd brillant sota la llum ultraviolada.

En canvi, en absència d'arabinosa al medi, el gen GFP es manté inactivat i les colònies bacterianes són de color blanc.

4. Disseny de l'experiment

La pràctica la dividirem en dues etapes, la primera és la transformació bacteriana i la sembra i la segona la comprovació de la sobreexpressió, mitjançant una electroforesis SDS-PAGE.

La primera part d'aquesta pràctica és altament ineficient, només una de cada 10.000 cèl·lules acostuma a incorporar amb èxit l'ADN plasmídic. Donat que cada colònia s'origina a partir d'una única cèl·lula transformada, nosaltres podem calcular eficiència de transformació, o el número de cèl·lules transformades per microgram (μg) d'ADN plasmídic. L'eficiència de transformació generalment oscil·la entre 1×10^5 fins a 1×10^8 cèl·lules transformades/ μg .

5. Desenvolupament

- Variables

Independents: tipus de plasmidi utilitzat, materials utilitzats, quantitat de materials utilitzats, temps dels tubs d'assaig en xoc tèrmic, temperatura del xoc tèrmic, temperatura de la incubació final.

Dependents: creixement bacterià, forma, quantitat, color.

Controlades: factors ambientals (temperatura ambient, llum solar, etc.), utilització de materials estèrils adequadament i cuida de l'ambient estèril.

- Mètodes de control de variables

Per a no alterar l'experiment, es controlen les variables de manera que es neteja la zona de treball amb alcohol abans de treballar i es mantenen els estris utilitzats estèrils, per tant, és treballa amb una flama i etanol al costat tota l'estona. A més, el xoc tèrmic s'ha de realitzar rigorosament i el trasllat dels tubs durant el procés ha de ser el més curt possible.

- Materials

- Solució de transformació (- plasmidi, + plasmidi)
- Colònia d'*E. Coli*
- Alcohol
- Flama
- Nanses (Koll i Dygralsky)

- Plaques de Petri amb el medi de cultiu: LB, Amp, Ara
- Gel
- Font de llum UV
- Cronòmetre
- Preparacions prèvies
 - Preparació de les plaques d'Agar + LB, Agar + LB+ Arabinosa, Agar + LB + Arabinosa + Ampicilina.
 - Preparació de plaques amb *E. Coli*
 - Dispensació d'ADN plasmídic, CaCl₂

5.1 Transformació dels bacteris

El primer procediment que hem de dur a cap és la transformació de les colònies d'*E. Coli*. Per a fer-ho posarem en contacte el plasmidi p GLO amb els bacteris, permeabilitzats per un tractament amb cations divalents que produeixen una desestabilització de la paret bacteriana.

Aquest plasmidi conté el gen que codifica per un enzim que confereix resistència a un antibiòtic. Aquells bacteris que l'introdueixin presentaran un avantatge selectiu i podran créixer en un medi que conté l'antibiòtic, en el nostre cas ampicil·lina.

Comencem amb dos eppendorfs que contenen cèl·lules d'*E. Coli* en una solució tampó (de transformació) amb 250µl Clorur de Calci. (CaCl₂), la qual permet desestabilitzar la membrana de les cèl·lules. Els ions Ca²⁺ presents a la solució neutralitzen la repulsió entre les càrregues negatives dels grups fosfat de l'ADN i els fosfolípids de la membrana cel·lular, permetent així l'entrada de l'ADN a les cèl·lules.

Pipetegem 4 µl de plasmidi pGLO en un dels eppendorfs, i l'altre ens servirà de control.

Per a trencar o perforar les membranes, hem de realitzar un xoc tèrmic. El xoc tèrmic fa augmentar la permeabilitat de la membrana cel·lular de l'ADN. Per a fer-ho, deixem l'eppendorf amb el plasmidi 30 minuts en gel, 90 segons a 42°C i seguidament 2 minuts més en gel. Aquest temps és crític per al procés.

Gràcies a això, entra el DNA dins del bacteri. Per a veure si ha entrat o no el plasmidi dins dels nuclis de les cèl·lules, els posarem a incubar dins de tres medis diferents.

