



EDITED

TÈCNIQUES D'EDICIÓ GENÈTICA: DEL PRESENT AL FUTUR

Podrà el CRISPR-CAS9 substituir les tècniques d'edició genètica actuals?



SEHAR TARIQ

2n de Batxillerat Científic

Tutora: Dunia Aparicio

Institut Juan Manuel Zafra

Barcelona, 5 de novembre de 2018

*“With faith, discipline and selfless devotion to duty, there is nothing worthwhile
that you cannot achieve.”*

Muhammad Ali Jinnah (polític pakistanès)

“La gratitud se da cuando la memoria se almacena en el corazón y no en la mente”

Lionel Hampton

AGRAÏMENTS

Vull agrair a totes les persones que m’han ajudat al llarg de tot el procés d’aquest treball de recerca i per tant vull fer una menció especial a tots aquells que han dedicat el seu temps per tal que jo pogués fer un bon treball de recerca.

En primer lloc, vull agrair a la meva tutora de recerca, Dunia Aparicio, per orientar-me just quan vaig començar i no tenia clar quin tema escollir. En aquell moment em va contactar amb el Doctor Joan Blasi de la Facultat de Medicina de la UB del Campus Bellvitge on em vaig interessar sobre el que feien i vaig entrar en contacte amb el tema del qual aniria el meu treball.

També vull donar les gràcies al Doctor i professor Joan Blasi, que ha dedicat moltes hores perquè fos possible la part pràctica del meu treball i a més, per enviar-me tots els documents i materials necessaris per facilitar el meu treball. Gràcies per la teva dedicació, la teva ajuda i per resoldre tots els meus dubtes a l’hora de la redacció del treball i al laboratori.

Vull agrair a Begoña Aran del Centre de Medicina Regenerativa de Barcelona, especialista en ètica per concedir-me una entrevista, atendre’m amablement i per donar-me el seu punt de vista de forma honesta i raonable sobre el tema.

I, per descomptat, vull agrair a la meva família per la seva ajuda i suport, donant-me la seva neutra opinió i explicant-me tots els seus coneixements sobre el tema per a que aquest treball fos possible.

Finalment, agraeixo molt especialment el suport a totes les persones que d’una manera o altra m’han ajudat, encara que el seu nom no figuri de forma explícita en aquestes línies; sense ells tampoc hauria estat possible.

INDEX

1.INTRODUCCIÓ	6
2.METODOLOGIA	9
2.1 Planificació i organització	9
3. MARC TEÒRIC	11
3.1 L'enginyeria genètica	11
3.1.1 Història de l'enginyeria genètica	11
3.1.2 Aplicacions de l'enginyeria genètica	12
3.1.3 Avantatges i inconvenients de l'enginyeria genètica	13
3.1.4 Teràpia gènica	13
3.1.5 Enzims de restricció	15
3.1.6 Transfecció cel·lular	15
3.1.7 Problemes ètics de l'enginyeria genètica	18
3.2 CRISPR-CAS9	20
3.2.1 Què és el CRISPR-CAS9	20
3.2.2 Com funciona el CRISPR CAS9	21
3.3 La toxina Èpsilon (toxina-ϵ)	23
3.3.1 Què és la toxina Èpsilon?	23
3.3.2 Què pot causar la Etx	24
3.3.3 Receptor de la Etx	25
3.4 La proteïna MAL	26
4.Materials i tècniques	27
4.1 Materials	27
4.1.1 Centrifugadora	27
4.1.2 Cèl·lules JEKO-1	27
4.1.3 Cèl·lules A549	28

4.1.4 GFP (Green Fluorescent Protein)	28
4.1.5 Electroporador	29
4.1.6 Microscopi Confocal.....	29
4.1.7 Cell Sorter.....	29
4.2Tècniques	30
4.2.1 Mètode de la Lipofectamina	30
4.2.2 Electroporació.....	30
4.2.3 Western Blot.....	30
4.2.4 Citometria de flux.....	31
5.EXPERIMENT	32
5.1 Cultiu cel·lular	33
5.2 Transfecció cel·lular	34
5.3 Seguiment de la transfecció.....	36
5.4 Prova de citotoxicitat.....	41
5.5 Resultats de l'experiment.....	43
6.EI CRISPR-CAS9:UNA NOVA EINA D'EDICIÓ GENÈTICA PEL FUTUR.....	49
6.1 Situació actual del CRISPR-CAS9	50
6.2 CRISPR-CAS9 i ètica.....	52
7.CONCLUSIONS.....	54
8.BIBLIOGRAFIA	58
Fonaments teòrics	58
Materials i tècniques.....	60
9.ANNEXOS.....	61
ANNEX A: Diari de l'estada al laboratori de l'Hospital de Bellvitge.....	61
ANNEX B: Entrevistes	63
ANNEX C: Glossari	70

“Si no conozco una cosa, la investigaré”

Louis Pasteur

1.INTRODUCCIÓ

Avui en dia, gràcies als avenços tecnològics en el camp de biotecnologia, concretament en l'enginyeria genètica¹ hi ha hagut un progrés molt ràpid i ens trobem que fa pocs anys els científics van descobrir la seqüència completa del genoma humà. En els últims anys hi ha hagut molts descobriments sobre tècniques d'edició genètica i aquests avenços han portat molts beneficis a la nostra societat ja que s'utilitza per la creació de vacunes, la reparació genètica o per crear resistència a malalties en humans, animals o plantes. Aquest camp de la biotecnologia és molt important pel futur ja que ens permetrà trobar solució a molts problemes de la salut humana i de la indústria que avui en dia som incapaços de solucionar. A més, fa molt poc ha sorgit una altra tècnica d'edició genètica, el CRISPR-CAS9, que d'aquí pocs anys podria accelerar molt més el descobriment de solucions a moltes malalties genètiques.

L'elecció del tema d'aquest treball va ser una mica difícil i tardà. Tenia clar que l'àmbit del meu treball seria referent a les ciències de la salut. Després d'estar-hi pensant durant un temps seguia sense saber quin tema escollir ja que havia de ser un tema específic i no molt ampli. Llavors la meva tutora, la Dunia Aparicio, em va oferir la possibilitat de fer el meu treball de recerca a la Facultat de Medicina de l'Hospital de Bellvitge amb el professor Joan Blasi.

A finals del mes de gener vaig tenir la primera reunió amb ell i em va explicar una mica el que ells estaven fent en el seu laboratori. Un dels temes que estaven estudiant era el CRISPR-CAS9 i a mi aquest tema em va cridar bastant l'atenció de manera que vaig decidir que el meu treball tractaria de les tècniques d'edició genètica i el CRISPR-CAS9.

En la meva segona trobada amb el professor de laboratori vam concretar que jo faria una pràctica de transfecció cel·lular per trobar si l'acceptor de la toxina Èpsilon és la

¹ Enginyeria genètica: és la part de les ciències que s'encarrega de la manipulació i transferència d'ADN d'un organisme a un altre.

proteïna MAL (Myelin And Lymphocyte protein), proteïna integral de membrana que si s'unís amb la toxina Èpsilon pot matar a la cèl·lula i per tant provocar danys a l'individu. Aquesta toxina es troba en l'intestí dels animals remugadors i si s'ajunta amb la proteïna podria matar les cèl·lules. El MAL, entre d'altres llocs, també es troba en la mielina (capa que recobreix les neurones), de manera que si el receptor de la toxina és el MAL, la toxina podria ser un desencadenant de l'atac autoimmunitari al sistema nerviós dels malalts d'esclerosi múltiple.

Aquesta pràctica la faríem amb dos tipus de cèl·lules diferents, les JEKO-1, limfòcits B, i les A549, cèl·lules epitelials del pulmó. Amb aquesta experimentació posaríem en pràctica dues tècniques d'edició genètica, ja que la pràctica del CRISPR era molt més llarga i complexa que no es podria dur a terme amb el temps que jo disposava. De manera que vam haver de reconduir una mica el camí per on aniria el meu treball.

En aquest moment és quan vaig decidir que el meu treball es basaria en una anàlisi de les tècniques d'edició genètica actuals i la seva comparació amb el CRISPR-CAS9. La pregunta que em vaig plantejar va ser la següent:

- **Quins avantatges aportarà la tècnica CRISPR-CAS9 en el futur en comparació amb les tècniques d'edició genètica actuals?**

Per tant, a partir d'aquesta pregunta els objectius principals que em vaig plantejar són:

- **Saber quins són els avantatges i inconvenients del CRISPR-CAS9, la nova tècnica, sobre els mètodes de transfecció que s'utilitzen actualment.**
- **Saber quins problemes ètics pot provocar l'ús de la nova tècnica CRISPR-CAS9.**

Referent a la pràctica que faria al laboratori em vaig plantejar uns altres objectius que són els següents:

- **Fer una transfecció cel·lular mitjançant el mètode de la Lipofectamina i l'Electroporació.**
- **Saber si la proteïna MAL reconeix la toxina Èpsilon en les cèl·lules JEKO-1 (limfòcits B) i en les cèl·lules A549.**

Aleshores, a partir dels meus objectius em vaig plantejar les següents hipòtesis:

- **El CRISPR-CAS9, al futur, suposarà un gran canvi en l'edició genètica ja que té molts avantatges sobre les tècniques actuals perquè es podran editar genèticament éssers amb més facilitat i més rapidesa.**
- **Un gran nombre de cèl·lules incorporaran el gen de la proteïna MAL i l'expressaran.**
- **La proteïna MAL reconeixerà la toxina Èpsilon en les cèl·lules JEKO-1 i en les cèl·lules A549.**

Per poder aconseguir dades i informació suficient per complir els meus objectius i poder corroborar o desmentir les hipòtesis que plantejo amb aquest treball aniré a la Universitat de Barcelona Campus Bellvitge per treballar al laboratori 4145 que és el departament de patologia i terapèutica experimental/ unitat d'histologia. A més, per poder tenir més informació també faré dues entrevistes a experts en genètica i ètica.

Penso que aquest treball és d'interès general i pot ser molt interessant, ja que gràcies a les tècniques d'edició genètica es pot trobar cura a moltes malalties i, en un futur proper, gràcies a aquesta nova tècnica, pot haver grans avenços en el camp de la teràpia gènica, donat que s'està fent molta investigació.

“El éxito no se logra sólo con cualidades especiales. Es sobre todo un trabajo de constancia, de método y de organización”

J.P. Sergent

2.METODOLOGIA

Per poder assolir els meus objectius i poder afirmar o refutar les meves hipòtesis, primerament em dedicaré a realitzar una recerca teòrica sobre el tema i així tenir els coneixements necessaris quan faci la pràctica. Un cop tinguem el marc teòric realitzarem la part pràctica. Per tant, aplicaré una metodologia experimental.

2.1 Planificació i organització

Fases d'elaboració del TR	Data	Material utilitzat
Elecció del tema	Febrer 2018	Trobada amb Joan Blasi
Documentació – marc teòric	Març 2018-Juny 2018	Pàgines diverses d'internet, llibre de Biologia 1r i 2n de batxillerat, articles científics
Part pràctica - experiment al laboratori	Juliol 2018 i Setembre 2018	Laboratori UB-Campus Bellvitge, llibreta, bolis, material de laboratori
Part pràctica - entrevistes	10 i 11 d'octubre 2018	Gravadora
Redacció del treball	Agost - octubre 2018	Ordinador, articles científics
Revisió del treball	Octubre 2018	Ordinador

En l'apartat del marc teòric s'expliquen tots els fonaments teòrics per posteriorment poder entendre la part pràctica del treball. Per dur-ho a terme he utilitzat diverses pàgines webs d'internet, articles proporcionats pel professor Joan Blasi i el llibre de biologia de 1r i 2n de Batxillerat².

En la part pràctica del treball s'explicarà pas a pas les tècniques i la pràctica que s'ha dut a terme durant el mes de juliol i uns dies de setembre del 2018 al laboratori 4145 de la Facultat de Medicina de la UB al campus Bellvitge. Al laboratori vaig estar

² Totes les webs d'internet i documents consten a la bibliografia.

amb el Doctor Joan Blasi que em va ajudar a fer tota la pràctica amb totes les tècniques necessàries.

Primer de tot, trobem un apartat que explica els materials i les tècniques utilitzades en l'experiment, per tal que es pugui entendre bé la part pràctica. Seguidament, trobem tota l'explicació extensa de la pràctica feta al laboratori per tal de aconseguir els meus objectius i després trobem els resultats de l'experiment.

Tot seguit podem trobar un apartat on es parla del CRISPR-CAS9, que és una nova eina que s'utilitza en l'enginyeria genètica, i sobre l'ús ètic d'aquesta tècnica.

Per acabar, es troben les conclusions i la bibliografia del treball.

3. MARC TEÒRIC

En aquest apartat del treball s'expliquen els temes principals que serviran per entendre el treball. Aquest apartat està dividit en 4 apartats principals: l'enginyeria genètica, CRISPR-CAS9, toxina Èpsilon i la proteïna MAL.

3.1 L'enginyeria genètica

L'enginyeria genètica és la tècnica que permet la modificació del genoma³ d'un individu. La modificació de gens es pot fer per addició, per eliminació o per alteració de gens i l'ADN que s'obté es diu ADN recombinant. Aquestes modificacions són possibles gràcies als enzims de restricció, tot i que actualment s'ha començat a fer servir un altre mètode, el CRISPR-CAS9. L'enginyeria genètica aplicada a la curació de malalties i a la millora de plantes i animals d'interès alimentari s'anomena biotecnologia. La biotecnologia es defineix com la manipulació dels organismes amb l'objectiu d'obtenir productes útils. Com a exemples tindriem la utilització de fongs i bacteris per a obtenir aliments fermentats.

3.1.1 Historia de l'enginyeria genètica

- **1966:** Es va desxifrar el codi genètic complet de l'ADN.
- **1972:** Es va crear la primera molècula d'ADN recombinada en un laboratori.
- **1973:** Es van realitzar els primers experiments amb l'enginyeria genètica, en els quals es transfereixen amb èxit els gens d'una espècie en una altra, en la que funcionen correctament.
- **1975:** Daniel Nathans, Werner Arber i Hamilton O. Smith van descobrir els enzims de restricció, que permeten donar un gran pas en l'estudi de l'ADN.
- **1977:** Es va fabricar amb èxit una hormona humana dins d'una bactèria.

³ Genoma: conjunt haploide, un gen de cada tipus, de gens de l'organisme

- **1978:** Daniel Nathans, Werner Arber i Hamilton O. Smith van guanyar el premi Nobel degut el descobriment dels enzims de restricció. També es va aconseguir clonar el gen de la insulina humana.
- **1982:** Es va crear el primer ratolí transgènic.
- **1983:** Es va inventar la tècnica del PCR (reacció en cadena del ADN polimerasa⁴).
- **1986:** Es van autoritzar proves clíniques de la vacuna contra la hepatitis B, creada mitjançant l'enginyeria genètica.
- **1990:** Es va dur a terme el primer tractament amb èxit mitjançant la teràpia gènica en nens amb trastorns immunològics (nen bombolla). Es posen en moviment molts protocols experimentals de teràpia gènica per intentar curar malalties cancerígenes i metabòliques.
- **1997:** Es va realitzar la primera clonació d'un mamífer, l'ovella Dolly.

3.1.2 Aplicacions de l'enginyeria genètica

L'enginyeria genètica té diverses aplicacions:

- **Medicina:** Es fa servir per obtenir diversos fàrmacs, els quals els humans per nosaltres mateixos no som capaços de fabricar per alguna malaltia. Aquesta aplicació consisteix en transferir gens humans a bacteris per tal que aquests organismes produeixin proteïnes per humans. Gràcies a aquesta aplicació per exemple, s'obté la insulina, vacunes i proteïnes de coagulació de la sang. Un altre exemple es la teràpia gènica, que mitjançant transferència de gens, es poden substituir els gens defectuosos d'una persona per uns altres que funcionin correctament i d'aquesta manera es poden combatre malalties que depenen de gens defectuosos.
- **Alimentació:** S'aplica per tal de millorar la conservació dels aliments que consumim, és a dir, produir aliments transgènics a l'agricultura.

⁴ ADN Polimerasa: és una proteïna enzimàtica encarregada de duplicar les cadenes d'ADN durant la replicació

- **Indústria:** S'aplica per tal de millorar les condicions ambientals, per exemple s'han creat bacteris que s'alimenten de petroli per tal que s'alimentin del petroli que es vessa al mar de manera que netegen el petroli i redueixen els seus danys. També s'utilitza per crear animals transgènics.

