

Prof . M. Carmen Cerdà

TEMA 18: ENGINYERIA GENÈTICA



Què estudiarem?

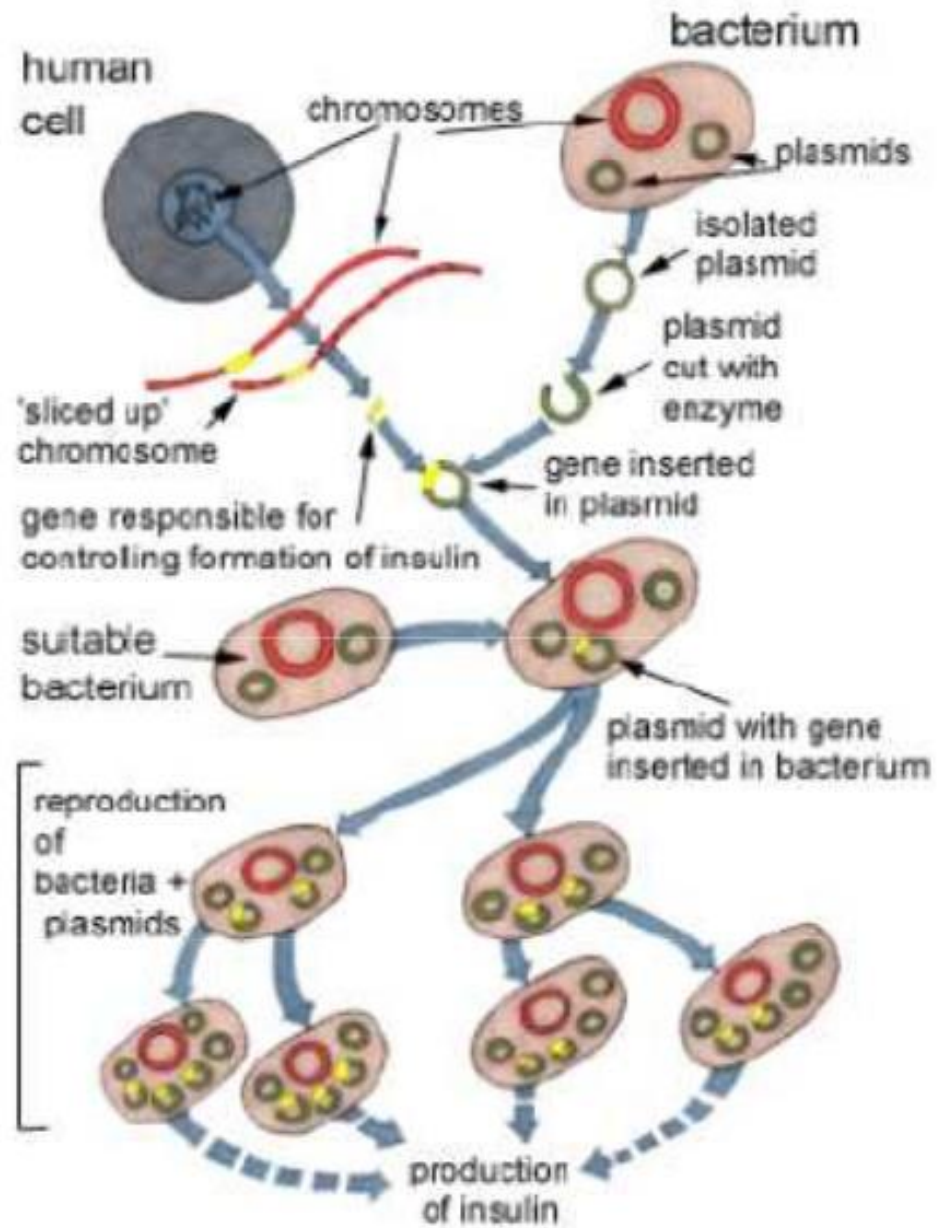
1. L'enginyeria genètica
2. La clonació d'éssers vius
3. Els anticossos monoclonals
4. El Projecte Genoma Humà
5. Riscos i implicacions ètiques de la biotecnologia