5.2 Sembra

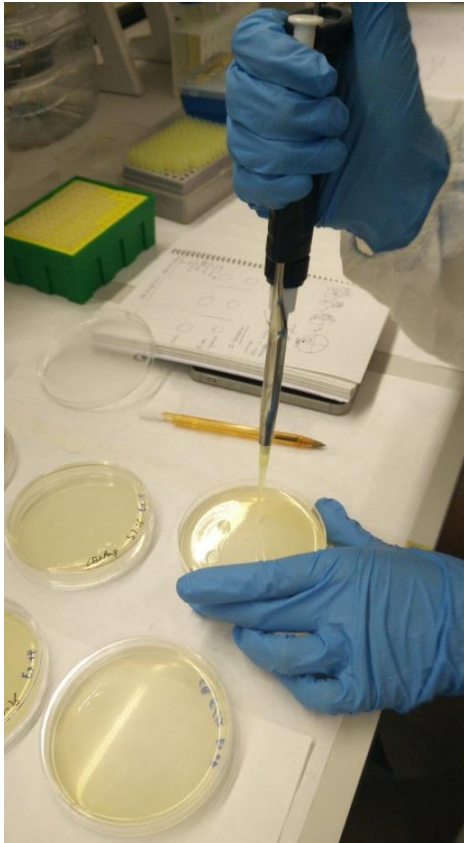
Tenim 3 plaques de petri per a cada solució (tres amb plasmidi i tres de control)

LB: Caldo de Lisogènia/ Luria-Bertani	LB + Ampicil·lina	LB + Ampicil·lina + Arabinosa
<p>Medi de cultiu elaborat a partir d'un extracte de llevats i productes de degradació enzimàtica de la carn, que conté una mescla de carbohidrats, aminoàcids, nucleòtids, sals i vitamines adequats per al creixement bacterià en el qual creixen els nostres bacteris.</p> <p>L'agar, que és un polisacàrid d'algues, és líquid quan es calenta i solidifica quan es refreda, proporcionant un suport sòlid per al creixement bacterià.</p>	<p>Selecció de l'antibiòtic per distingir-los entre els que se'ls ha incorporat el plasmidi i els que no. Si no han incorporat el plasmidi no creixeran a causa de l'antibiòtic. És, per tant, un inhibidor del creixement bacterià.</p> <p>El gen per a la producció de β-lactamasa, el que fa que al bacteri portador del gen sigui resistent a l'ampicil·lina, es troba en el plasmidi.</p> <p>Inactiva l'ampicil·lina present a l'agar LB, permetent el creixement.</p>	<p>L'arabinosa és un monosacàrid. Incloent-la al medi realitzem un mecanisme d'ON-OFF. Un gen (ARCE) que es troba al plasmidi farà que només amb presència d'arabinosa s'expressarà la GFP i es veurà la fluorescència.</p> <p>És un glúcid inductor de l'expressió de la GFP.</p>

Realitzem la sembra de dues maneres; per estries (6 plaques) i per extensió (6 plaques).

Nansa de Kolle (per estries): amb la nansa esterilitzada agafem directament de l'ependorf una mica de *E. Coli* i l'escampem per la placa fent un zig-zag.

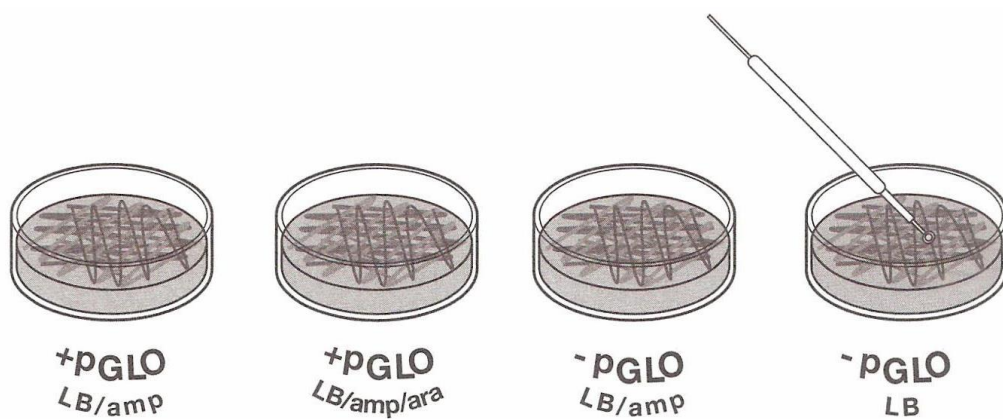
Nansa de Dygralsky (per extensió): sembrem 200 µl per placa, realitzant diferents punts d'aplicació amb la pipeta. Amb la nansa, prèviament esterilitzada, anem escampant les gotes realitzant una extensió, repartint per la placa, de fora a endins i girant 90° cada vegada la placa, per a tenir una sembra homogènia.