3.1.3 Avantatges i inconvenients de l'enginyeria genètica

Gràcies a l'enginyeria genètica, els científics poden fer certes combinacions entre gens per tal de solucionar problemes en humans, i per la millora del rendiment econòmic i comercial de les explotacions com poden ser:

- Cures a malalties genètiques perquè les noves generacions neixin més sanes.
- A l'agricultura, la ciència ha aconseguit que es conreïn plantes amb major tolerància a les sequeres.
- En alguns cultius, s'han posat gens de bacteris perquè es desenvolupin proteïnes insecticides i reduir l'ús d'insecticides.
- Utilitzar gens humans responsables de la producció d'insulina en cèl·lules bacterianes per obtenir insulina de gran qualitat a baix cost. Aquestes cèl·lules poden produir molta quantitat, ja que es produeixen a una gran velocitat.

Però, un dels perills d'aquesta tecnologia és el fet que darrere dels projectes de manipulació genètica hi ha companyies multinacionals molt preocupades per l'interès econòmic i a més també es pot contaminar a altres plantes no transgèniques.

També pot produir al·lèrgies, cosa que preocupa molt als productors d'aquests aliments. Potser degut al material genètic transferit, a la formació inesperada d'un al·lèrgen o a la falta d'informació sobre la proteïna que codifica el gen inserit.

3.1.4 Teràpia gènica

La teràpia gènica és un camp de l'enginyeria genètica en el qual els gens s'introdueixen en el cos per tractar malalties. Els gens controlen l'herència i

proporcionen el codi biològic bàsic per determinar les funcions específiques de cada cèl·lula. L'objectiu de la teràpia gènica, com hem dit, és tractar les malalties mitjançant la introducció de gens funcionals en el cos per alterar les cèl·lules implicades en el procés de la malaltia, ja sigui substituint els gens que faltaven o proporcionant còpies dels gens funcionals per reemplaçar els no funcionals. Els gens inserits poden ser gens d'origen natural que produeixen l'efecte desitjat o poden ser gens genèticament modificats (o alterats).

Hi ha dos tipus de teràpia gènica:

- **La teràpia gènica somàtica:** els gens terapèutics s'insereixen en el teixit o en les cèl·lules per produir una proteïna o substància natural que no té el pacient o no és correcte.
- **La teràpia gènica de línia germinal:** s'insereix gens en cèl·lules reproductives o en embrions per corregir defectes genètics que es podrien transmetre a la descendència. Inicialment va ser concebut com un enfocament per al tractament de malalties hereditàries, com la fibrosi quística i la malaltia de Huntington, l'abast de les teràpies genètiques ha crescut per incloure tractaments per al càncer, l'artritis i les malalties infeccioses.

La manipulació dels gens es fa mitjançant un procés anomenat separació de gens. El procés implica l'eliminació d'un fragment d'ADN que conté la seqüència genètica específica que es vol eliminar, després la inserció en l'ADN d'un altre gen desitjat. El producte resultant es diu ADN recombinant i el procés és l'enginyeria genètica.

En ambdós tipus de teràpia, els científics necessiten alguna cosa per transportar tot el gen o un ADN recombinant al nucli de la cèl·lula, on resideixen els cromosomes i l'ADN. Els vectors fan la funció de distribució molecular. Un dels primers i més populars vectors desenvolupats van ser els virus perquè envaeixen les cèl·lules com a part del procés natural d'infecció. Els virus tenen el potencial de ser excel·lents vectors perquè tenen una relació específica amb l'agent on s'enganxen en el sentit que colonitzen certs tipus de cèl·lules i teixits en òrgans específics. Com a resultat, els vectors es trien d'acord amb la seva atracció cap a certes cèl·lules i àrees del cos. Un dels primers vectors utilitzats van ser el retrovirus ja que aquests

virus són fàcilment clonats⁵ en el laboratori. Però abans de introduir un ADN nou cal eliminar el nociu i per dur a terme això s'utilitzen els enzims de restricció.

3.1.5 Enzims de restricció

Van ser descoberts per Werner Arber, Hamilton Smith y Daniel Nathans a finals dels anys 60. Són uns enzims produïts pels bacteris per defensar-se contra la invasió de virus bacteriòfags⁶ cosa que fan tallant les molècules d'ADN injectades pels virus de manera que l'inhabiliten. Aquests enzims es poden utilitzar per tallar ADN en punts concrets i així separar-ne els segments que interessin. S'han trobat molts enzims de restricció, cadascun dels qual talla l'ADN en un lloc específic, anomenat diana de restricció. Gràcies a aquests enzims és possible aïllar un gen determinat, ADN passatger, i per mitjà d'un vector determinat, introduir-lo en una cèl·lula.

3.1.6 Transfecció cel·lular

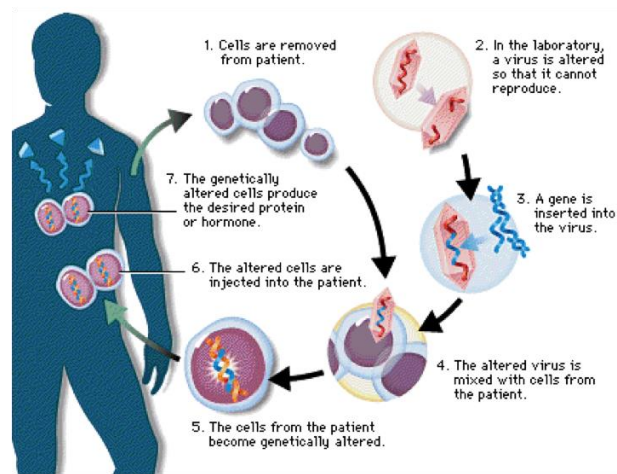
La transfecció cel·lular consisteix en la introducció de material genètic extern en cèl·lules eucariotes mitjançant plasmidis o altres eines de transferència. Freqüentment s'usa només per a referir-se a la introducció de material genètic en cèl·lules animals. Els principals mecanismes d'introducció de gens són els mecanismes biològics, físics i químics.

- Els mètodes biològics són:
 - **Plasmidi:** és un petit ADN circular de doble hèlix del qual hi ha entre 20 i 50 exemplars en un bacteri, aquest es duplica autònomament. Si la membrana cel·lular es trenca, el plasmidis poden sortir del bacteri i entrar en altres i aquest procés s'anomena transformació. Els plasmidis dels diferents bacteris tenen diferents gens que quan entren en altres bacteris fan que aquests adquireixin les propietats dels gens que hi ha en el plasmidi. Tot i això, els plasmidis no serveixen per introduir gens en cèl·lules eucariotes animals.

⁵ Clonar: reproducció artificial.

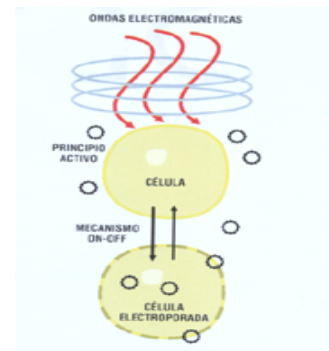
⁶ Bacteriòfag: és un mena de virus que sols infecta a bacteris.

- **Virus (bacteriòfag):** és un virus modificat que fa de “vehicle” per tal d'introduir material genètic extern en el nucli cel·lular d'una cèl·lula. L'ús de virus com a vectors requereix l'eliminació dels gens que doten el virus de la seva capacitat patògena, deixant únicament aquells que participen en la inserció del material genètic, i la seva substitució pel gen terapèutic d'interès. Aquests virus també poden provocar problemes, els virus, generalment poden reconèixer i infectar més d'un tipus de cèl·lules, la qual cosa dificulta el tractament exclusiu de les cèl·lules diana. També si el virus insereix el material genètic en un locus⁷ diferent a l'objectiu pot ocasionar mutacions amb afectes danyosos sobre el pacient i que provoquin altres problemes i finalment el virus pot ser immunogènic i produir una reacció en l'hoste.



Imatge 1: Transfecció mitjançant virus

- Els mètodes físics són:
 - **Electroporació:** Consisteix a sotmetre la cèl·lula a un alt voltatge durant un període de temps molt breu. Això origina uns orificis temporals en la membrana plasmàtica que poden servir de punts d'entrada d'ADN extern.



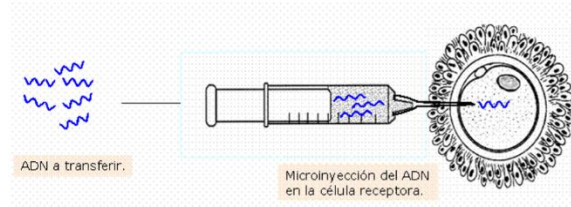
Imatge 2: Funcionament de l'electroporació

⁷ Locus: una posició fixa d'un gen en un cromosoma.

Imatge1: <https://secretsofinferno.wordpress.com>

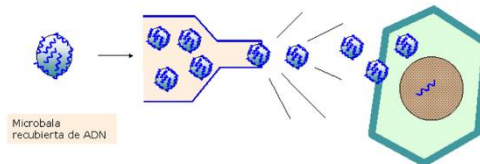
Imatge 2: <https://tinyurl.com/ycroxdey>

- **Microinjecció:** Consisteix en la injecció directa d'ADN a la cèl·lula per mitjà d'un capil·lar de només 1,5 micròmetres.



Imatge 3: Funcionament de la microinjecció

- **Tret de microbales:** S'utilitza una pistola que dispara microbales de metall recobertes d'ADN.



Imatge 4: Funcionament del tret de microbales

- Els mecanismes químics són:
 - **Mètode del fosfat càlcic:** Basat en la formació d'un precipitat, entre el clorur de calci i el DNA en una solució salina de fosfats; aquests formen uns agregats que són fagocitats per les cèl·lules.
 - **Mètode de la Lipofectamina:** Es basa en la formació de complexos entre lípids catiónics i DNA, aquest complex té afinitat per la membrana i permet l'entrada del DNA en el citosol; una de les vies és la incorporació de liposomes⁸ a la membrana i l'entrada flip-flap.



Imatge 5: Lipofectamina

⁸ Liposomes: vesícula esfèrica amb una membrana composta d'una doble capa de fosfolípids, que consten de parts hidrosolubles i liposolubles.

Imatge 3: <https://tinyurl.com/ya89vmlm>

Imatge 4: <https://tinyurl.com/ya89vmlm>

Imatge 5: <http://www.arcanalisis.com/lipofectamina.html>

3.1.7 Problemes ètics de l'enginyeria genètica

El 1974, onze biòlegs van demanar l'establiment de normes per regular possibles perills dels treballs amb DNA recombinant i van demanar una aturada respecte d'experiments amb gens productors de càncer o substàncies tòxiques. El 1976 es van establir les normes per a aquest tipus d'experiments, normes d'esterilització, sales a baixa pressió per evitar la sortida d'aire contaminat en cas d'accident, treballar amb soques d'*Escherichia Coli* genèticament febles que no puguin viure fora del laboratori, etc.

En una primera etapa, les qüestions sobre enginyeria genètica es van centrar en la qualitat, la seguretat i l'eficàcia dels productes. En una segona etapa, la discussió anava sobre qüestions ètiques i la relació amb els processos legislatius. Per donar resposta a aquestes qüestions es va crear el Comitè Internacional de Bioètica de la Unesco. L'objectiu d'aquest comitè és evitar aspectes del progrés que atemptin contra la dignitat humana i que la ciència no sigui identificada com sospitosa.

Els criteris bàsics que s'han establert són els següents:

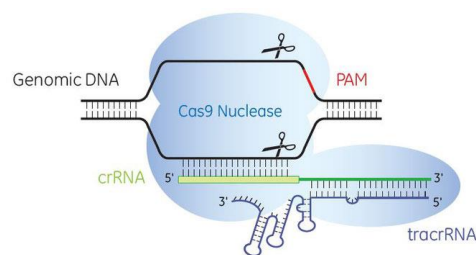
- **Límits per motius ecològics i sanitaris:** es considera que han d'haver-hi controls molt estrictes en la producció d'organismes transgènics quan aquests puguin causar desastres ecològics, com per exemple l'extinció d'espècies naturals, provocar malalties en l'espècie humana o produir contaminacions sobre tot de les aigües.
- **Límits per motius ètics i morals:** es considera que aplicacions que són totalment lícites en espècies animals i vegetals no ho són en l'espècie humana donada la dignitat de l'ésser humà. Si s'utilitza amb la intenció de curar una malaltia humana és moralment correcte.
- **Límits per motius socials:** es considera que hi ha d'haver límits legals basats en el dret a la intimitat que impedeixin l'exigència d'un sondeig gènic per accedir a un lloc de treball, a una plaça en un centre educatiu, assistència sanitària, etc.

- **Límits per motius polítics:** es considera que les aplicacions de l'enginyeria genètica en la producció vegetal i animal han d'afavorir tots els humans i no tan sols els grups que dominen aquestes tècniques. Hi podria haver perjudicis econòmics greus si, amb l'establiment de patents d'organismes transgènics, s'augmentessin les diferències entre els països pobres i països rics.

3.2 CRISPR-CAS9

3.2.1 Què és el CRISPR-CAS9

La tecnologia CRISPR / CAS9 és una eina molecular utilitzada per a editar o corregir el genoma de qualsevol cèl·lula, inclosa les humanes. Son com unes tisores moleculars capaces de tallar qualsevol molècula d'ADN i ho fa de manera molt precisa i controlada.



Imatge 6: Estructura del CRISPR-CAS9

Aquesta capacitat de tallar l'ADN és el que permet modificar la seva seqüència, eliminant o inserint nou ADN.

La tècnica va sorgir al 1987 quan es va publicar un article en el qual es descrivia com alguns bacteris (*Streptococcus pyogenes*) es defensaven de les infeccions víriques. Aquests bacteris tenen uns enzims que són capaços de distingir entre el material genètic del bacteri i el del virus i un cop feta la distinció destrueixen al material genètic del virus. Més tard quan es van investigar els genomes de diferents bacteris els investigadors van observar que una zona determinada del genoma de molts microorganismes, sobretot arqueobacteris, era plena de repeticions polindròmiques⁹ sense cap funció aparent. Aquestes repeticions estaven separades entre si mitjançant unes seqüències anomenades "espaiadors" que s'assemblaven a altres de virus i plasmidis. Just davant d'aquestes repeticions i "espaiadors" hi ha una seqüència anomenada "líder". A més, a prop d'aquest agrupament es podien trobar uns gens que codificaven un tipus de nucleases: els gens cas. El Dr. Francis Mojica, investigador de la Universitat d'Alacant, va descobrir el 1993 aquestes seqüències repetides a les quals va denominar CRISPR ("Repeticions palindròmiques Curtes Agrupades i Regularment interespaçades"). El seu article, publicat a *Molecular Microbiology*, va anticipar la troballa d'aquest mecanisme d'immunitat adaptativa en els microorganismes.

El seu funcionament és que quan un virus entra dins del bacteri s'apropia del funcionament cel·lular i per això interacciona amb els diferents components cel·lulars del bacteri. Però els bacteris que tenen aquest sistema de defensa tenen un complex format per una proteïna Cas unida a l'ARN produït a partir de les seqüències

⁹ Polindròmiques: seqüències que es llegeixen igual del dret i del revés

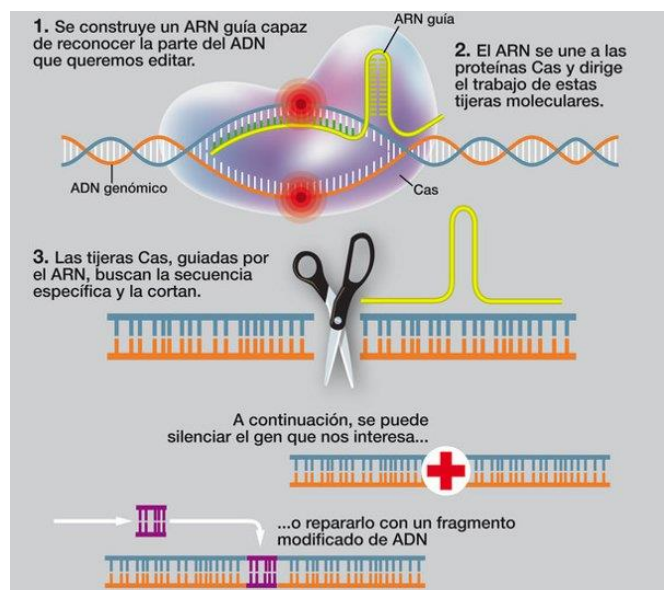
Imatge 6: <https://tinyurl.com/yattho4a>

CRISPR. De manera que el material gènic del virus pot interaccionar amb aquest complex. En el moment que això passa el material genètic del virus és inactivat i després degradat. A més a més les proteïnes Cas són capaços d'agafar una petita part de l'ADN viral, modificar-lo i integrar-lo dins el conjunt de seqüències CRISPR. D'aquesta forma, si aquesta bacteri (o la seva descendència) es troba amb aquest mateix virus, s'inactivarà de forma molt més eficient al material genètic viral.

Després, l'any 2012 les doctores Emmanuelle Fuster a la Universitat d'Umeå i Jennifer Doudna, a la Universitat de Califòrnia a Berkeley, van publicar un article en el qual es demostrava com convertir aquests sistema natural en una eina d'edició "programable", que servia per tallar qualsevol cadena d'ADN in vitro. És a dir, aconseguien programar el sistema perquè es dirigís a una posició específica d'un ADN qualsevol (no només víric) i el tallessin.