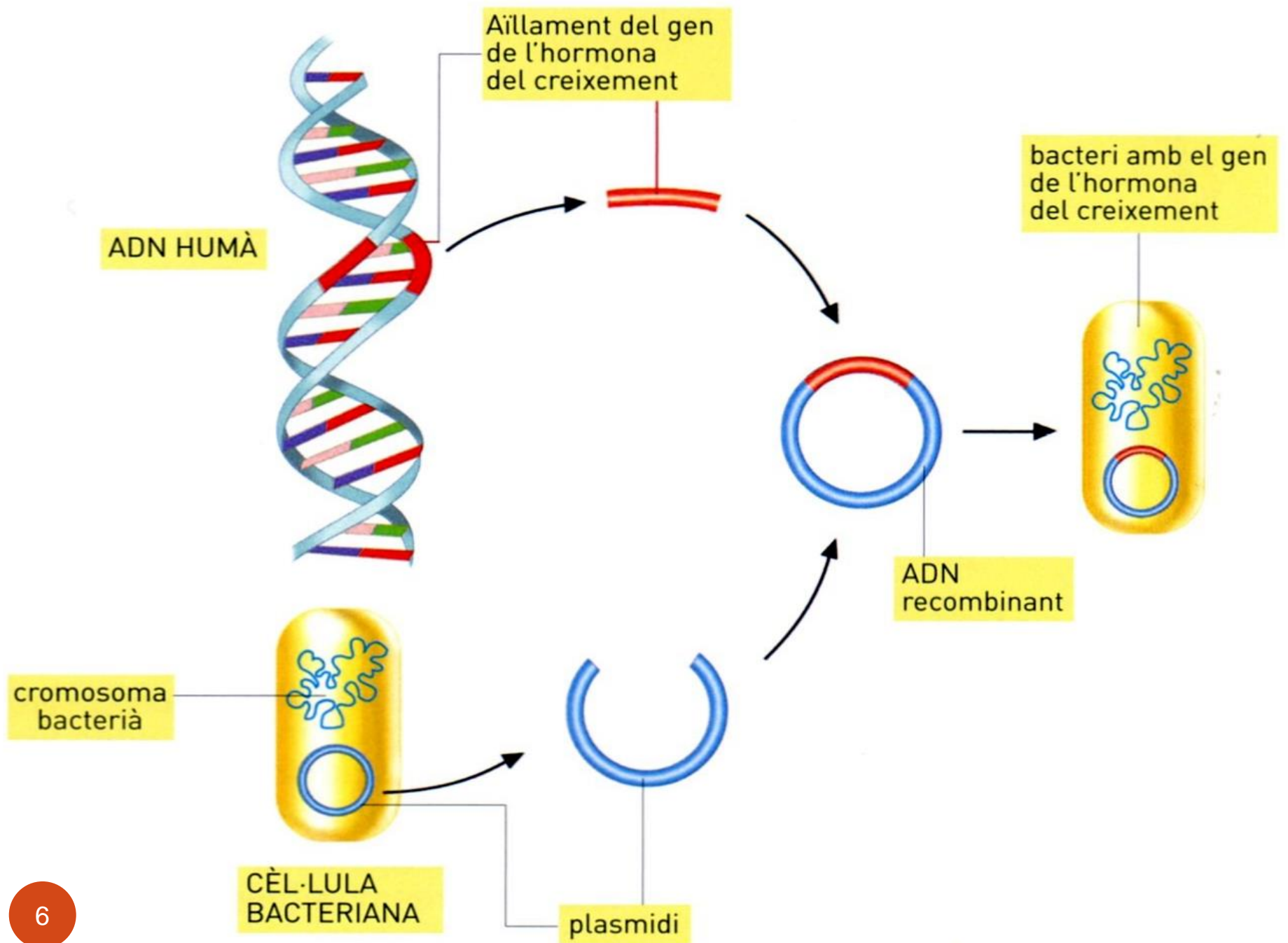
1. L'enginyeria genètica

- **Biotecnologia:** Conjunt de tècniques mitjançant les quals s'obtenen productes útils per a les persones a partir d'éssers vius, les seves parts o els seus productes.
- **Enginyeria genètica:** Branca moderna de la biotecnologia. Biotecnologia de la manipulació i transferència del DNA d'un organisme a un altre.
 - Possibilita la creació de noves espècies, correcció de defectes genètics i la fabricació de nombrosos compostos.
 - Un dels objectius de l'enginyeria genètica pot ser la clonació.
- **Clon:** Conjunt d'individus genèticament idèntics que descendeixen d'un mateix individu per mecanismes de reproducció asexual.

1.1. Tècniques d'enginyeria genètica

- La tècnica principal emprada en enginyeria genètica es la introducció de fragments gènics que contenen un o diversos gens en un individu que no els hi té.
- Aquest DNA pot incorporar-se a les cèl·lules d'altres organismes (vegetals, animals o bacteris) en els que podrà expressar la informació d'aquests gens.
- En la tecnologia del DNA recombinat es poden diferenciar quatre etapes bàsiques:
 - Obtenció del DNA que interessa.
 - S'insereix un altre fragment de DNA, que sol ser un plasmidi bacterià.
 - Més tard, aquest DNA recombinant s'introdueix en l'organisme receptor.
 - Finalment, l'organisme receptor sintetitza el producte del gen insertat.