23. Sembra per extensió.

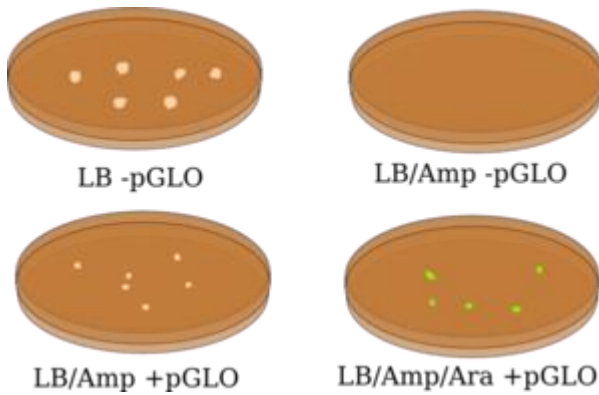


24. Sembra per estries.

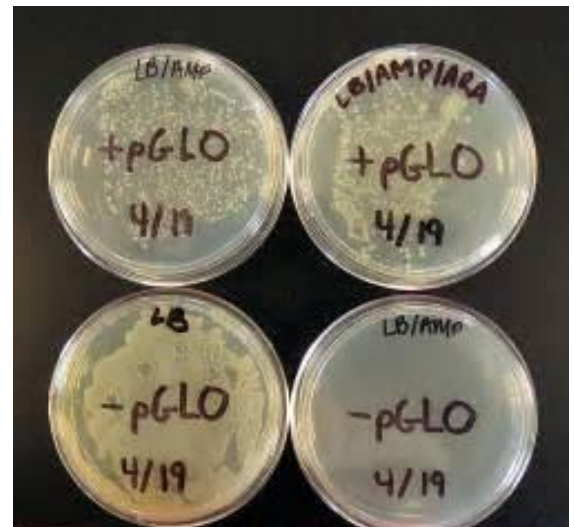


25. Esquema de la sembra per extensió.

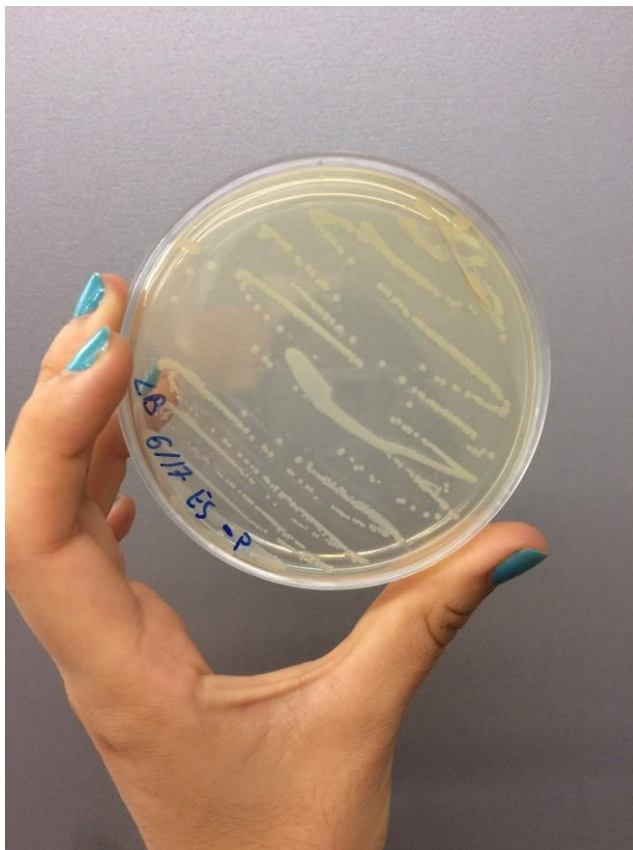
Un cop sembrat, les portem a l'incubador, apilant les plaques, a 37°C fins al dia següent. D'aquesta manera, augmenta 10 vegades l'eficàcia de la transformació.