3.2.2 Com funciona el CRISPR CAS9

Primer de tot es crea un ARN guia que és complementari amb la cadena d'ADN que es vols destruir. Aquest ARN s'ajunta amb la proteïna Cas9, que és capaç de trencar els enllaços de la cadena d'àcids nucleics, i formen un complex . Aquest complex primer de tot localitza i s'uneix a una seqüència del propi genoma, anomenada PAM. El PAM és una seqüència d'ADN, d'entre 1 i 5 nucleòtids¹⁰, que està a



Imatge 7: Funcionament del CRISPR-CAS9

continuació de la seqüència d'ADN que es vol destruir. PAM és un component de l'ADN de l'individu, però no és un component del CRISPR. La proteïna Cas9 no s'unirà al ADN o no el tallarà correctament si a continuació no hi ha present la seqüència PAM. El PAM permet distingir l'ADN propi del que no ho és, evitant que el locus CRISPR sigui tallat per la proteïna.

¹⁰ Nucleòtid: unitats estructurals bàsiques dels àcids nucleics

Imatge 7: <https://goo.gl/YPNcj3>

Llavors el Cas 9 separa la doble hèlix d'ADN i l'ARN guia s'ajunta amb la seva cadena complementària d'ADN nociu i després el Cas9 talla l'ADN.

Llavors la cèl·lula intenta arreglar el tall de l'ADN per si mateixa però aquest procés pot provocar un error de manera que hi hagi una mutació i el gen quedi inhabilitat. Finalment es pot afegir la seqüència d'ADN que contingui la informació que es vol.

3.3 La toxina Èpsilon (toxina-È)

3.3.1 Què és la toxina Èpsilon?

Una toxina és una substància verinosa produïda per cèl·lules o organismes vius. Les toxines poden ser molècules petites, pèptids o proteïnes, i poden causar intoxicació per contacte o absorció pels teixits biològics interaccionant amb les macromolècules biològiques com els enzims o receptors cel·lulars.

La toxina Èpsilon (Etx) és la toxina clostridial, produïda per bacteris del gènere Clostridium, és la toxina més potent després de toxines botulíniques i tetànica (neurotoxines), que afecten principalment als rumugants i causen importants pèrdues econòmiques. La producció d'aquesta toxina es deu a un bacteri en forma de bastó i formador d'espores, que forma part dels intestins d'animals rumugadors joves i que s'anomena Clostridium perfringens. Aquests bacteris creixen molt ràpid en medis rics en carbohidrats¹¹ i mitjançant la seva fermentació produeix grans quantitats d'hidrogen i diòxid de carboni que mantenen l'ambient anaeròbic. Aquesta toxina és una proteïna que forma porus i provoca que les cèl·lules vessin potassi i fluid.



C. perfringens
Epsilon Toxin
Imatge 8: Estructura Etx

Existeixen cinc soques de *C. perfringens*, designades des de A fins a E. Cada soca produeix un espectre de toxines únic que pot ser alfa, beta, èpsilon o iota.

Cepa de Clostridium perfringens	Toxinas
Tipo A	alfa
Tipo B	alfa, beta, èpsilon
Tipo C	alfa, beta
Tipo D	alfa, èpsilon
Tipo E	alfa, iota

Taula 1: Classificació de C.Perfringens basada en la producció de toxines

¹¹ Carbohidrats: biomolècules orgàniques formades per carboni, hidrogen i oxigen que contenen grups funcionals carbonil i molts grups hidroxil.

Imatge 8: <https://www.mdpi.com/2072-6651/5/11/2138>

Tal i com veiem a la taula anterior la toxina èpsilon es troba en les soques de tipus B i D. En un principi es produeix i es secreta en forma de protoxina (forma no activa de la toxina) amb un pes molecular de 32,7 kDa que al patir una proteòlisi (degradació de proteïnes ja sigui mitjançant enzims específics, anomenats proteases, o per mitjà de la digestió intramolecular) específica adquireix la seva màxima activitat biològica. Aquesta activació pot ser catalitzada per proteïnes com la tripsina, la quimotripsina i una zinc-metaloproteasa produïda per *C. perfringens* en el tracte gastrointestinal.

3.3.2 Què pot causar la Etx

La toxina Èpsilon és tòxica per cèl·lules de la línia Madin-Darby canine kidney (MDCK), cèl·lules que provenen del ronyó del gos, i en menor mesura, per a la línia G-402 de cèl·lules de leiomioblastoma, tumor benigne de l'estómac. Diversos treballs realitzats amb cèl·lules MDCK mostren que la toxina Èpsilon provoca inflor, formació de bombolles, fragmentació i lisi cel·lular¹². A més, es va demostrar que en les cèl·lules MDCK la toxina Èpsilon forma un complex a la membrana citoplasmàtica, encara que el seu ingrés a la cèl·lula no és necessari per exercir toxicitat. En aquestes cèl·lules, l'acció citotòxica es correlaciona amb la formació d'un gran complex de membrana que causa una ràpida pèrdua de potassi amb entrada de sodi i clorur, mentre que la concentració de calci s'incrementa; això dona com a resultat una pèrdua de la viabilitat cel·lular.

Aquesta toxina causa enterotoxèmia¹³ a ovelles i cabres provant afectacions en el seu sistema nerviós central, degeneracions en certes cèl·lules del cervell, la malaltia del ronyó esponjós o afectes en el teixit pulmonar, aquests afectes finalment porten a l'animal a la mort.

Aparentment hi ha molt poca informació o gairebé cap sobre els efectes de la toxina Èpsilon en humans. L'extrapolació¹⁴ a partir d'estudis amb animals infectats experimentalment indica que és possible que es presentin signes neurològics o

¹² Lisi cel·lular: trencament de la membrana cel·lular.

¹³ Enterotoxèmia: malalties produïdes per les toxines de bacteris *Clostridium* que es multipliquen en l'intestí.

¹⁴ Extrapolació: Aplicació d'un criteri conegut a altres casos similars per extreure conclusions o hipòtesis.

edema pulmonar. Els tipus A i D de *C. perfringens*, que produeixen la toxina Èpsilon, rarament s'aïllen d'humans. En humans, en general la malaltia la provoca la soca de tipus A, típicament associades amb intoxicació d'aliments, i la soca de tipus C, associades amb enteritis necrotitzant¹⁵.

La unió específica a aquest tipus de cèl·lules es deu probablement a la presència d'un receptor, el qual seria necessari per l'activitat biològica de la toxina.

3.3.3 Receptor de la Etx

Quan la toxina s'activa comença la seva activitat a través de la mucosa intestinal i viatja pel corrent sanguini fins a generar la seva activitat biològica. La toxina Èpsilon presenta un sol lloc d'unió i com hem dit abans necessita un receptor específic per dur a terme la seva activitat. Fins ara no se sap exactament quin és aquest receptor específic però segons diferents estudis podria tractar-se d'una glicoproteïna de membrana que es troba en ambdós sistemes.

¹⁵ Enteritis necrotitzant: és una infecció en l'intestí produïda pel clostridis que pot ser letal si no es tracta ràpidament.

3.4 La proteïna MAL

La Myelin and Lymphocyte protein (MAL) és una proteïna integral de membrana de 17 kDa. Aquesta proteïna també està present en oligodendrocits¹⁶ mielinizants, mielina¹⁷, algunes cèl·lules epitelials (túbuls urotelials, pulmonars i renals) i el limfòcits. La presència de proteïnes MAL en estructures de mielina i oligodendrocits mielinizants explicaria la unió específica de la toxina Èpsilon a la mielina. Per la qual cosa es considera la proteïna com a possible receptor de la toxina.

Mitjançant diferents experiments duts a terme pel *Weill Cornell Medical College* i la Universitat Rockefeller amb teixits de cervell de ratolins deficientes en MAL i amb teixits de ratolins salvatges amb presència de MAL per poder comprovar que si la presència d'aquest era necessària per que la toxina s'hi enganxi. El resultat d'aquest experiment va mostrar que el MAL és necessari perquè la toxina Èpsilon s'uneixi a la mielina i als oligodendrocits del sistema nerviós central.

Basant-se en els resultats d'aquest experiment es pot dir que el MAL és el receptor de la toxina però encara no s'ha demostrat una interacció física entre les dues substàncies (toxina i proteïna). Amb l'experiment que durem a terme en aquest treball intentarem saber si el MAL és el receptor de la toxina Èpsilon.

¹⁶ Oligodendrocits: un tipus de cèl·lules del teixit nerviós que tenen com a funció principal fer de suport a les neurones.

¹⁷ Mielina: és la substància lipídica que recobreix algunes neurones amb la finalitat de fer més ràpides les connexions entre unes neurones i d'altres.

"Quien nunca ha cometido un error nunca ha probado algo nuevo"

Albert Einstein

4. Materials i tècniques

En aquest apartat explicarem les tècniques i els materials que s'han fet servir durant l'experiment per el millor l'enteniment d'aquest. Primerament, explicarem els instruments i els aparells que hem utilitzat i després explicarem les tècniques en els quals es fans servir.

Els materials més importants i que per tant definirem són: cèl·lules JEKO-1, cèl·lules A549, proteïna GFP, màquina d'electroporació, microscopi Confocal i màquina Cell Sorter. Respecte a les tècniques fetes servir explicarem: la tècnica de la Lipofectamina, l'electroporació, el Western Blot i la citometria de flux.

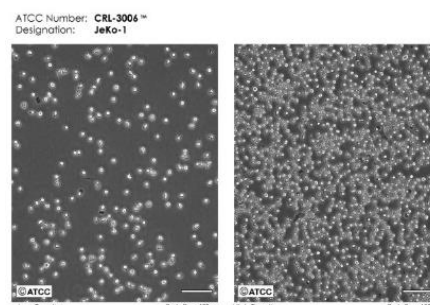
4.1 Materials

4.1.1 Centrifugadora: és una màquina que posa en rotació una mostra per separar per la força centrifugadora els seus components (generalment una sòlida i una líquida), en funció de la seva densitat. Té un motor el qual mou la mostra al voltant d'un eix aplicant una força perpendicular de manera que es genera una força centrípeta que separa els elements.



Imatge 9: Centrifugadora

4.1.2 Cèl·lules JEKO-1: són línies cel·lulars de tipus limfòcits B. Tenen un paper important en la resposta immunitària humoral (l'aspecte del sistema immunitari que és mitjançat la secreció d'anticossos). Les funcions principals dels limfòcits B són fabricar anticossos¹⁸ contra antígens¹⁹,



Imatge 10: Cèl·lules JEKO-1

¹⁸ Anticòs: glicoproteïna, utilitzat pel sistema immunitari per identificar i neutralitzar elements estranys al cos

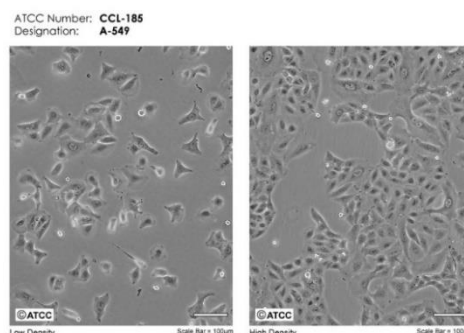
¹⁹ Antígen: molècula que pot induir a la formació d'anticossos

Imatge 9: <https://goo.gl/MjckQx>

Imatge 10: <https://goo.gl/qd7vnt>

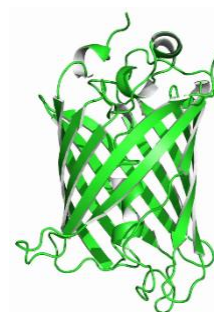
funcionar com a cèl·lules presentadores d'antigen. Els limfòcits B són un component essencial del sistema immunitari adaptatiu (compost per cèl·lules i processos especialitzats en eliminar o evitar les amenaces de patògens).

4.1.3 Cèl·lules A549: són cèl·lules epitelials²⁰ alveolars humanes adenocarcinòmiques²¹ i constitueixen una línia cel·lular que va ser desenvolupada per primera vegada el 1972 per D. J. Giard. Les cèl·lules A549, com es troben en el teixit pulmonar, són escamoses i responsables de la difusió d'algunes substàncies, com l'aigua i els electròlits, a través dels alvèols. Si les cèl·lules A549 es cultiven in vitro, creixen com a monocapa i s'adhereixen al recipient de cultiu. Les cèl·lules són capaces de sintetitzar la lecitina i contenen alts nivells d'àcids grassos insaturats, que són importants per mantenir fosfolípids de membrana. Les cèl·lules A549 s'utilitzen àmpliament com un model de cèl·lules epitelials pulmonars de tipus II per al metabolisme del fàrmac i com a amfitrió de transfecció.



Imatge 11: Cèl·lules A549

4.1.4 GFP (Green Fluorescent Protein): és una proteïna produïda per la medusa *Aequorea victoria*, que emet bioluminescència quan s'exposa a la llum blava. Té una longitud d'ona màxima d'absorció de llum a 395 nm i un altre pic menys intens a 475 nm. El primer pic es troba a la regió inferior de l'espectre visible, corresponent al verd. En biologia cel·lular i molecular, el gen de la GFP s'utilitza amb freqüència com un gen indicador



Imatge 12: Estructura GFP

²⁰ Cèl·lules epitelials: Cèl·lules que recobreixen les superfícies interna i externa del cos.

²¹ Adenocarcinòmiques: cancerígenes.

Imatge 11: <https://www.lgcstandards-atcc.org>

Imatge 12: <https://tinyurl.com/yam7clkv>

4.1.5 Electroporador: és una màquina que augmenta la conductivitat elèctrica i la permeabilitat de la membrana plasmàtica cel·lular aplicant externament un camp elèctric. És habitual en biologia molecular com a forma d'introducció de diferents substàncies en cèl·lules, com pot ser un plasmidi. Quan el voltatge que travessa una membrana plasmàtica excedeix la seva rigidesa dielèctrica es formen porus.



Imatge 13: Electroporador

4.1.6 Microscopi Confocal: és un microscopi capaç d'obtenir imatges tridimensionals d'un objecte com per exemple, d'una cèl·lula. Es basa en un principi similar al d'un microscopi de fluorescència, però s'utilitzen dos



Imatge 14: Microscopi Confocal

diafragmes²² confocals, és a dir, que té el mateix focus, un situat davant de la mostra i l'altre darrere; d'aquesta manera es pot dirigir la il·luminació a un únic punt de la mostra. S'utilitza un làser com a font lluminosa, i amb la seva llum es va escombrant la mostra en tots els punts del volum de l'objecte, pla a pla. Es van crear moltes imatges bidimensionals que un ordinador interpreta i, posteriorment, acaba generant una imatge tridimensional completa.

El principi del microscopi confocal va ser descrit per Marvin Minsky el 1953, però no va ser fins a finals dels anys 80 que van aparèixer models comercials, posant aquesta tècnica a disposició de nombrosos laboratoris. Actualment, la microscòpia confocal és molt utilitzada en biologia així com en ciències dels materials.

4.1.7 Cell Sorter: és el classificador de cèl·lules activades amb fluorescència (FACS) que permet classificar i recollir cèl·lules viables d'una barreja heterogènia per citometria de flux.



Imatge 15: Cell Sorter

²² Diafragma: disc giratori que permet passar la quantitat de llum desitjada per poder veure la mostra.

Imatge 14: <https://goo.gl/fUSGnm>

Imatge 15: <https://goo.gl/JypZk1>

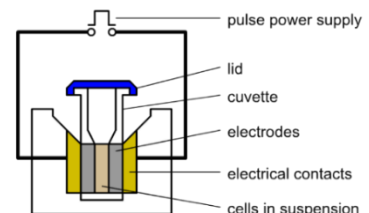
4.2 Tècniques

4.2.1 Mètode de la Lipofectamina: és un reactiu de transfecció comú, que s'utilitza en biologia molecular i cel·lular. S'utilitza per augmentar l'eficàcia de transfecció de l'ARN (incloent ARNm) o DNA plasmídic en cultius de cèl·lules in vitro per lipofecció. Conté subunitats de lípids que poden formar liposomes en un medi aquós que atrapen la càrrega de transfecció. El complex té afinitat per la membrana i permet l'entrada del DNA en el citosol.



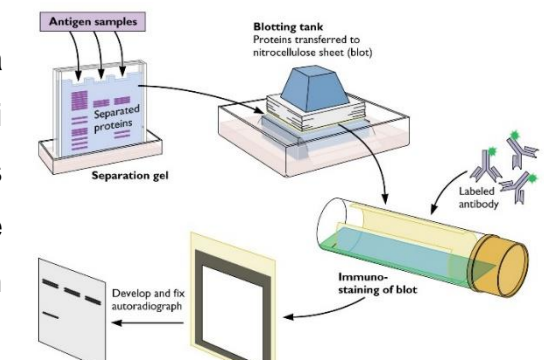
Imatge 16: Lipofectamina

4.2.2 Electroporació: consisteix a sotmetre la cèl·lula a un alt voltatge durant un període de temps molt breu. Això origina uns orificis temporals en la membrana plasmàtica que poden servir de punts d'entrada d'ADN extern. Es fa servir una cubeta d'electroporació, la qual conté la solució cel·lular.