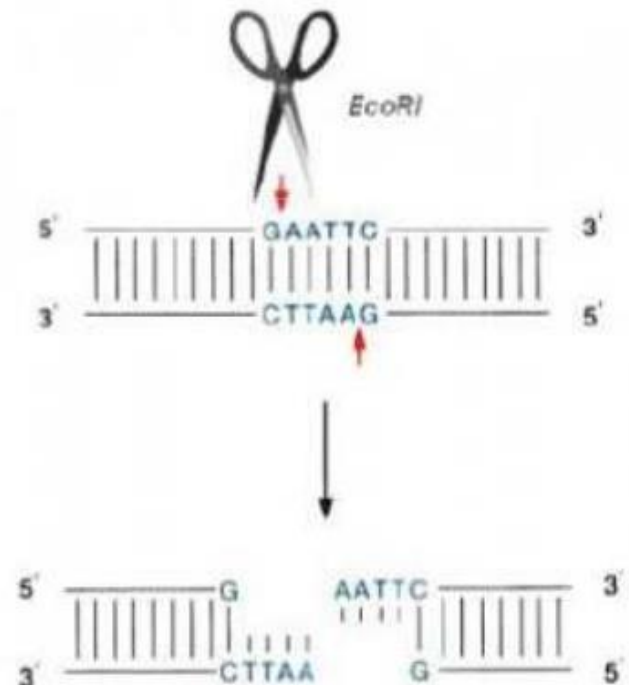


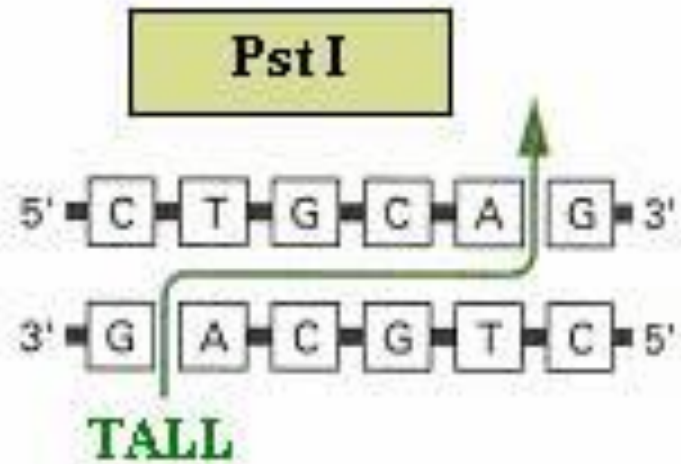
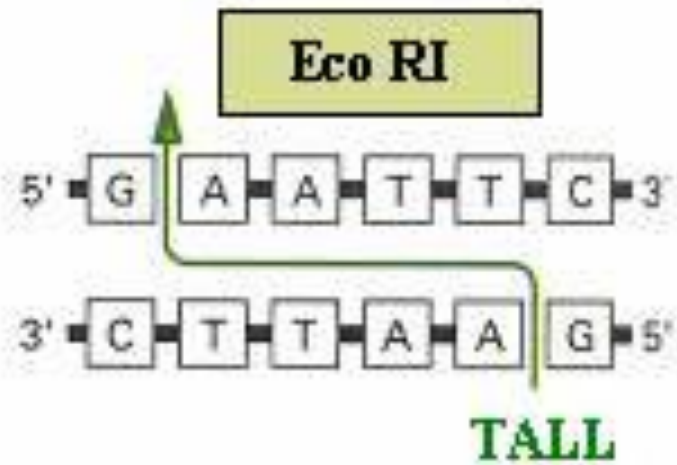