26. Esquema del resultat d'algunes plaques sembrades per extensió.



27. Creixement de les plaques sembrades per estries.



28. Creixement bacterià de la placa sense plasmidi (placa control) sembrada per estries.

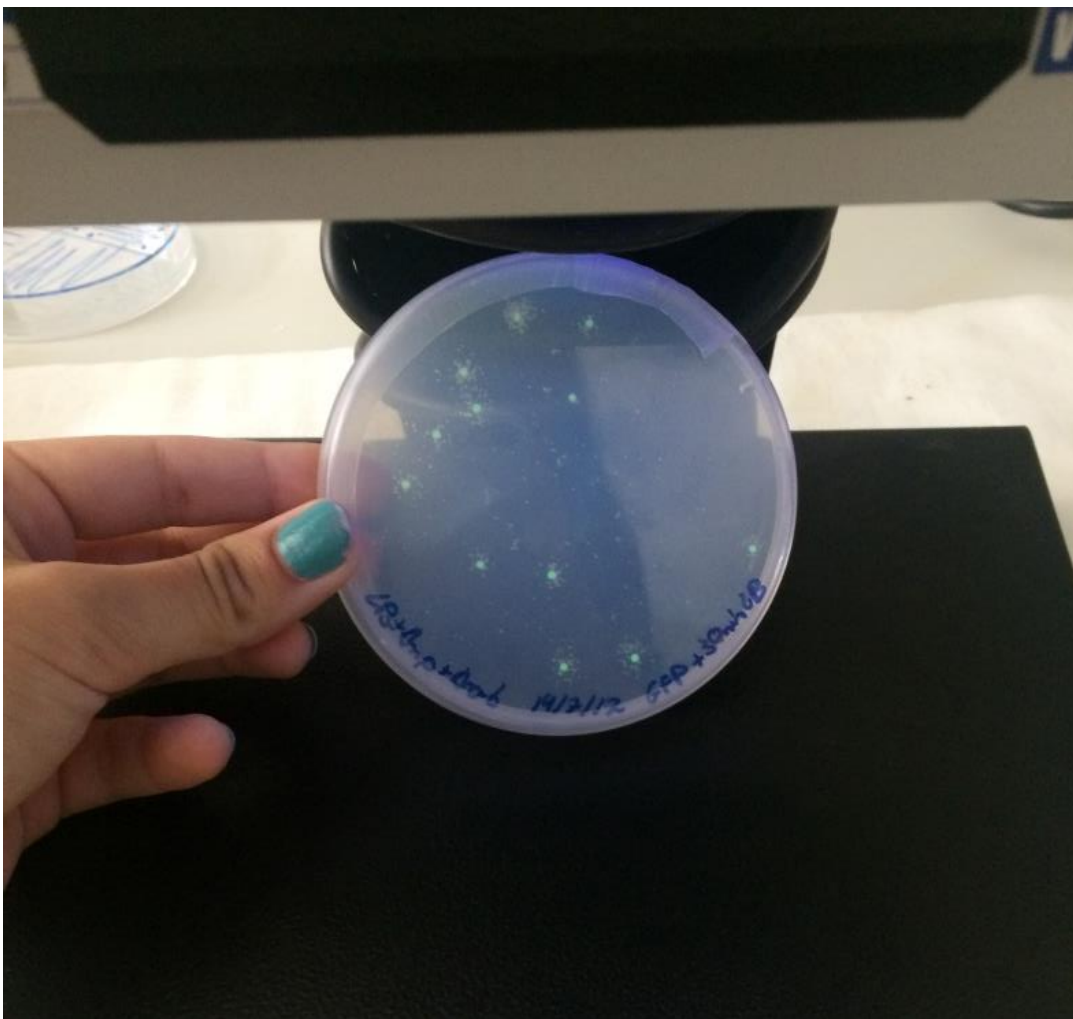
5.3 Creixement bacterià

Al cap d'un dia incubant, podem observar que:

- 1) LB -pGLO: A la placa control, sense el plasmidi, no s'observen cèl·lules fluorescents però s'observen colònies blanques. Es demostra que les cèl·lules bacterianes hostes són viables en absència d'ampicil·lina i poden créixer en un medi d'agar.
- 2) LB +pGLO: Han crescut les colònies de cèl·lules bacterianes transformades però no poden expressar la fluorescència perquè no tenen arabinosa.
- 3) LB + Ampicil·lina -pGLO: No han crescut perquè els bacteris no tenen la resistència a l'antibiòtic perquè no els hem transformat.
- 4) LB + Ampicil·lina +pGLO: Han crescut però no expressen la fluorescència
- 5) LB + Ampicil·lina + Arabinosa -pGLO: No han crescut perquè els bacteris no tenen la resistència a l'antibiòtic perquè no els hem transformat.
- 6)
- 7) LB + Ampicil·lina + Arabinosa +pGLO: Les cèl·lules han crescut i s'observen colònies individuals que emeten fluorescència quan s'il·luminen amb una làmpada de llum UV. Es demostra que les cèl·lules es poden tornar resistents a l'ampicil·lina quan són transformades amb els plasmidis i que la proteïna fluorescent s'expressa en presència de l'arabinosa.

6. Comprovació de la sobreexpressió

Per a comprovar la presència de la proteïna GFP a les colònies de bacteris de la placa LB + Ampicil·lina + Arabinosa +p GLO, realitzarem una tècnica bioquímica anomenada electroforesis SDS-PAGE, que és un mètode per a separar i visualitzar proteïnes pel seu tamany i càrrega.



29. Comprovació de la presència i expressió de la GFP sota la llum UV a la placa amb LB+Amp+Arab.

6.1 Obtenció de mostres

Tots aquells bacteris que hagin sobreviscut al creixement en el medi de LB+ Ampicil·lina +Arabinosa vol dir que han incorporat el plasmidi que conté el gen de resistència a aquest antibiòtic. Aquests bacteris resistents també porten el gen que codifica per a la GFP.

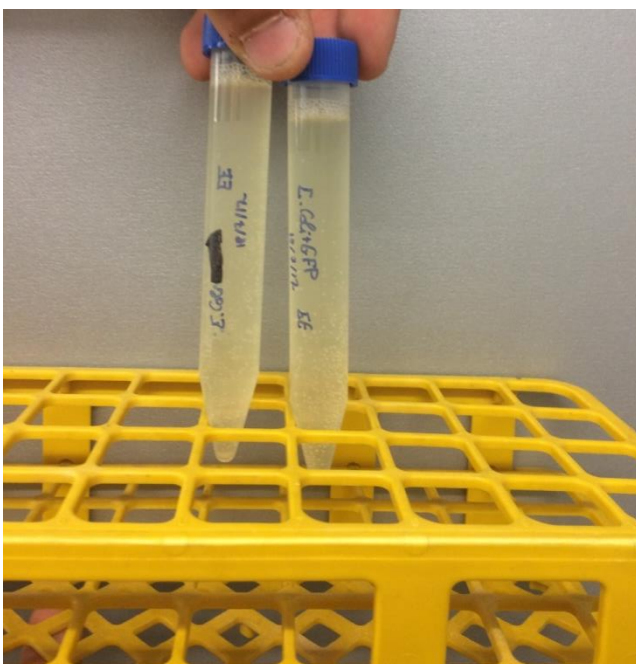
Primer, hem d'aïllar les cèl·lules de les colònies, per a fer-ho, triem una colònia circular (conjunt de cèl·lules procedents d'una mateixa cèl·lula) i piquem amb una nansa estèril un parell de colònies amb GFP, sense arrossegar l'agar. Les fem créixer amb 5ml d'un medi líquid de creixement (LB) per a que creixin a l'incubador (*shaker*) durant un dia, a 37°C que és la temperatura ideal pel creixement de la *E. Coli*.