Imatge 17: Parts cubeta d'electroporació

4.2.3 Western Blot: és una tècnica analítica utilitzada en biologia cel·lular i molecular per identificar proteïnes específiques en una barreja complexa de proteïnes, tal com la que es presenta en extractes cel·lulars o de teixits. La tècnica utilitza tres etapes per aconseguir això: separació per grandària, transferència a un suport sòlid i, finalment, visualització mitjançant el marcatge de proteïnes amb l'ús d'anticossos primaris o secundaris apropiats.



Imatge 18: Diagrama dels passos per fer un Western Blot

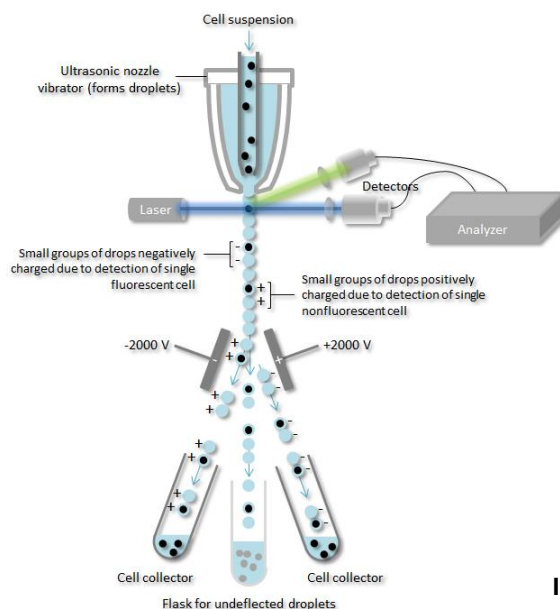
Mitjançant una electroforesi²³ en gel es separen les proteïnes atenent al criteri que es desitgi: pes molecular, estructura, etc. Després són transferides a una membrana

²³ Electroforesi: consisteix en el transport de molècules sota l'acció d'un camp elèctric.

adsorbent (típicament de nitrocel·lulosa) mitjançant electrotransferència ²⁴ per poder buscar la proteïna d'interès amb anticossos específics contra ella. Finalment, es detecta la unió antígen-anticòs per activitat enzimàtica o fluorescència, entre d'altres mètodes.

4.2.4 Citometria de flux: La citometria de flux és una tècnica quantitativa i qualitativa d'anàlisi i separació de partícules (cèl·lules, bacteris, cromosomes, orgànuls, etc.), capaç de mesurar, de forma ràpida i sensible, múltiples paràmetres de manera simultània. Es poden fer diversos estudis citomètrics, un d'aquests és la citometria de fluorescència.

La classificació de cèl·lules per fluorescència (Fluorescence-activated cell-sorting, FACS) és un tipus especialitzat de citometria de flux. Proveeix d'un mètode per classificar una barreja heterogènia de cèl·lules en dos o més tubs, basant-se en la recepció dels sensors de les característiques fluorescents de cada cèl·lula. És un útil instrument científic que permet classificar les cèl·lules de manera ràpida, objectiva i quantitativa segons els senyals fluorescents registrats en diferents compartiments físics.



Imatge 19: Funcionament del FACS

²⁴ Electrotransferència: mètode que es basa en un corrent elèctric i un tampó de transferència per portar les proteïnes des del gel cap a la membrana.

Imatge 16: <https://goo.gl/TVUikL>

Imatge 17: <https://es.wikipedia.org/wiki/Electroporaci3n>

Imatge 18: <https://bit.ly/1LsVqQ3>

Imatge 19: <https://tinyurl.com/yc5ymo4n>

“De vegades sentim que el que fem és tan sols una gota en el mar, però el mar seria menys si li faltés una gota”

Maria Teresa de Calcuta

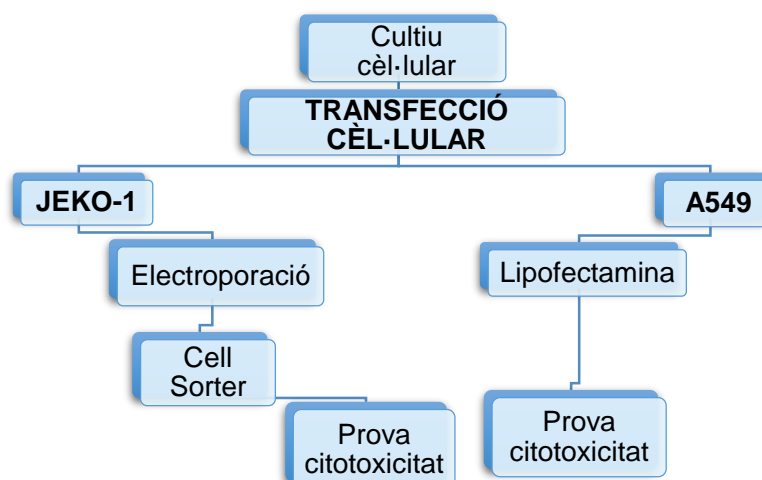
5. EXPERIMENT

En aquest apartat explicarem pas a pas la pràctica feta al laboratori per tal de poder complir els nostres objectius i confirmar o refutar les nostres hipòtesis.

L'experiment es basa en fer una transfecció cel·lular per introduir dins de les cèl·lules un plasmidi que conté la informació per una proteïna específica, el MAL. Nosaltres el que volem saber és si el MAL és el receptor de la toxina Èpsilon ja que si ho és, quan s'ajunten poden matar a la cèl·lula i provocar greus problemes a l'ésser. Agafarem dos tipus de cèl·lules, les JEKO-1 que són limfòcits B i les cèl·lules A549 que són cèl·lules epitelials del pulmó. Les JEKO-1 s'agafen perquè se sap que la toxina afecta als limfòcits i les A549 s'agafen per tenir així dos models diferents de cèl·lules i comprovar que no només depèn solament d'un tipus cel·lular. Després de la transfecció, farem una prova de citotoxicitat on exposarem les cèl·lules a la toxina Èpsilon per comprovar el nostre objectiu i saber si la toxina en entrar en contacte amb una cèl·lula amb MAL fa que aquesta s'inactivi o no. Farem servir els materials i tècniques explicades en l'apartat anterior.

La variable independent de la pràctica és el diferent tipus de cèl·lula amb la proteïna MAL. La variable dependent és la inactivació de la cèl·lula en presència de la toxina i la variable control és la cèl·lula amb només la proteïna GFP.

Esquema general de la pràctica:



5.1 Cultiu cel·lular

Comencem la pràctica el dia 9 de juliol de 2018. Primer de tot farem el cultiu de les cèl·lules que utilitzarem en el nostre experiment.

1- Preparació del cultiu de cèl·lules JEKO-1:

- a. Primer de tot agafem el medi en el qual es desenvolupen les cèl·lules, el medi RPMI²⁵ i l'escalfem una estona a 37° C.
- b. Anem a la campana de flux laminar, agafem un flascó de cultiu i una pipeta (tot estèril), amb la pipeta xuclarem una quantitat de medi i la posem al flascó de cultiu i el tanquem.
- c. Obrim el tanc amb nitrogen líquid que conté les cèl·lules congelades i les descongelem ràpidament posant-les en aigua a 37° C.
- d. Amb una pipeta més petita xuclarem les cèl·lules JEKO-1 descongelades i les posem al flascó de cultiu i barregem un mica.
- e. Posem el flascó a l'incubador i esperem 2 dies perquè les cèl·lules creixin.



Imatge 20: Medi RPMI



Imatge 21: Flascó amb cèl·lules JEKO-1

2- Preparació del cultiu de cèl·lules A549:

- a. Primer de tot descongelem la tripsina, que és un enzim digestiu, que desenganxa les cèl·lules A549 que estan enganxades a la placa de cultiu, posant-la en aigua a 37° C.
- b. Agafem 3 plaques de cultiu i les posem a la campana extractora, a totes les plaques els hi posem el nom de les cèl·lules que contindran, la data, la dilució i el "pase" (la vegada que es torna a posar en una altra placa per cultivar-les).
- c. Agafem la placa que conté les cèl·lules A549 i li traiem el medi xuclant-ho amb una pipeta connectada al buit, ja que les cèl·lules estan enganxades a la base de la placa.

²⁵ Medi RPMI: medi de cultiu de les cèl·lules.

Imatge 20 i 21: Font pròpia

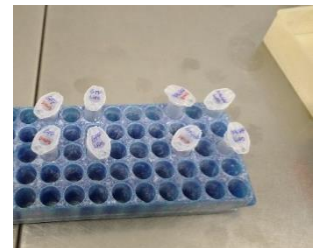
- d. Netegem la placa posant PBS²⁶ (phosphate buffered saline), remenem una mica i xuquem amb el buit. Repetim el procés dos o tres cops.
- e. Posem 1 ml de tripsina²⁷ a la placa de cultiu i remenem una mica perquè les cèl·lules es desenganxin de la base.
- f. Posem 7 ml de medi a cada una de les 3 plaques de cultiu i posem 8 ml de medi a la placa que conté les cèl·lules, de manera que en total hi haurà 9 ml de solució, i barregem una mica.
- g. A cada una de les tres plaques els hi posem 3 ml de solució (que conté les cèl·lules) amb la pipeta, de manera que en cada placa hi ha 10 ml de solució.
- h. Barregem una mica i deixem les plaques a l'incubador i esperem dos dies perquè creixin.

5.2 Transfecció cel·lular

El dia 11 de juliol observem que les cèl·lules han crescut el suficient per poder fer la transfecció i incorporar el plasmidi desitjat.

Primer de tot fem la transfecció de les cèl·lules A549, que ho hem fet amb el mètode de la lipofectamina ja que aquestes són unes cèl·lules que estan enganxades a la placa. Els passos que hem seguit són:

1. Agafem 4 eppendorfs, en dos d'ells escrivim GFP (green fluorescent protein) ja que farem unes cèl·lules control que només contindran el plasmidi del GFP per veure que no sigui cap altre factor que faci malbé les cèl·lules a part de la proteïna, i en els altres dos escrivim MAL-GFP, que és una proteïna de fusió.



Imatge 22: Eppendorfs amb les substàncies

²⁶ PBS: solució aquosa i salina que serveix per netejar.

²⁷ Tripsina: proteasa que ajuda a desenganxar les cèl·lules de la placa.

Imatge 22: font pròpia

2. En tots els eppendorfs posem 250µl d'Opti-MEM, que és el medi de creixement de les cèl·lules, amb la pipeta automàtica.
3. La concentració del DNA (plasmidi) que conté la informació per sintetitzar la proteïna GFP està en una concentració de 1,62 µg/µl, i com que segons el protocol per cada 250 µl de medi es necessiten 4 µg de DNA, això són 2,46 ml de DNA. Per tant afegim 2,46 ml de DNA de GFP a un dels eppendorf al qual havíem escrit GFP.
4. La concentració del DNA que conté la informació per sintetitzar la proteïna MAL-GFP és de 1,438 µg/µl, i com que també hem d'afegir 4 µg aquests són 2,78 ml. Per tant els afegim a un dels dos eppendorfs que diu MAL-GFP.
5. Als dos altres eppendorfs, un que diu GFP i l'altre de MAL-GFP, hi posem 10 µl de Lipofectamina.
6. Esperem durant 5 minuts.
7. Després dels 5 min, barregem la solució de OptiMem + DNA GFP amb la solució OptiMEM + Lipofectamina i la solució OptiMEM + DNA MAL-GFP amb la solució OptiMEM + Lipofectamina, de manera que només ens queden 2 eppendorfs.
8. Ho deixem durant 20 minuts a temperatura ambient.
9. Agafem l'eppendorf que conté l'OptiMEM + DNA GFP + Lipofectamina, agafem la solució amb una pipeta i la tirem gota a gota sobre un pou que conté les cèl·lules A549. Després agafem la solució que conté l'OptiMEM+ DNA MAL-GFP + Lipofectamina i el tirem sobre un altre pou amb cèl·lules A549.
10. Ho deixem a l'incubador durant aproximadament 24 hores.

Després fem la transfecció de les cèl·lules JEKO-1 mitjançant electroporació.

Els passos que hem seguit són:

1. Agafem el flascó que conté les cèl·lules JEKO-1 i contem quantes cèl·lules hi ha amb la màquina de recompte. El resultat que obtenim és que hi ha 1,65 milions de cèl·lules/ml.
2. Xucllem totes les cèl·lules (10 ml de volum total) amb una



Imatge 23: Cèl·lules JEKO-1 centrifugades

pipeta i les posem en un tub de 15 ml.

3. Centrifuguem les cèl·lules durant 5 minuts per poder-les separar del medi. Un cop separat, amb el la pipeta connectada al buit xucllem tot el medi.
4. Com que està comprovat que per 300 µl es necessiten 1,2 milions de cèl·lules fem una proporció per saber quina quantitat de medi necessitem sabent que nosaltres tenim 16,5 milions de cèl·lules.

$$X = \frac{(16,5 \cdot 10^6) \cdot 300}{1,2 \cdot 10^6} = 4125\mu\text{l} = 4,2 \text{ ml}$$

Per tant, hem obtingut que necessitem 4,2 ml de medi.

5. Agafem 4,2 ml de medi RPMI i el posem amb les cèl·lules i les re-suspenem²⁸.
6. Passem la solució en un flascó.
7. Agafem 300 µl de solució cel·lular i la posem en un eppendorf i 300 µl en un altre.
8. En un dels eppendorfs posem 2,46 µl de DNA GFP i en l'altre 2,78 µl de DNA MAL-GFP i els barregem una mica.
9. Passem tota la solució cel·lular d'un eppendorf en una cubeta d'electroporació i ho col·loquem a la màquina d'electroporació que està programada a 300 volts durant 10 milisegons. Quan s'acaba ho traiem de la màquina i mirem que hi hagi una escuma que és un indicador que l'electroporació és correcta. Després ho traiem de la cubeta i ho posem en un flascó amb medi RPMI i ho col·loquem a l'incubador.
10. Fem el mateix amb l'altre eppendorf. Al fer servir aquesta tècnica aconseguim que els plasmidis que hi ha a l'exterior de la cèl·lula entrin al citoplasma.



Imatge 24: Cubeta d'electroporació

5.3 Seguiment de la transfecció

El dia 12 de juliol observem els dos tipus de cèl·lules al microscopi invertit i obtenim els següents resultats:

²⁸ Re-suspendre: barrejar.

Imatge 24 i 25: Font pròpia

A549:

- Cèl·lules amb GFP → S'han transfectat i es veuen molt bé amb la fluorescència.
- Cèl·lules amb MAL GFP → S'han transfectat i es veuen molt bé amb la fluorescència , hi ha cúmuls de cèl·lules
- Cèl·lules no transfectades → No es veu res fluorescent.

JEKO-1:

- Cèl·lules amb GFP → S'han transfectat molt poc, gairebé no es veuen cèl·lules amb la fluorescència.
- Cèl·lules amb MAL GFP → S'han transfectat molt poc, gairebé no es veuen cèl·lules amb la fluorescència.

Després hem deixat les JEKO-1 a l'incubador ja que al dia següent els hi canviarem el medi i els hi posarem l'antibiòtic Geneticina ja que les que s'hagin transfectat seran resistents i no moriran perquè l'ADN inserit en la cèl·lula conté informació per l'antibiòtic. D'aquesta manera farem una selecció de les cèl·lules transfectades.

A les A549 els hi hem canviat el medi i els hi hem posat la geneticina que és conegut comunament com G-418, el reactiu Geneticin és un aminoglucòsid²⁹ i s'utilitza comunament com a agent selectiu de cèl·lules eucariotes.



Imatge 25: Geneticina

Per fer-ho hem seguit els següents passos:

1. Xucllem el medi en el qual estan les cèl·lules amb la pipeta connectada al buit.
2. Amb la pipeta automàtica posem medi RMPI + Geneticina a les cèl·lules.
3. Deixem les cèl·lules a l'incubador.

²⁹ Aminoglucòsid: un tipus d'antibiòtic utilitzats principalment com a bactericides.
Imatge 26: <http://www.thermofisher.com/order/catalog/product/10131035>

El dia 13 de juliol fem el canvi de medi de les cèl·lules JEKO-1 i els hi posem la Geneticina. Es segueixen els passos següents:

1. Amb la pipeta posem tota la solució cel·lular a un tub.
2. Ho posem a la centrifugadora i ho centrifuguem i separem el medi de les cèl·lules.
3. Xuquem el medi que s'ha separat.
4. Posem medi nou RMPI + Geneticina, barregem una mica i ho posem en un flascó.
5. Deixem les cèl·lules a l'incubador.

Després, el dia 16 de juliol tornem a mirar les cèl·lules al microscopi invertit i observem el següent:

A549:

- Cèl·lules amb GFP → Es veuen molt bé amb la fluorescència i veiem que s'han transfectat. La fluorescència es veu en el nucli.
- Cèl·lules amb MAL GFP → Es veuen molt bé amb la fluorescència i veiem que s'han transfectat. La fluorescència es veu en la membrana plasmàtica. Hi ha cèl·lules mortes.

JEKO-1:

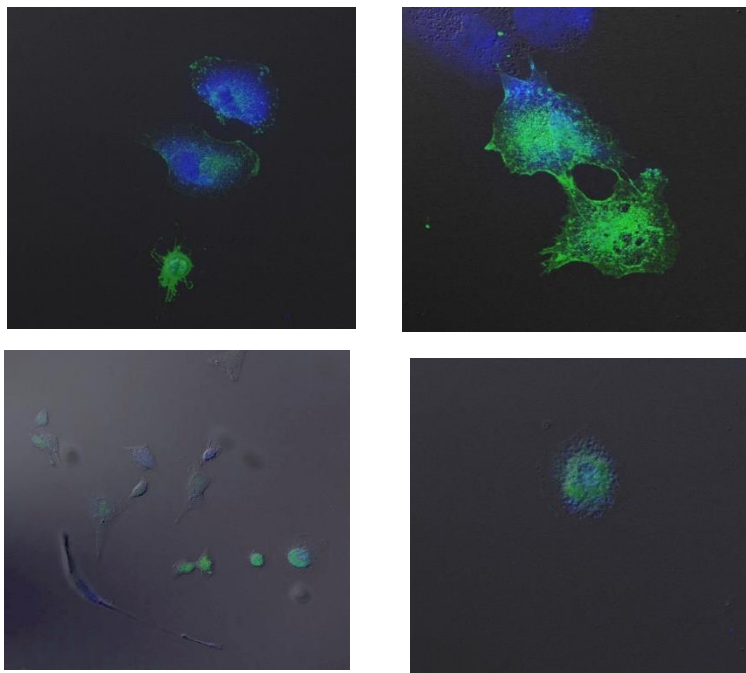
- Cèl·lules amb GFP → Es veuen algunes cèl·lules amb fluorescència
- Cèl·lules amb MAL GFP → Quasi bé no es veuen cèl·lules amb fluorescència. Hi ha cèl·lules mortes flotant.

Després hem fet un canvi de medi a les cèl·lules A549 i la meitat de les cèl·lules amb GFP les hem posat en un altre pou i la meitat de les MAL GFP també i totes les hem posat a l'incubador.

Al dia següent, 17 de juliol, hem decidit mirar les cèl·lules A549 al Microscopi Confocal perquè aquestes són cèl·lules que s'adhereixen al recipient de cultiu i per tant són fàcils de veure. Per poder-les mirar, primer hem de fixar les cèl·lules, per fer-ho hem seguit els passos següents:

1. Posem el cultiu cel·lular en uns quants pous un cobreobjectes a l'interior.
2. Posem un mil·lilitre de Formol en cada pou per fixar les cèl·lules.
3. Al cap d'una estona fem un rentat dels pous amb PBS, rentem 2 cops i posem PBS un tercer cop.
4. Posem un microlitre de colorant To Pro 3 que es un colorant que reconeix el nucli de les cèl·lules.
5. Esperem 10 min.
6. Fem 3 rentats amb PBS i tornem a posar PBS.
7. Agafem un portaobjectes i li posem una gota de Fluoromount³⁰ i enganxem el cobreobjectes a sobre.
8. Esperem una estona.
9. Anem al microscopi a veure les mostres.

Aquestes són algunes de les cèl·lules que hem pogut observar, hem vist que hi ha cèl·lules que manifesten molt el GFP i altres menys.



Imatge 26: Resultat de les cèl·lules A549 al Microscopi Confocal

Els diferents colors que podem veure en les fotos simbolitzen el següent: el color blau ens identifica el nucli de les cèl·lules i el color verd és la proteïna GFP que ens confirma que la cèl·lula expressa la proteïna que nosaltres volíem.

³⁰ Fluoromunt: medi que serveix per enganxar el cobreobjectes al portaobjectes.

Imatge 27: Font pròpia

Lavors, el dia 23 de juliol tornem a mirar les cèl·lules amb el microscopi de fluorescència normal. Obtenim els següents resultats:

A549:

- Cèl·lules amb GFP → Estan crescudes però no es veuen moltes cèl·lules amb fluorescència. La fluorescència es veu en el nucli.
- Cèl·lules amb MAL GFP → Estan crescudes i la fluorescència es veu en la membrana plasmàtica. Hi ha moltes cèl·lules mortes.

JEKO-1:

- Cèl·lules amb MAL GFP → Estan bastant crescudes però es veuen poques cèl·lules amb fluorescència. Hi ha moltes cèl·lules mortes flotant.
- Cèl·lules amb GFP → Estan crescudes, es veuen algunes cèl·lules amb fluorescència, hi ha cèl·lules mortes.

Canviem el medi a les cèl·lules i deixem que creixin.

Una setmana després, el 30 de juliol, preparem les cèl·lules JEKO-1 per poder fer una selecció de les cèl·lules segons la quantitat de fluorescència que contenen, per fer aquesta selecció ho fem mitjançant una màquina anomenada Cell Sorter. Per preparar les cèl·lules seguim els següents passos:

1. Preparem el tampó³¹ en el qual posarem les cèl·lules, el tampó ha de ser 50 ml de PBS+ BSA³² 0,5 % + 2 mM EDTA³³ (0,5 molar). Fem els càlculs de quant BSA i quant EDTA hem de posar.

$\frac{100}{0,5} = \frac{50}{x} \rightarrow x = \frac{0,5 \cdot 50}{100} = 0,25 \text{ g BSA}$ (com que el BSA està a 0,5% vol dir que per cada 100ml hi ha 0,5 g de BSA per tant com nosaltres necessitem 50 ml fem proporció).

$$\frac{0,5 \text{ M}}{0,002 \text{ M}} = \frac{50 \text{ ml}}{x} \rightarrow \frac{50 \cdot 0,002}{0,5} = 0,2 \text{ ml EDTA}$$

2. Pesem la quantitat de BSA que necessitem.
3. Agafem 2 tubs de 50 ml i posem 30 ml de PBS en un d'ells.

³¹ Tampó: solució utilitzada per diluir substàncies.

³² BSA: proteïna que s'utilitza com a nutrient pels cultius cel·lulars.

³³ EDTA: àcid que serveix com a anticoagulant.

4. Posem els 0,5g de BSA i 0,2 ml de EDTA en el tub que conté PBS i barregem.
5. Filtrem la solució i la posem a l'altre tub i l'omplim de PBS fins als 50 ml i ja tenim el tampó preparat.
6. Després fem un recompte de les cèl·lules i obtenim que:
GFP → $9,18 \cdot 10^5$ cells/ml i MAL GFP → $6,42 \cdot 10^5$ cells/ml
7. Agafem 2 tubs de 15 ml i posem les cèl·lules JEKO-1 amb GFP en un tub les JEKO-1 MAL GFP en l'altre tub.
8. Les centrifuguem durant 5 minuts i després xuquem el medi.
9. Posem 5 ml de tampó PBS en cada tub, resuspenem i tornem a centrifugar durant 5 minuts.
10. Xuquem el PBS i posem 1,5 ml de PBS nou al tub de MAL GFP i 2,1 ml de PBS en el tub de GFP i resuspenem.
11. Ho portem al Cell Sorter.

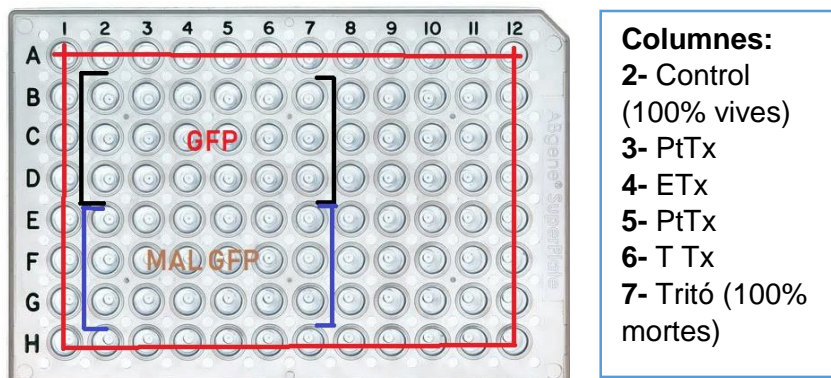
Un cop separades les cèl·lules les posem en tubs de 15ml amb medi RPMI, les deixem a l'incubador uns dies i llavors les congelem.

5.4 Prova de citotoxicitat

El dia 4 de setembre descongelem les cèl·lules i els hi canviem de medi, fem les sevir les cèl·lules amb més fluorescència. Fem una primera prova de citotoxicitat i el dia següent la tornem a fer-la. Per fer-ho hem seguit els següents passos:

1. Comencem amb les cèl·lules JEKO-1, fem un recompte de cèl·lules.
GFP → $2,09 \cdot 10^6$ cells/ml
MALGFP → $2,02 \cdot 10^6$ cells/ml
2. Agafem 1,5 ml de solució cel·lular amb GFP i la posem en un tub i de MAL GFP en un altre tub.
3. Centrifuguem durant 5 minuts.
4. Xuquem el medi i posem 3 ml de medi nou en cada tub.
5. Agafem una placa de 96 pous i, en 18 pous posem 100 µl de solució cel·lular amb GFP i en 18 més 100 µl cultiu cel·lular MAL GFP.
6. Deixem incubar durant uns minuts.

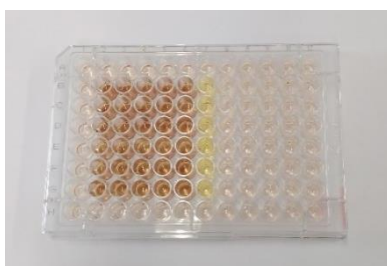
7. Agafem també la placa que conté les cèl·lules A549 ja posades en una placa de 49 pous igual que les altres.
8. Posem les toxines d'aquesta manera:



Imatge 27: Disposició de les cèl·lules amb les toxines

La Etx la posem en la quarta columna i a la tercera, cinquena i sisena posem altres toxines control. A la segona no hi posem res i a la setena posem el tritó, detergent que mata les cèl·lules

9. Deixem a l'incubador durant 1 hora.
10. Després d'1 hora afegim el reactiu MTS³⁴. Així és com queda la placa:



Imatge 28: Estat de les cèl·lules després de posar el reactiu MTS

11. Al cap de 15 min llegim la placa de cèl·lules A549 amb el lector d'absorbància. Una font de llum il·lumina la mostra amb una longitud d'ona específica i es calcula la absorció. Com més petit sigui el valor vol dir que hi ha menys absorció de manera que menys cèl·lules vives.

El dia 17 de setembre vàrem fer un Western Blot amb cèl·lules que havíem congelat a principis d'agost per poder comprovar que si realment les cèl·lules havien expressat o no la proteïna que nosaltres volíem i com que ja teníem els resultats de la prova de citotoxicitat era una manera de confirmar els resultats que havíem obtingut.

³⁴ MTS: reactiu que serveix per mesurar la quantitat de cèl·lules actives.
Imatge 28 i 29: Font pròpia

5.5 Resultats de l'experiment

Cèl·lules JEKO-1

Resultats de la prova de citotoxicitat feta per primer dia després de 3 hores d'incubació de les cèl·lules amb les toxines.

	Control	pEtx	Etx	T-X100
GFP	0,581	0,567	0,555	0,157
	0,557	0,577	0,549	0,197
	0,557	0,56	0,541	0,152
MAL-GFP	0,532	0,542	0,29	0,151
	0,519	0,552	0,272	0,161
	0,551	0,535	0,271	0,154

Taula 1: Resultats lector absorbància

Valors absoluts				
	Control	pEtx	Etx	T-X100
GFP	0,412	0,398	0,386	-0,011
	0,388	0,408	0,380	0,028
	0,388	0,391	0,372	-0,016
MAL-GFP	0,376	0,386	0,134	-0,004
	0,363	0,396	0,116	0,005
	0,395	0,379	0,115	-0,001

Taula 2: Resultats valors absoluts

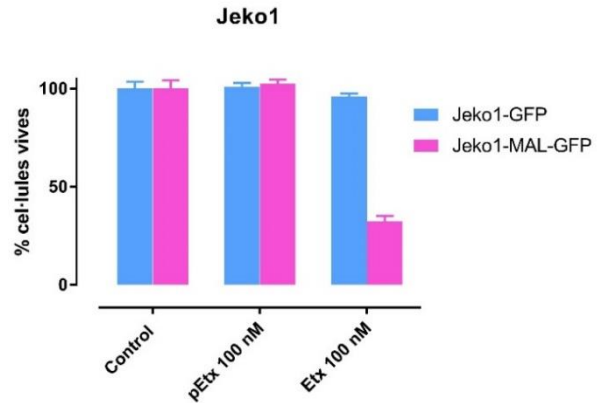
% de llum absorbida			
	Control	pEtx	Etx
GFP	104,037	100,504	97,477
	97,981	103,028	95,963
	97,981	98,738	93,944
MAL-GFP	99,471	102,113	35,563
	96,038	104,753	30,809
	104,489	100,264	30,545

Taula 3: % d'absorbància

	Control	pEtx	Etx
Mitjanes % GFP	100	100,756	95,794
SD % GFP	3,496	2,155	1,772
Mitjanes % MAL-GFP	100	102,376	32,306
SD % MAL-GFP	4,250	2,256	2,823

Taula 4: Mitjanes del % d'absorbància

Valors pel gràfic		
	GFP	MAL-GFP
Control	100	100
pEtx	100,756	102,376
Etx	95,794	32,306



Gràfic 1: Resultats prova citotoxicitat JEKO-1-Primer dia

Aquests són els resultats obtinguts en el lector d'absorbància del primer dia de la prova de citotoxicitat, en el primer quadre podem veure els valors d'absorció de les cèl·lules amb GFP i MAL-GFP quan les exposem a les diferents toxines, al tritó i el control. Com podem veure al tritó és on tenim els valors més baixos ja que aquest és un detergent que mata les cèl·lules per tant no hi ha absorbtència o és molt baixa. D'altra banda podem veure que en el control i amb la pEtx és on tenim els valors més alts de manera que veiem que la pEtx no afecta a les cèl·lules. En el cas de l'Etx podem veure que amb les cèl·lules que contenen el GFP els valors són relativament alts però amb les cèl·lules amb MAL-GFP els valors són bastant baixos per tant menys absorbtència, i això vol dir que hi ha més cèl·lules mortes.

Després fem la mitjana dels valors obtinguts amb el tritó per seguidament poder-lo restar a tots els valors, tal com es veu a la taula dos, de manera que obtenim els resultats absoluts, és a dir, els valors que s'obtindrien restant l'absorbància deguda al fons que produeix la pròpia tècnica. Seguidament, fem la mitjana dels valors absoluts en cada cas i la desviació estàndard per poder veure l'error que hi pot haver entre els diferents valors. Després fem el percentatge de llum absorbida en tots els casos, la taula tres, i tot seguit a la taula quatre fem les mitjanes dels percentatges i la desviació estàndard dels percentatges per tal de poder fer un gràfic posteriorment.

En el gràfic podem observar que en el control el percentatge de cèl·lules vives és del 100% i en el cas de la de la pEtx que és una altra toxina i serveix també de control veiem que són bastant alts de manera que no afecta a les cèl·lules. En la Etx veiem que les cèl·lules que contenen el MAL més de la meitat moren i les que només contenen el GFP sobreviuen gaire bé totes.