Una vegada han estat agitant-se tota la nit a 37°C i ja han crescut molt, voldrem obtenir només les proteïnes del bacteri, per a fer-ho, hem de separar-les de la resta de orgànuls i molècules cel·lulars.

Centrifuguem 1,5 ml de la suspensió cel·lular (14.000 rpm durant 2 minuts). Eliminem el sobrenedant i resuspenem el precipitat en 300 µl d'un tampó fosfat pH 7,4 amb un agitador mecànic.

Posem les mostres en gel i les trenquem per ultrasons (sonificació), de manera que les deixem 15 segons sonicant, 10 segons en repòs, 15 segons sonicant, 10 segons en repòs, i 15 segons més sonicant.

Una vegada preparades les mostres de proteïna, preparam els gels d'acrilamida.



30. Mostres de les proteïnes de la colònia d'*E. Coli* transformada i del control

6.2 Electroforesi SDS-PAGE

6.2.1 Preparació del gel de poliagrilamida

L'electroforesi en gel de poliacrilamida amb SDS (SDS-PAGE) és el sistema més clàssic per a resoldre barreges de proteïnes segons la seva mida. La tècnica va ser descrita per Laemmli (1970).

Consisteix a tractar l'extracte proteic amb tampó de Laemmli que conté SDS i fer córrer la solució en una xarxa d'un polímer d'acrilamidabisacrilamida per l'acció d'un camp elèctric.

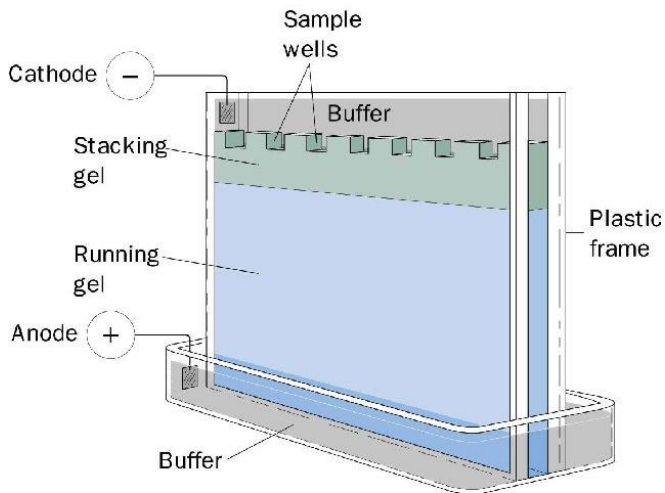
La poliacrilamida és un polímer sintètic que s'estructura tridimensionalment i que permet la separació de proteïnes segons el seu pes molecular.

L'SDS, (dodecilsulfat de sodi) és un detergent que s'afegeix per solubilitzar les mostres i proporcionar càrrega negativa a les proteïnes.

Les electroforesis es duren a terme en gels de poliagrilamida i SDS, utilitzant l'aparell d'electroforesi "Miniprotein" de Bio-Rad.

En aquest tipus d'electroforesi s'utilitzen dues classes de gels de diferent concentració d'acrilamida i diferent pH: el gel concentrador (stacking) a la part superior, en el qual es fan els pous; i el gel separador (running) a la part inferior. El primer té com a finalitat apilar les proteïnes davant l'inici del gel de la correguda, i té una composició d'acrilamida del 4% (pes/volum). El gel separador és més espès i té la finalitat de separar les proteïnes per la seva grandària; en el nostre cas és d'un 10% d'acrilamida (pes/volum).

- Muntem els vidres, un sobre de l'altre. Entre els dos vidres queda l'espai en què es prepararan els gels
- Preparem en un vas de precipitats la solució del gel separador
- Aboquem la solució entre els vidres i afegim un petit volum d'etanol al 70% per obtenir una interfase llisa
- Preparem la solució del gel concentrador
- Una vegada polimeritzat el gel separador (8 o 10 minuts), eliminem l'etanol, afegim el TEMED a la solució del gel concentrador i l'aboquem entre els vidres, a sobre del gel separador. Col·loquem la cinta que serveix per a fer els pous.