Resultats de la prova de citotoxicitat feta el segon dia després de 6 hores d'incubació de les cèl·lules amb les toxines

	Control	pEtx	Etx	T-X100
GFP	1,517	1,476	1,449	0,308
	1,409	1,439	1,364	0,302
	1,408	1,44	1,464	0,303
MAL-GFP	1,579	1,513	0,599	0,289
	1,554	1,567	0,563	0,29
	1,493	1,529	0,587	0,304

Taula 1: Resultats lector absorbància

Valors absoluts				
	Control	pEtx	Etx	T-X100
GFP	1,213	1,171	1,144	0,004
	1,104	1,134	1,059	-0,002
	1,104	1,135	1,159	-0,001
MAL-GFP	1,285	1,218	0,304	-0,005
	1,259	1,272	0,268	-0,004
	1,198	1,234	0,292	0,009

Taula 2: Resultats valors absoluts

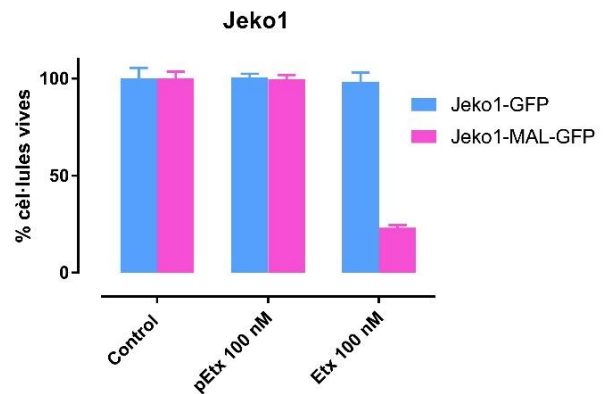
% de llum absorbida			
	Control	pEtx	Etx
GFP	106,343	102,747	100,380
	96,872	99,503	92,926
	96,784	99,590	101,695
MAL-GFP	102,965	97,675	24,418
	100,961	102,003	21,533
	96,072	98,958	23,457

Taula 3: % d'absorbància

	Control	pEtx	Etx
Mitjanes % GFP	100	100,613	98,333
SD % GFP	5,493	1,848	4,729
Mitjanes % MAL-GFP	100	99,545	23,136
SD % MAL-GFP	3,545	2,223	1,469

Taula 4: Mitjanes del % d'absorbància

Valors pel gràfic		
	GFP	MAL-GFP
Control	100	100
pEtx	100,613	99,545
Etx	98,333	23,136



Gràfic 2: Resultats prova citotoxicitat JEKO-1- Segon dia

El segon dia tornem a fer la prova de citotoxicitat i fem les mateixes taules i observem que obtenim valors molt més alts que el dia anterior en tots els casos, tot i això els valors de la Etx segueixen sent baixos en les cèl·lules amb MAL-GFP.

En el gràfic podem veure resultats molt similars als del dia anterior però en aquest veiem que el percentatge de cèl·lules vives amb MAL-GFP amb la Etx és encara més baix que el dia anterior i la supervivència de les cèl·lules amb la pEtx és màxima i en el cas de la Etx les que contenen només el GFP també sobreviuen totes.

Cèl·lules A549

Resultats de la prova de citotoxicitat feta el segon dia després de 15 minuts d'incubació de les cèl·lules amb les toxines.

	Control	pEtx	Etx	T-X100
GFP	0,767	0,724	0,681	0,179
	0,739	0,768	0,608	0,185
	0,709	0,707	0,687	0,17
MAL-GFP	0,616	0,691	0,681	0,181
	0,643	0,653	0,713	0,175
	0,618	0,64	0,663	0,174

Taula 1: Resultats lector absorbància

Valors absoluts				
	Control	pEtx	Etx	T-X100
GFP	0,589	0,546	0,503	0,001
	0,561	0,590	0,430	0,007
	0,531	0,529	0,509	-0,008
MAL-GFP	0,439	0,514	0,504	0,004
	0,466	0,476	0,536	-0,001
	0,441	0,463	0,486	-0,002

Taula 2: Resultats valors absoluts

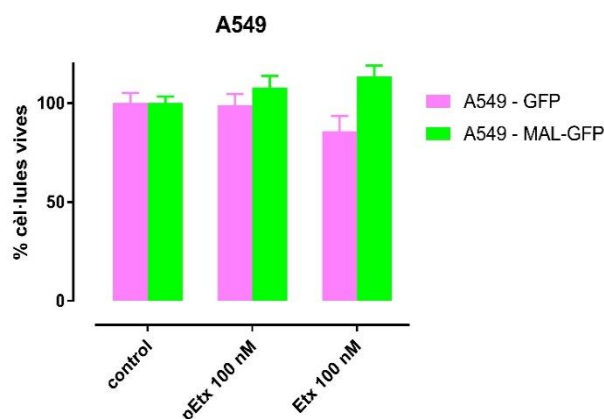
% llum absorbida			
	Control	pEtx	Etx
GFP	105,116	97,442	89,768
	100,119	105,294	76,740
	94,765	94,408	90,838
MAL-GFP	97,847	114,550	112,323
	103,860	106,087	119,450
	98,292	103,192	108,314

Taula 3: % d'absorbància

	Control	pEtx	Etx
Mitjana % - GFP	100	99,04819	85,782
SD % GFP	5,176	5,618	7,849
Mitjana % - MAL-GFP	100	107,943	113,363
SD % MAL-GFP	3,350	5,902	5,640

Taula 4: Mitjanes del % d'absorbància

Valors pel gràfic		
	GFP	MAL-GFP
Control	100	100
pEtx	99,04819	107,9436
Etx	85,78227	113,363



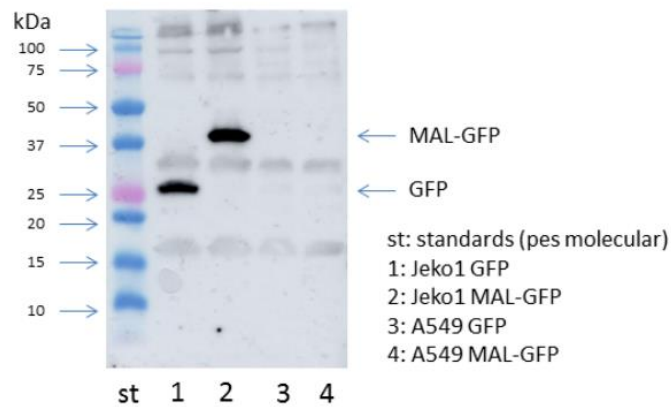
Gràfic 3: Resultats prova citotoxicitat A549- Segon dia

Aquests són els resultats que es van obtenir de la prova de citotoxicitat el segon dia amb les cèl·lules A549, es van fer les mateixes taules de resultats que amb les cèl·lules JEKO-1, podem veure que en el trítol és on trobem els valors més baixos ja que no hi ha absorbància perquè les cèl·lules moren en canvi tots els altres valors són molt similars, els resultats de la pEtx són molt similars al del control i els de Etx en cèl·lules amb GFP són una mica baixos però amb les cèl·lules amb MAL-GFP són molt alts, per tant això vol dir que la gran majoria de cèl·lules sobreviuen i no moren. De manera que podem veure que les cèl·lules amb la proteïna GFP i MAL-

GFP qual se'ls exposa a la toxina Èpsilon la seva supervivència millora ja que en lloc de morir hi ha més proliferació de les cèl·lules.

El resultat del Western Blot que es va fer el dia 17 de setembre és el següent:

Tal com podem veure les cèl·lules JEKO-1 amb GFP i MAL-GFP apareixen amb una banda negra la qual confirma que expressen la proteïna en canvi en les cèl·lules A549 aquestes bandes negres no apareixen de manera que això ens confirma que no expressen les proteïnes.



Imatge 29: Resultats Western Blot

"Lo importante es no dejar de hacerse preguntas"

Albert Einstein

6.EI CRISPR-CAS9:UNA NOVA EINA D'EDICIÓ GENÈTICA PEL FUTUR

En aquest apartat s'explica el CRISPR-CAS9 com una nova eina d'edició genètica pel futur. Mitjançant dues entrevistes fetes al Doctor Joan Blasi i a la Doctora Begoña Aran s'expliquen els avantatges i inconvenients d'aquesta nova tècnica, l'ús que ha tingut fins ara i possibles usos que pot tenir en el futur. També s'explica quina importància pot tenir aquesta tècnica en el futur comparant-la amb les tècniques actuals i finalment s'explica els problemes ètics que pot generar.

En Joan Blasi és Catedràtic de la Universitat de biologia cel·lular i professor de biologia cel·lular a la Universitat de Barcelona del Campus Bellvitge.

La Begoña Aran és Doctora en Ciències Biològiques per la Universitat Autònoma de Barcelona. Va treballar en el laboratori de fecundació in vitro de l'Institut Universitari Dexeus des de 1986 fins a 2007. Va ser coordinadora del Banc de Línies Cel·lulars del Centre Medicina Regenerativa de Barcelona (CMRB) des de 2007 fins a 2010. Actualment, està treballant en el CMRB en un projecte europeu.

Les preguntes que jo he fet a aquests dos experts, per tal de poder assolir els objectius del meu treball i poder afirmar o refutar les meves hipòtesis, són les següents:

- 1. Què és exactament el CRISPR-CAS9?**
- 2. Quins avantatges té respecte a les tècniques actuals?**
- 3. I els inconvenients?**
- 4. Ha tingut alguna utilitat en persones, fins ara?**
- 5. Èticament correcte l'ús d'aquesta tècnica? Fins quin punt es poden utilitzar aquestes tècniques?**
- 6. Què diu la llei sobre la biotecnologia a Espanya?**
- 7. En el futur serà capaç de substituir les tècniques actuals d'edició genètica?**

6.1 Situació actual del CRISPR-CAS9

Tal i com hem explicat en la part teòrica d'aquest treball el CRISPR-CAS9 és un sistema dels bacteris per defensar-se a través d'una seqüència que tenen a l'ADN que poden reconèixer les seqüències estranyes dels virus i llavors en atacs successius poder matar o desfer aquests virus. Quan un virus entra al bacteri, aquests poden reconèixer l'ADN d'aquest virus com a estrany i després poden atacar i seccionar l'ADN d'aquest virus perquè no pugui atacar el bacteri. Es va aprofitar aquest sistema al laboratori per utilitzar-ho en cèl·lules eucariotes i d'aquesta manera poder fer edicions genètiques. El CRISPR-CAS9 va ser descobert al 1987 però només fa sis anys, en el 2012, es va descobrir que es podia editar l'ADN amb aquesta tècnica.

Gràcies el que hem van explicar els experts sabem que els avantatges que té el CRISPR-CAS9 respecte les tècniques actuals d'edició gènica són que aquesta és una tècnica molt més precisa que les tècniques actuals perquè aquesta nova tècnica permet tallar la seqüència d'ADN per llocs més específics i més concrets. A més a més, aquesta tècnica és molt més econòmica ja que es necessiten molt pocs diners per poder-la dur a terme, també és una tècnica més fàcil d'utilitzar si un sap fer-la bé i coneix com funciona el tema i, finalment és més ràpida si ho comparem amb les tècniques actuals.

Tot i que té tots els avantatges que hem comentat també trobem alguns inconvenients en aquesta tècnica. El primer inconvenient seria que com la seqüència del CRISPR està adjunta amb un enzim que és la nucleasa, l'encarregada de tallar l'ADN, a vegades aquesta nucleasa pot no funcionar bé i tallar una altra seqüència que s'assembla a la qual nosaltres vulguem tallar. *“No és el mateix tenir unes cèl·lules a la placa de petri a les quals els hi fas el CRISPR i no surt i no passa res perquè són unes cèl·lules però amb éssers vius és molt diferent”*³⁵. A més, el fet que no es talli la seqüència correcta d'ADN pot produir diverses mutacions no desitjades ja que un cop s'ha tallat l'ADN algunes cèl·lules animals tenen els seus mecanismes de reparació dels talls i poden reparar-se bé i d'altres vegades no es repara i pot provocar altres problemes, en canvi les línies cel·lulars els hi costa molt més poder-se reparar elles mateixes. Després, també s'ha d'anar en compte que quan es

³⁵ Frase dita pel Doctor Joan Blasi durant l'entrevista.

repara un gen, que produeix qualsevol substància que provoca alguna malaltia, no fem malbé algun altre gent apropiat i que sigui bo.

Fins ara, aquesta tècnica s'ha mantingut només a nivell experimental, és a dir, no s'ha fet servir en humans *in vivo* per tractar cap malaltia, el que si que s'ha fet, segons un article, és que a la Xina s'estan fent diversos assaigs en humans per curar diversos tipus de càncers i el VIH tot i que encara no s'han publicat els resultats. El que es fa és extreure les cèl·lules d'una persona del sistema immunològic i reprogramar-les perquè siguin capaces de trobar i atacar tumors. “També hi ha altres empreses i companyies que estan en fase de començar diversos assaigs per aplicar el CRISPR als humans per trobar cura a la β -Talasèmia, com CRISPR Therapeutics”³⁶. Aquests assaigs es fan de manera *ex vivo*, és a dir, es treuen les cèl·lules dels humans se'ls aplica la tècnica per corregir-les i llavors es tornen a posar en el pacient. No es fa de manera *in vivo* ja que podria tenir més riscos perquè injectar CRISPR directament en el flux sanguini d'una persona podria causar reaccions immunes.

Un cop sabem les avantatges i inconvenients d'aquesta nova tècnica ens qüestionem si aquesta podrà ser tan potent que podrà arribar a substituir en el futur les actuals tècniques d'edició genètica, doncs segons un dels experts aquesta tècnica no ho podrà fer ja que serveix per casos molts específics i molts dels casos es podran fer servir les altres tècniques més fàcilment ja que aquestes són més efectives. De manera que no podem generalitzar-la ja que només serà per uns certs casos i les malalties que primer s'intentaran tractar seran les malalties immunogèniques, tot i això és optimista i creu que segurament hi haurà avenços d'aquí uns anys.

En canvi, l'opinió de l'altre l'expert és diferent ja que diu que és molt possible que el CRISPR-CAS9 pugui substituir les tècniques actuals ja que té bastant avantatges i totes les malalties d'edició genètica seran molt més fàcils de tractar amb aquesta tècnica i creu que tot i que encara no és molt específica en el futur segur que ho serà ja que s'estan fent moltes investigacions sobre el tema ja que si comparem el temps que es porta investigant-lo i tot el que ja se sap és molt més curt que el temps que es trigar en les altres tècniques.

³⁶ Fragment extret de: <https://www.technologyreview.es/s/9943/la-primera-prueba-humana-con-crispr-fuera-de-china-es-inminente>

A més, segons uns articles publicats el mes de juliol d'aquest mateix any on el Dr. Francisco Juan Martínez Mojica, conegut per ser un dels primers en parlar i fer contribucions per descriure la tècnica CRISPR, ens explica que fins ara el CRISPR ha fet grans avenços en el camp de l'edició genètica. També explica que fins ara s'han modificat cèl·lules de bacteris, animals, en els quals s'ha tractat la sordesa i la ceguesa, i a l'agricultura també s'han aconseguit crear plantes amb millores en el qualitat del producte. De cara al futur diu que gràcies aquesta tecnologia podrem ser donants universals i que es podran curar moltes malalties genètiques com càncer, diabetis o fibrosis quística. En el cas dels humans com ja hem dit abans s'estan fent assaigs i encara no hi ha resultats però els científics són molt optimistes en que aquesta tècnica revolucionarà l'edició genètica.

6.2 CRISPR-CAS9 i ètica

Quan parlem del CRISPR-CAS9 és important parlar de l'ús ètic d'aquesta tècnica. Actualment, a Espanya la llei de la biotecnologia vigent és la 14/2007 i alguns dels punts més importants d'aquesta llei diuen que tots procediments que es duguin a terme s'han de fer amb totes les garanties i prendre totes les mesures amb seguretat. També diu que per dur a terme qualsevol anàlisi genètic s'ha de demanar consentiment al voluntari i garantir que els resultats siguin confidencials, després diu que es prohibeix la constitució preembrions i embrions humans amb la finalitat de fer experiments però si que permet obtenir cèl·lules mare embrionàries per fer investigació i també es permet experimentar amb embrions sobrants de les tècniques de reproducció assistida, sempre i quan els progenitors donin permís. A més, prohibeix explícitament la clonació humana però permet la clonació terapèutica.

Un altre punt a destacar és que la llei diu que s'ha d'assegurar el principi d'integritat de les persones i la protecció de la dignitat i identitat de l'ésser humà. Finalment, la llei estableix el dret a no ser discriminat, el deure de confidencialitat, el principi de gratuïtat en les donacions de material biològic i el deure de garantir els estàndards de qualitat i seguretat en els experiments realitzats amb éssers humans, teixits i embrions.

Per tant, aquesta llei permetria fer servir el CRISPR però els científics i experts creuen que s'ha de fer una avaluació cas per cas. En el cas de reparar alguna malaltia en embrions és podria fer perfectament, en el moment que la tècnica estigui a punt per poder fer aquests tipus de tractaments, però segons la llei vigent en el nostre país s'hauria de demanar permís a la "Comisión Nacional de Reproducción Asistida" qui és la que autoritza l'ús d'aquestes tècniques en els embrions. Si es vol fer qualsevol altre teràpia o experiment amb animals o humans sempre s'ha de demanar permís als comitès ètics i aquests comitès es miren molt acuradament tot el procediment que es vol dur a terme i després decideixen donar permís o no, ja que en aquests comitès hi ha gent d'hospitals, protectores d'animals, gent de la Generalitat, etc. Ells es miren que el que es faci sigui per una bona causa i que sigui per investigar algun tipus de malaltia o millora per la salut de les persones. Un cop s'obté el permís ja es pot dur a terme l'experiment. Quan es treballa amb cèl·lules no cal demanar permís ja que aquestes no es consideren organismes que puguin patir però sempre que es vulgui treballar amb animals s'ha de demanar permís i passar per tots els comitès.

Finalment, segons els experts l'ús d'aquesta tècnica és èticament correcte sempre i quan es tingui clar que aquesta tècnica és molt segura i que tots els impediments que hi ha actualment estiguin resolts. Sempre i quan s'utilitzi la tècnica en el futur per la cura de malalties i millores en la salut de les persones és clarament ètic. El que no és ètic és que es comenci a utilitzar la tècnica per editar embrions i fer l'anomenat "bebès a la carta" ja que això posa en perill la dignitat de l'ésser humà i provocaria problemes en l'espècie. Tampoc és ètic l'ús abusiu de la tècnica, per exemple a l'agricultura es comença a utilitzar la tècnica per modificar les plantes (millores en la qualitat del fruit) per un guany econòmic ja que es modifiquen les plantes però es fa que siguin estèrils de manera que l'empresa qui produeix les llavors d'aquesta planta obté molts guanys econòmics ja que cada any el pagès els hi ha de comprar les llavors i això és un l'ús de la tècnica per un guany particular i el que seria ètic és que el guany fos per tothom.

7.CONCLUSIONS

En aquest últim apartat del treball es presenten les conclusions finals a les quals s’ha arribat després de realitzar aquest treball de recerca.

Gràcies a la pràctica duta a terme al laboratori de l’UB amb el Doctor Joan Blasi durant el mes de juliol i setembre del 2018 i les entrevistes realitzades a l’octubre he pogut assolir els meus objectius i he pogut validar les meves hipòtesis.

Primer de tot ens fixarem en la primera hipòtesi, que va relacionada amb la nostra pregunta inicial en la qual plantejàvem que el CRISPR en el futur tindrà més avantatges que les tècniques actuals. Aquesta hipòtesi la podem afirmar gràcies a la opinió del dos experts entrevistats. El CRISPR té un gran nombre d’avantatges respecte a les tècniques actuals ja que és més precisa perquè permet tallar les seqüències d’ADN per llocs específics i, a més, és més econòmica i més fàcil d’utilitzar. Tot i això hem vist que de moment per la insuficiència de coneixement d’aplicació d’aquesta tècnica també té alguns inconvenients com per exemple el fet que la nucleasa, que talla l’ADN, pot tallar una seqüència incorrecta i per tant crear una altre problema per l’ésser, o també pot ser que el sistema de reparació de les cèl·lules sigui complicat i que no es reperi correctament i creï una mutació. Per tant, encara s’ha de fer molta investigació per tal de poder millorar totes aquestes imperfeccions. Tot i això, en el futur és molt possible que aquests problemes s’arreglin i per tant aquesta sigui una eina molt útil.

Per això, una gran part dels científics creuen que en el futur aquesta tècnica serà capaç de substituir les tècniques actuals tot i que de moment no sigui gaire útil en les malalties actuals, ho serà molt en el futur ja que hi ha moltes empreses fent investigacions sobre el tema i ja s’ha descobert molt comparant el temps d’investigació d’aquesta tècnica respecte el temps que es va trigar en les altres. En canvi, hi ha altres científics que creuen que de moment té més inconvenients que avantatges i que fins que tots els problemes que crea l’ús d’aquesta tècnica no s’arreglin no es pot assegurar que la tècnica pugui substituir les tècniques actuals.

La segona hipòtesi és sobre la pràctica que vàrem fer al laboratori i plantejàvem que els dos tipus de cèl·lules incorporarien el gen de la proteïna MAL i l'expressarien. Aquesta podem afirmar-la ja que tant les cèl·lules JEKO-1 com les A549 es van transfectar amb èxit amb les dues tècniques utilitzades, l'Electroporació i la Lipofectamina. Al cap d'uns dies de la transfecció vàrem observar que les A549 expressaven millor la proteïna i les JEKO-1 no tant. Després, al posar l'antibiòtic Geneticina vam fer una selecció només d'aquelles cèl·lules que havien incorporat la proteïna MAL. Finalment, les cèl·lules JEKO-1 les vam passar per el Cell Sorter per tenir una selecció només d'aquelles cèl·lules que millor expressaven la proteïna.

En canvi, en el cas de les cèl·lules A549 no els hi vam fer la citometria (passar pel Cell Sorter) perquè com són cèl·lules que estan enganxades a placa és molt difícil aplicar aquesta tècnica. De manera que després quan vam fer la prova de citotoxicitat, moltes d'aquestes cèl·lules havien perdut l'expressió de la proteïna perquè al anar-se dividint cada cop l'expressen menys.

Un cop vàrem tenir confirmada la segona hipòtesi vam utilitzar una sèrie de tècniques per afirmar o refutar la tercera. Necessitàvem saber si el MAL era l'acceptor de la toxina Èpsilon. El MAL s'expressa en la membrana dels oligodendròcits, la mielina i els limfòcits, en el nostre cas vam utilitzar les cèl·lules JEKO-1 que són limfòcits B. Gràcies a experiments previs sabem que la toxina s'uneix a la mielina, als oligodendròcits i volíem confirmar que també s'unia als limfòcits per després confirmar que el MAL és el possible receptor de la toxina. Els resultats de la prova de citotoxicitat van donar positiu amb les cèl·lules JEKO-1 per tant podem afirmar que la toxina s'uneix també als limfòcits i per tant el seu receptor és molt possible que sigui proteïna MAL.

Per altre banda, les A549 són cèl·lules epitelials del pulmó i s'ha vist amb diferents experiments previs que la Etx també afecta al pulmó, per tant era un bon model d'estudi. Però en aquestes, la prova de citotoxicitat va donar negatiu per tant es pot dir que el receptor de la toxina, en aquest cas, no és el MAL. Amb els resultats obtinguts hem observat que quan les cèl·lules amb la proteïna MAL s'exposaven a la toxina, en aquestes hi ha més proliferació de manera que no moren i sobreviuen. És molt possible que aquests resultats no siguin correctes ja que com que aquestes cèl·lules no se'ls va fer la citometria, no es va fer una selecció de les

cèl·lules que millor expressaven la proteïna, i és molt possible que al llarg del temps van anar perdent la fluorescència de manera que es van autoseleccionar les cèl·lules que no presentaven la proteïna MAL-GFP. A més, gràcies al Western Blot hem pogut veure que les cèl·lules a les quals se'ls va fer la prova de citotoxicitat, en el cas de les A549, no presentaven la proteïna.

Per poder comprovar que realment la toxina ajuda la supervivència de les cèl·lules A549 amb el MAL s'haurien de fer més experiments i proves però, per la manca de temps, no hem pogut seguir amb la investigació. A més, per arribar a saber ja definitivament si el MAL és el receptor de la toxina s'haurien de fer algunes proves més que per manca de temps no s'han pogut fer. El coneixement sobre si el MAL és el receptor de la toxina podria ajudar a evitar la mort d'alguns animals de granja ja que ells tenen en el seus intestins un bacteri que és el productor d'aquesta toxina i si aquesta s'ajunta amb el MAL, que també es troba en el cos, les cèl·lules poden morir i causar la mort d'aquest animal. En el cas dels humans, la proteïna es troba en la mielina, que està recobrint les neurones, i si el receptor de la toxina és el MAL podria ser que aquesta toxina fos el possible desencadenant ambiental de l'atac autoimmunitari al sistema nerviós dels malalts d'esclerosi múltiple.

Finalment, valoro molt positivament la realització d'aquest treball ja que he après moltes coses noves que desconeixia que existien i el fet que he tractat un tema que pot ser interessant pel que em vull dedicar en el futur. Vull donar les gràcies al Doctor Joan Blasi per haver-me ajudat i ensenyat les diverses tècniques de laboratori que no podria haver conegut sense la realització d'aquest treball.

*“Be aware of your own worth, use all of your power to achieve it.
Create an ocean from a dewdrop. Do not beg for light from the moon,
obtain it from the spark within you.”*

Muhammad Iqbal (poeta i filòsof persa-urdú)

8.BIBLIOGRAFIA

Fonaments teòrics

- Enginyeria genètica

Teràpia gènica, “Teràpia gènica”. En <<https://terapiagenica.science/>>. Data de consulta: 31 de març de 2018.

Biologia 1, sèrie observa Editorial Santillana, 2016. Data de consulta: 9 de maig de 2018.

Biologia 2, sèrie observa Editorial Santillana, 2016. Data de consulta: 19 d'agost de 2018.

Enciclopedia catalana, “Enginyeria genètica”. En <<https://www.enciclopedia.cat/EC-GEC-0185934.xml>>. Data de consulta: 09 de maig de 2018

Wikipedia, “Vector víric”. En <https://ca.wikipedia.org/wiki/Vector_viric>. Data de consulta: 11 de maig de 2018.

Slideshare, “Enginyeria genètica”. En <https://www.slideshare.net/ConchaComp/enginyeria-gentica?next_slideshow=1>. Data de consulta: 11 de maig de 2018.

Wikipedia, “Transfecció cèl·lular”. En <<https://es.wikipedia.org/wiki/Transfección>>. Data de consulta: 19 d'agost de 2018.

PDF de Dra. Anabel Alvarez Juliá, “Biología cel·lular”. En <<http://www.iib.unsam.edu.ar/archivos/docencia/licenciatura/biotecnologia/2017/BioCel/1502815731.pdf>>. Data de consulta: 19 d'agost de 2018

- CRISPR-CAS9

Dciencia, “Tecnologia Crispr-cas9”. En <www.dciencia.es/que-es-la-tecnologia-crispr-cas9/>. Data de consulta: 12 d'abril de 2018

Wikipedia, “PAM”. En <https://en.wikipedia.org/wiki/Protospacer_adjacent_motif>. Data de consulta: 08 de maig de 2018

Youtube, "CRISPR: Gene editing and beyond". En <<https://www.youtube.com/watch?v=4YKFW2KZA5o&t=89s>>. Data de consulta: 08 de maig de 2018

Scielo, "Llei de la biotecnologia a Espanya". En <http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0210-48062008000300002>. Data de consulta: octubre 2018

Redación mèdica "El objetivo de IBQuaes es avanzar en biomedicina a través de la formación". En <<https://www.redaccionmedica.com/secciones/industria/-el-objetivo-de-ibquaes-es-avanzar-en-biomedicina-a-traves-de-la-formacion--8348>>. Data de consulta: octubre 2018

- Toxina èpsilon i MAL

The Center for Food Security and Public Health, "Toxina èpsilon de Clostridium perfringens". En <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/toxina_epsilon_de_clostridium_perfringens.pdf>. Data de consulta: setembre 2018

Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal, "Toxinas de Clostridium perfringens". En <<http://www.redalyc.org/html/2130/213016781010/>>. Data de consulta: setembre 2018

Tesi doctoral de Jonatan Dorca Arévalo, "Estudi de la unió de la toxina èpsilon de "Clostridium perfringens" a diferents teixits i el seu pas a través de la barrera hematoencefàlica". Data de consulta: setembre 2018

Rumah KR, Ma Y, Linden JR, Oo ML, Anrather J, Schaeren-Wiemers N, et al. (2015) "The Myelin and Lymphocyte Protein MAL Is Required for Binding and Activity of Clostridium perfringens ϵ -Toxin". Data de consulta: setembre 2018

Materials i tècniques

Wikipedia, “Tècnica de la lipofectamina”. En <<https://en.wikipedia.org/wiki/Lipofectamine>>. Data de consulta: 11 de juliol de 2018.

Document UAB, “Transfecció cèl·lular”. En <http://users.df.uba.ar/catalina/TBM/TBM_labo5.pdf>. Data de consulta: 11 de juliol de 2018.

Thermofisher, “Geneticina”. En <<https://www.thermofisher.com/es/es/home/life-science/cell-culture/transfection/selection/g418.html>>. Data de consulta: 18 d’agost de 2018.

Wikipedia, “Microscopi Conocal”. En <https://ca.wikipedia.org/wiki/Microscopi_confocal>. Data de consulta: 18 d’agost de 2018.

Biocompare, “Cell Sorting”. En <<https://www.biocompare.com/8005-Cell-Sorting/24500-Cell-Sorters-Cell-Sorting-Instruments/>>. Data de consulta: 19 d’agost de 2018.

9.ANNEXOS

ANNEX A: Diari de l'estada al laboratori de l'Hospital de Bellvitge

09/07/18:

Primer dia al laboratori de l'hospital de Bellvitge, el doctor Joan Blasi m'ha explicat la pràctica que durem a terme aquests dies. Introduïrem una proteïna dins d'una cèl·lula mitjançant un plasmidi per veure quins canvis produeix. Hem cultivat els dos tipus de cèl·lules que utilitzarem.

11/07/2018:

Segon dia al laboratori. Hem observat el cultiu dels dos tipus de cèl·lules i hem vist que han crescut de manera que hem decidit fer la transfecció. Per un tipus de cèl·lules hem fet servir el mètode de la lipofectamina i per les altres el mètode de l'electroporació.

12/07/2018:

Tercer dia al laboratori. Hem observat les cèl·lules al microscopi invertit per veure si s'han transfectat. Després hem canviat de medi a un tipus de cèl·lules, hem posat un antibiòtic i una professora m'ha ensenyat a fer medi de cultiu de cèl·lules.

16/07/2018:

Hem observat les cèl·lules al microscopi invertit. Hem canviat de medi a unes cèl·lules i el professor ens ha ensenyat algunes tècniques bàsiques de laboratori. He assistit a un seminari d'una noia que està fent el seu treball final de grau.

17/07/2018:

Hem fixat unes cèl·lules per poder-les veure en el confocal que es un microscopi de fluorescència i hem fet fotos a les cèl·lules que es veien millor. Hem fet una altre pràctica amb dos nois que estaven fent el seu treball de recerca.

19/07/2018:

No hem avançat la pràctica ja que el professor no podia estar, he fet una altre pràctica.

23/07/2018:

Hem mirat les cèl·lules en el microscopi de fluorescència i després he fet una altre pràctica amb una altre noia.

30/07/2018:

Per fer una selecció de les cèl·lules que nosaltres volem, les volem separar segons la quantitat de fluorescència que tenen i això ho fem amb una màquina anomenada cell sorter. Primer hem preparat les cèl·lules en un medi per poder-les separar i després les hem separat.

05/09/2018:

Hem fet l'experiment de citotoxicitat per saber si la proteïna MAL reconeix la toxina Èpsilon.

ANNEX B: Entrevistes

Entrevista a Begoña Aran, experta en ètica del Centre de Medicina Regenerativa de Barcelona

Què és exactament el CRISPR-CAS9?

És una tècnica d'edició genètica que consisteix en dues molècules, una proteïna i una guia que en permet tallar la molècula del DNA per on nosaltres volem, el problema no es el tallar sinó el com s'enganxa després que d'això ja no se sap tant de fer-ho tant precisament com realment es vol.

Quins avantatges té respecte a les tècniques actuals?

El CRISPR-CAS9 és una tècnica molt més precisa i permet tallar per llocs més precisos on nosaltres volem i més concrets ja que les altres poden ser més generals, pel que sé, i es pot anar tallant per més llocs del DNA dels que tu vols.

I els inconvenients?

Jo crec que l'inconvenient, ara per ara, és el mètode de reparació d'aquest tall que a vegades pot ser aleatori i no sabem exactament com fer-ho per que sigui exactament com nosaltres volem, o sigui que es pot tallar però després hi ha diferents maneres amb les quals la cèl·lula es repara , i la cèl·lula es tendeix a reparar de manera aleatòria i no sempre es repara de la manera que nosaltres volem i això comporta que el gen que tu vols modificar no es modifiqui bé o que es repari d'una manera incorrecta i per tant no funciona, etc. Quan no es repara bé la cèl·lula pot produir també mutacions.

Ha tingut algun us en persones?

No, en persones in vivo o sigui directament en persones no s'ha fet cap teràpia amb CRISPR. S'ha fet amb cèl·lules humanes a fora de la persona que s'han modificat amb aquesta tècnica i després s'han tornat a posar. S'ha tractat una pacient amb limfòcits però, encara no hi ha resultats escrits.

Èticament és correcte l'ús d'aquesta tècnica?

Jo crec que pot arribar a ser ètic utilitzar aquesta tècnica amb segons quins casos en el moment que tinguem molt clar que és una tècnica molt segura, primer ens hem

d'assegurar que tots aquests impediments tècnics que hi ha estiguin resolts, mentre que no estiguin resolts no podem utilitzar-ho amb humans. Llavors un cop sapiguem que la tècnica és segura i té aquests problemes tècnics resolts hem de veure en quins casos aquesta tècnica pot ser ètica. D'entrada, penso que tots el que sigui curar malalties i millor el benestar de les persones sense fer mal ni a la mateixa persona i a les altres és ètic però clar penso que s'ha de mirar indicació per indicació, cas per cas, en quins casos es podrà fer i en quins casos no em sembla bé fer-ho. Per exemple no em semblaria bé fer CRISPR en embrions per triar els nens per rossos i més guapos o sigui per tractar malalties i tota aquesta sèries de coses sí però sempre i quan tinguem clar que aquesta tècnica és segura i és eficient ja que ara mateix l'eficiència no es bona com per arriscar-nos a tractar un pacient.