31. Dibuix del muntatge de l'electroforesi en gel d'acrilamida.

6.2.2 Electroforesi

- Centrifuguem els tubs una altra vegada a 14000 rpm uns 2 minuts. Eliminem el sobrenedant i resuspenem el precipitat amb 300µl de tampó de càrrega (per a poder col·locar les mostres directament al gel de poliacrilamida i per veure el front).
- Fem un forat al tap de cada tub i amb l'ajut d'una agulla i els posem en un bloc sec a 100°C durant 3 minuts.
- Recollim la mostra de la base de l'ependorf i passem a carregar el gel.
- Muntem els vidres (amb els gels) als seus suports i carreguem els pous de la següent manera:

Marcador	16µl -GFP	16 µl +GFP	8 µl -GFP	8 µl +GFP	Marcador	16 µl +GFP	8 µl +GFP
----------	-----------	------------	-----------	-----------	----------	------------	-----------

- Una vegada tenim el gel carregat, afegim el tampó d'electroforesi. Connectem els pols positius i negatiu, i apliquem una diferència de potencial de 140 V durant 45', per tal que se separin les proteïnes presents a la mostra.

El marcador ens indica el pes aparent de les proteïnes en quilodaltons (kDa).

6.2.3 Tinció del gel

Per a revelar les proteïnes presents a la mostra, fem servir un colorant específic de proteïnes, el blau de Coomassie.

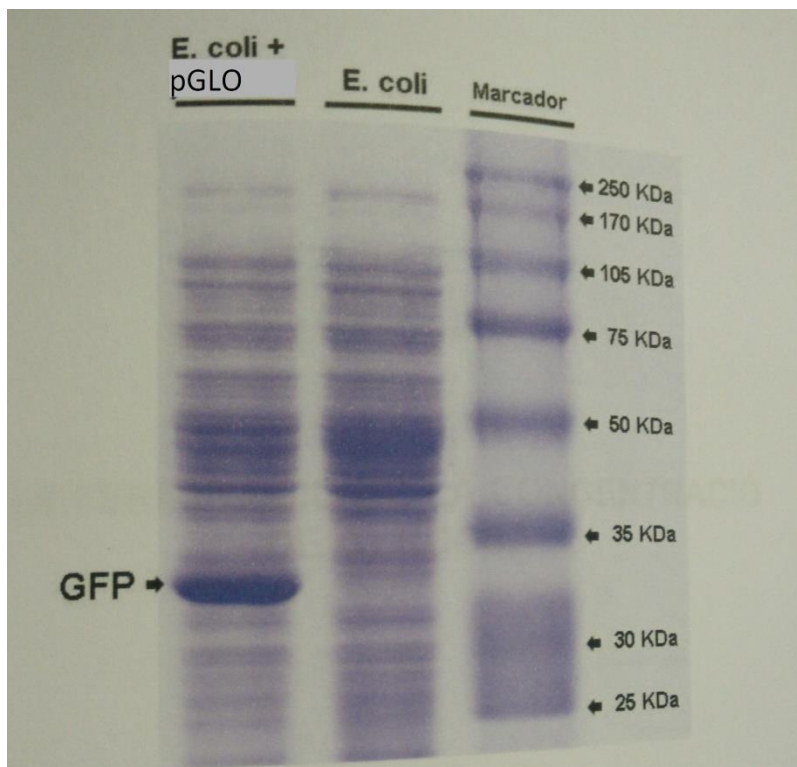
Tenyim el gel deixant-lo dins d'un recipient de plàstic amb el colorant, a sobre d'un shaker (agitador) uns 20 minuts.

Destenyim el gel traient el blau de Coomassie de la placa i hi avoquem destenyidor, deixant-ho al shaker 15 minuts més.

7. Resultats obtinguts

Es comprova que a la zona de 27kDa del marcador, hi ha una ratlla grossa als pous positius, indicant així la presència de la proteïna incorporada a través del plasmidi.

En aquest moment ja no es podria visualitzar la GFP en el gel de poliacrilamida, ja que la proteïna ha perdut tota la fluorescència perquè està desnaturalitzada i sense estructura terciària.