En cèl·lules no humanes van tenir eficiència?

Sí, van tenir eficiència però molt baixa i no es el mateix tenir mil cèl·lules i que el CRISPR et resulti com tu vols d'aquestes mil cèl·lules amb vint que seria un 2% i això amb una sèrie de cèl·lules tu pots permetre perquè són cèl·lules però, clar tractat a l'humà de cada cent humans surt bé amb 2, això vol dir que no és eficient. Per tant no és el mateix una eficiència amb unes cèl·lules en un placa de cultiu que quan aquestes cèl·lules ja no són cèl·lules i són persones.

Quina és la llei sobre la biotecnologia a Espanya? Fins quin punt es poden utilitzar aquestes tècniques?

La llei de biotecnologia, la 14/2007, permetria fer servir CRISPR però crec que s'hauria de fer una avaluació cas per cas. Sobre les altres tècniques d'edició s'hauria de mirar exactament la llei. Però se que sobre embrions, la llei no permet fer embrions expressament per fer recerca, es poden utilitzar embrions congelats que es troben en les clíniques de reproducció assistida i que les parelles donen perquè ja no els necessiten, llavors permet fer diagnòstic preimplantacional, és a dir, a vegades es fa una fecundació in vitro per intentar evitar una malaltia de la qual un dels pares o els dos són portadors llavors es fa una fecundació in vitro i s'analitzen els embrions i es mira si és portador de la malaltia que es vol evitar, llavors els embrions que són portadors de la malaltia es descarten i només es transfereixen a la pacient els embrions sans. En aquest cas es podria fer servir el CRISPR amb embrions que tu veus que son malalts i els vols reparar, suposant que la tècnica està

a punt que ara per ara no ho està. Això es podria fer segons la nostra llei però cada cas s'hauria de demanar permís a un organisme que és el que autoritza aquestes tècniques, que és la "Comisión Nacional de Reproducción Asistida".

Cada cop, s'ha de passar per un diagnòstic preimplantacional segons quines malalties determinades, en alguns casos s'ha de demanar permís a la "Comisión Nacional de Reproducción Asistida" però no sempre cal, hi ha malalties que està assumit que es pot fer i depèn de quines has de demanar permís cas per cas per el diagnòstic preimplantacional.

En el futur serà capaç de substituir les tècniques actuals d'edició genètica?

No, jo crec que tindrà unes indicacions molt concretes i que segons en quins casos potser ens pot ajudar a evitar malalties però no és una tècnica que ara per ara estigui per substituir moltes altres, ja és molt més senzill fer un diagnòstic preimplantacional i descartar els embrions que estan malalts i portadors de la malaltia i transferir els sans transferir que no fer edició gènica amb els que estan malalts. En segons quines situacions potser si, no podem generalitzar-la com una tècnica ja que depèn de quina malaltia estiguem parlant, si és una malaltia de la sang o una malaltia que haguem de tractar en l'embrió. El CRISPR serveix per moltíssimes coses diferents teòricament. Una cosa és tractar un pacient adult i una altra cosa és modificar l'embrió, tot depèn. El CRISPR no només serveix per tractar embrions sinó que també serveix també per tractar adults i ja veurem que passa en el futur.

Les malalties que primer es pretendran tractar són les malalties immunogèniques que tinguis molt clar quin gen és el que vols tallar, no malalties que estiguin produïdes per molts gens diferents sinó que saps exactament que un gen és el productor d'una malaltia per exemple en aquest cas si que es podria fer.

Hi ha molta gent actualment treballant i estudiant sobre aquesta tècnica i per tant aniran ràpid i segur que trobaran alguna cosa.

Entrevista a Joan Blasi, Doctor i professor a l'Universitat de Barcelona Campus Bellvitge

Què és exactament el CRISPR-CAS9?

El CRISPR-CAS9, *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*, arrel d'una trobada es va descobrir que els bacteris tenen un sistema per defensar-se a través d'una seqüència que tenen a l'ADN que poden reconèixer les seqüències estranyes dels virus i llavors en atacs successius poder matar o desfer aquests virus. Quan un virus entrava podien reconèixer l'ADN d'aquest virus com a estrany i després poder atacar i seccionar l'ADN d'aquest virus perquè no pogués atacar el bacteris. Aprofitant aquesta característica dels bacteris gent a la indústria va aprofitar per utilitzar aquest sistema per passar-ho a cèl·lules eucariotes, per seccionar o tallar l'ADN en llocs concrets per poder-lo editar, vol dir treure i posar un fragment d'ADN per poder eliminar un gen de manera que per eliminar una proteïna o després evolucionat i també editar l'ADN per afegir una altra proteïna o treure-li un tros o afegir-ne un altre i avui en dia s'esdevé una eina d'edició de l'ADN, edició vol dir modificar l'ADN en llocs concrets que tu desitges per expressar més una proteïna o menys o per modificar-la. Aquesta tècnica és molt més fàcil que les que es fan servir ara, tot així té alguns problemes, no és específic al 100% a no ser que la facis servir molt bé, saber la seqüència exacta, saber que no tens altres llocs amb la mateixa seqüència i coses així.

Quins avantatges té respecte a les tècniques actuals?

És més econòmic, més fàcil i més ràpid, comparat amb les tècniques actuals, i en teoria és molt específic perquè tu el que selecciones són seqüències concretes d'ADN, i l'ADN té la seva pròpia identitat de parelles de bases i si tu li fas aquella llavors només anirà a parar en aquella seqüència que tu li dius el que passa és que a vegades hi ha seqüències que s'assemblen molt o poc i el problema que pot tenir és que al final tu reconeixes la seqüència però li afegeixes un enzim que és una nucleasa que és la que talla l'ADN i aquesta nucleasa a vegades es pot "desmadrar" una mica i llavors pot tallar en llocs que no hauria.

I els inconvenients?

Els inconvenients serien aquests, el fet que la nucleasa pot tallar una mica on vol. Si es fa amb línies cel·lulars que és un tipus de cèl·lula on saps el gen concret que has de tallar i en aquest cas funciona bé i és fàcil, ràpid i econòmic. Hi ha gent que ho ha intentat fer amb éssers vius llavors pot donar algun problema perquè llavors la nucleasa pot tallar en llocs que no toca i no és el mateix tenir una cèl·lula que creix en una placa de petri i si no surt no passa res però amb animals és molt més complex però es fa. Si no controles bé pot arribar a tenir efectes negatius sobre els animals. A més també pot produir mutacions, ja que si tu vols canviar el gen de l'actina i aquest està al costat d'una altre i la nucleasa talla el que està al costat i això pot generar una mutació no desitjada. Un cop tallat el tros d'ADN la cèl·lula pot reparar aquest tall però amb línies cel·lulars a aquestes cèl·lules li costa molt reparar-se ja que tu li has tret un tros que ella no sap exactament com reparar però quan ho fas amb éssers vius si que hi ha mecanismes per poder reparar això i pel que sembla segons diu un article que va sortir l'eficàcia no és del 100% i l'avantatge d'això és que jo no vull modificar un animal jo el que vull fer és revertir una malaltia genètica perquè falta un gen i per tant el poso i si tinc una mutació doncs canvio aquesta mutació perquè sigui viable però clar això es pot fer amb cèl·lules soltes però quan ho fas amb un organisme, s'ha d'anar amb compte ja que quan arregles un gen no es desarregli un altre. Abans de fer una cosa amb humans s'ha d'anar amb molt de compte.

Ha tingut alguna utilitat en persones?

Que jo sàpiga de moment no, s'ha fet a nivell experimental amb cèl·lules amb humans no crec que encara s'hagi utilitzat. Amb animals si que s'ha fet i s'ha modificat i l'avantatge del CRISPR és que si ho fas bé amb animals llavors si que és ràpid. S'han fet amb cèl·lules humanes que s'han extret, s'han editat i després s'han tornat a posar en el cos.

Avui en dia en teràpia genètica amb una persona que té un gen deficient amb una proteïna que és eficient i tu li vols canviar el gen quan aquest gen està amb un tipus de cèl·lules sanguínies tipus leucòcits llavors si que es pot arribar a fer i s'ha fet però quan és un tipus de teixit sòlid això costa molt de fer i de moment em sembla que no s'ha fet. En persones *in vivo* no s'ha fet.

Èticament correcte l'ús d'aquesta tècnica? Fins quin punt es poden utilitzar aquestes tècniques?

És correcte si aporta un bé, està clar que no es correcte si el que fas es per seguir una cosa que moralment no sigui correcta o èticament a mi em sembla molt bé si es pot curar una malaltia no ara però sí en el futur o pot solucionar un problema que pot haver-hi en el nivell de planeta o terra. Això s'ha provat amb altres mètodes per exemple fa anys amb les plantes que es modificaven per un guany econòmic, hi havia companyes que modificaven les plantes i les venien als pagesos, aquestes llavors feien molt bon fruit, no eren atacades per insectes, etc però eren estèrils llavors el pagès tenia un guany econòmic molt efímer i temporal perquè depenia de la companyia que li venia aquestes llavors modificades genèticament i això no està bé ja que s'està sobrepasant la tècnica i si es fa una planta que sigui resistent a una planta fer-la resistent per sempre no només quan tu li hakis de posar un insecticida que li has de comprar a la companyia. I això és l'ús d'una cosa per un profit molt particular seria bo si tu pugessis solucionar problemes però no per afegir-ne de nous perquè hi ha gent que comença a millorar la raça, canvi de color dels ulls, etc.

Què diu la llei sobre la biotecnologia a Espanya?

Sempre que vulguis encetar un tipus de teràpia o experimentació amb animals o humans ha de passar per una sèrie de comitès ètics i normalment aquests comitès ètics es porten ja de nivells d'hospitals, universitats, etc. Ells s'ho miren molt bé, ja que no només hi ha gent d'hospitals sinó que si es tracta d'experimentació amb animals hi ha les protectores d'animals, que miren molt bé que els animals no pateixin i també gent de la Generalitat i de diferents sectors. Aquesta gent s'ho mira moltíssim. Una vegada passes aquests comitès llavors ja tens permís per poder-ho fer però està clar que necessites un permís i passar una comissió ètica que digui que el que tu faràs doncs reuneix uns requisits morals i ètics amb els quals evitaràs el patiments de les persones i no li augmentaràs i aquesta persona sortirà amb un guany i no hi ha altre mètode alternatiu que sigui menys agressiu, perquè si tu el fas i dius que és molt bo però te molts efectes secundaris més greus et diran que no i per tant la normativa va per aquí, a través de tots aquests comitès que has de superar.

Els experiments que fem al laboratori amb les cèl·lules no cal demanar permís ja que no es consideren un organisme que pugui patir dolor o desconfort però sempre que sigui treball amb ratolins, granotes, rates, gossos s'ha de passar una sèries de comissions i demanar permís que no són fàcils ja que ells s'ho miren molt bé, tot el tipus de procediment que tu faràs el nombre d'animals que has d'utilitzar i tot això. És una cosa complicada ja que no sempre et diuen que sí, a tu et pot sembla que els animals no patiran però ells diuen que potser hi hauria altres mètodes on patirien menys.

En el futur serà capaç de substituir les tècniques actuals d'edició genètica?

En edició gènica, podria, no per curar qualsevol malaltia però les que siguin amb bases genètiques sí. Tot el tema de canviar gens, treure i posar si com a base després has de mirar també el com ho fas i si ho fas ben fet sí. Bueno, el temps o dirà també però en un principi sembla que sí, s'ha de millorar l'especificitat però també s'arreglarà. És un tècnica que es va descobrir no fa masses anys però s'ha expandit moltíssim vull dir que s'està treballant molt i comparativament amb el transcurs d'aquest temps més que en altres tècniques, o sigui en principi alguna cosa sortirà i penso que podrà arribar a substituir a les altres tècniques. Això sí s'ha d'aplicar i saber fer.

ANNEX C: Glossari

LIMFÒCIT: És una varietat de leucòcit agranular que es caracteritza morfològicament per tenir un nucli arrodonit al voltant del qual hi ha el citoplasma que és molt petit. Conté, com a conseqüència, escassos orgànuls, però conté molts ribosomes en estat lliure.

GEN: És una seqüència lineal de nucleòtids d'ADN o ARN que és essencial per a una funció específica, ja sigui en el desenvolupament de l'ésser o en el manteniment d'una funció fisiològica normal.

GENOMA: És tot el material genètic contingut en els cromosomes d'un organisme en particular.

CÈL·LULES EUCARIOTES: són cèl·lules amb un nucli cel·lular delimitat dins d'una doble capa lipídica, l'embolcall nuclear, la qual és porosa i conté el seu material hereditari, fonamentalment la seva informació genètica.

PROTEÏNES: Són macromolècules formades per cadenes lineals d'aminoàcids que constitueixen el principal nutrient per a la formació dels músculs del cos.

ADN: És un àcid nucleic que conté les instruccions genètiques utilitzades en el desenvolupament i funcionament de tots els éssers vius coneguts. La funció principal de les molècules d'ADN és emmagatzemar informació a llarg termini.

ANTICOSSOS: Són glicoproteïnes del tipus gamma globulina. Existeixen en forma soluble a la sang o altres fluids corporals dels vertebrats, disposen d'una forma idèntica que actua com receptor dels limfòcits B i són utilitzats pel sistema immunitari per identificar i neutralitzar elements estranys al cos, com ara bacteris, virus o paràsits.

ANTÍGENS: Són molècules, generalment proteïnes, que poden induir a la formació d'anticossos.

CÈL·LULES EPITEL·LIALS: Cèl·lules que constitueixen, per capes, l'epiteli, un teixit que recobreix la superfície, cavitats i òrgans del cos i forma part de les glàndules.

OLIGODENDRÒCITS: Són juntament amb les neurones, els dos tipus diferents de cèl·lules que formen el sistema nerviós. Tenen com a funció suportar als axons i produir la beina de mielina que aïlla els axons.

MIELINA: És la substància lipídica que recobreix algunes neurones amb la finalitat de fer més ràpides les connexions.

GFP: És una proteïna produïda per la medusa *Aequorea victoria*, que emet bioluminescència quan s'exposa a la llum blava. En biologia cel·lular i molecular, el gen de la GFP s'utilitza amb freqüència com un gen indicador.

PBS: És una solució tampó generalment utilitzada en recerca biològica. Es tracta d'una solució aquosa salina que conté clorur sòdic, fosfat sòdic, clorur de potassi i fosfat de potassi.

OPTI-MEM: És el medi de cultiu de les cèl·lules, conté tots els nutrients necessaris per el creixement de la cèl·lula.

GENTICINA: És un aminoglucósid relacionat amb la Gentamicina, i s'utilitza habitualment en investigacions de laboratori per seleccionar cèl·lules genèticament editades.

TRIPSINA: És una proteasa de serina trobada al sistema digestiu de molts vertebrats. A aquests organismes hi assumeix la funció de hidrolitzar les proteïnes.

PLÀSMID: És una molècula d'ADN circular de doble cadena pròpia dels procariotes, que pot existir i replicar-se independentment del cromosoma o estar integrat en el mateix.

TO PRO 3: Colorant que reconeix el nucli cel·lular.

FLUOROMOUNT: És un compost no fluorescent soluble en aigua que serveix per enganxar substàncies tenyides i pot reduir la tensió de fluorocrom durant l'anàlisi de les mostres mitjançant microscòpia de fluorescència.

TAMPÓ: És la solució el pH de la qual es modifica molt poc per dilució o per addició de quantitats moderades d'àcids o de bases. S'utilitza per diluir substàncies.

EDTA: És un àcid poliaminocarboxílic, estant un sòlid incolor i soluble en aigua que al laboratori pot servir com a anticoagulant.

BSA: És una proteïna extreta del sèrum boví i és àmpliament usada en molts procediments de bioquímica.

MTS: És un reactiu que serveix per mesurar la quantitat de cèl·lules actives.

GRUP CONTROL: En biologia els grups control tenen com a objectiu demostrar la certesa dels resultats de la manipulació de les variables en un experiment.

TOXINA: És una substància verinosa produïda per cèl·lules o organismes vius que és farmacològicament activa a concentracions molt baixes. Les toxines poden ser molècules petites, pèptids o proteïnes.

SOLUCIÓ: És una mescla o barreja homogènia a nivell molecular de dues o més substàncies pures que no reaccionen entre si.

EPPENDORF: Eppendorf és una marca que comercialitza instruments de laboratori, en aquest cas també s'anomena eppendorf a un petit tub que serveix per emmagatzemar substàncies.