32. Gel d'acrilamida acolorit i assecat. En comparar el patró de bandes de proteïna entre la mostra problema (*E. Coli* + pGLO), la control (*E. Coli*) podem observar que la primera té una banda extra que correspon a la proteïna GFP sobreexpressada.

Obtenció dels resultats i conclusió

A partir dels resultats obtinguts, arribant a la conclusió de que les colònies bacterianes han estat transformades genèticament a partir de la transferència d'un plasmidi al bacteri *E. Coli*. El procés ha estat comprovat a partir del mecanisme de regulació del plasmidi i després l'electroforesi.

Amb un procés senzill de realitzar com aquest, es pot veure la complexitat d'aquests mecanismes.

Concloc, per tant, demostrant que és possible modificar el genoma dels éssers vius mitjançant tècniques bioquímiques i així com hem pogut afegir la GFP en forma de plasmidi dins d'un bacteri, es pot fer amb alguna altra proteïna que sigui necessari sintetitzar, amb fins mèdics.

Aquesta utilitat té una gran importància dins del camp biomèdic, degut a la participació que té en la producció de proteïnes recombinants per ser després administrades a pacients que no les poden sintetitzar.

Sens dubte, els descobriments dins d'aquest camp representen un gran avenç per a l'enginyeria genètica. Durant els pròxims anys, és probable que el mercat d'aquestes proteïnes recombinants augmenti de manera considerable i així la seva producció.

És per això que amb aquesta experimentació podem demostrar que la modificació genètica d'alguns organismes ens pot i podrà ser útil per a fabricar fàrmacs, vacunes, proteïnes recombinants, i que les indústries farmacèutiques que actualment ja involucren la modificació genètica per a produir fàrmacs, són només el principi d'una gran revolució mèdica que està arribant.

Fonts d'informació

LLIBRES

1. Ingraham, John L. *Introducción a la microbiología*. Editorial Reverté, 1998
2. John E. Smith. *Biotecnología*. Editorial Acribia, 2004.
3. R. Renneberg. *Biotecnología para principiantes*. Editorial Reverté, 2004.
4. William J. Thieman, Michael A. Palladino. *Introducción a la biotecnología*. Editorial Pearson, 2010.
5. Masayori Inouye. *Experimental Manipulation of Gene Expression*
6. Josep M. Fernández Novell, *Bioquímica experimental per a petits i grans*.

PÀGINES WEB

Espanyol

- <https://ddd.uab.cat/pub/estudis/2012/103201/transgenicos.pdf>
- https://www.researchgate.net/profile/Cesar_Paz-y-Mino/publication/287201502_Transgenicos_Una_cuestion_cientifica/links/5672d07e08aedbbb3f9f6c0e.pdf#page=82
- <http://www.analesranf.com/index.php/mono/article/viewFile/535/553&a=bi&pagenumber=1&w=100>
- <http://e-ciencia.com/blog/divulgacion/vacunas-de-dna-%C2%BFvacunas-de-tercera-generacion/>
- <http://www.faba.org.ar/fabainforma/359/acta01.html>
- <http://medmol.es/glosario/61/>
- http://dadun.unav.edu/bitstream/10171/22892/1/Sangre1984_29767.pdf
- <http://www.elmundo.es/elmundosalud/2008/10/08/biociencia/1223459719.html>
- <http://www.fmed.uba.ar/depto/bioqhum/Seminario%2017%20Biologia%20Molecular.pdf>
- <http://medicinaapuntes.blogspot.com.es/2014/05/produccion-de-proteinas-recombinantes.html>
- <http://enzimamicro.blogspot.com.es/2008/10/produccion-de-enzimas-partir-de.html>
- <http://www.argenbio.org/adf/uploads/pdf/VACUNAS.pdf>
- https://ca.wikipedia.org/wiki/Electroforesi_en_gel

Anglès

- <http://knowgenetics.org/transgenic-organisms/>
- https://en.wikipedia.org/wiki/Monoclonal_antibody
- <https://microbialcellfactories.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12934-014-0141-0>
- <https://espanol.vaccines.gov/b%3%A1sicos/tipos/eskw/%C3%ADndice.html#subunit>