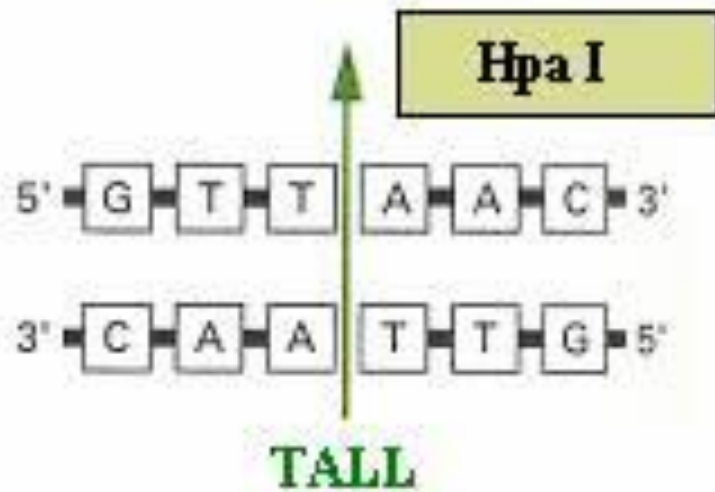


1.1.1. Enzims de restricció

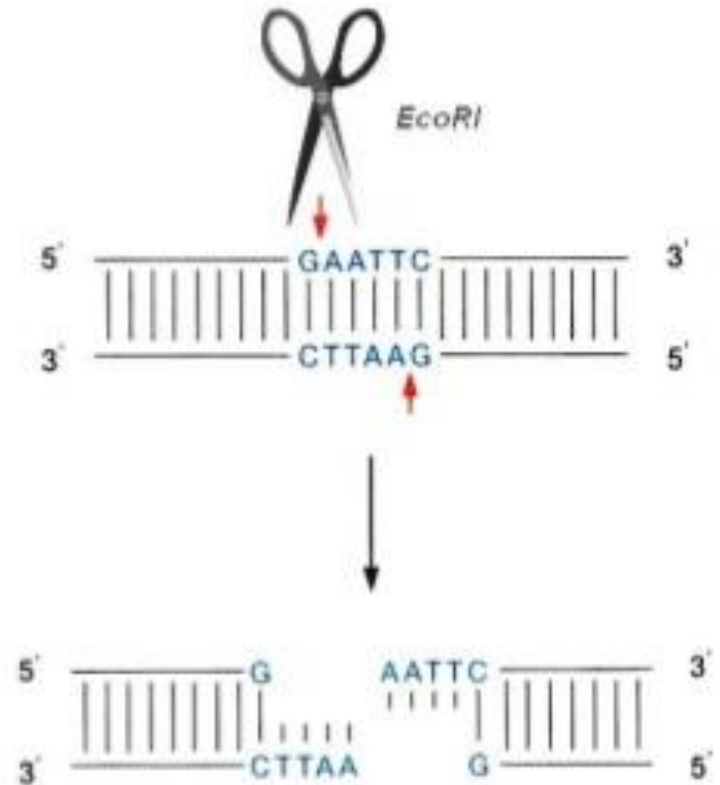
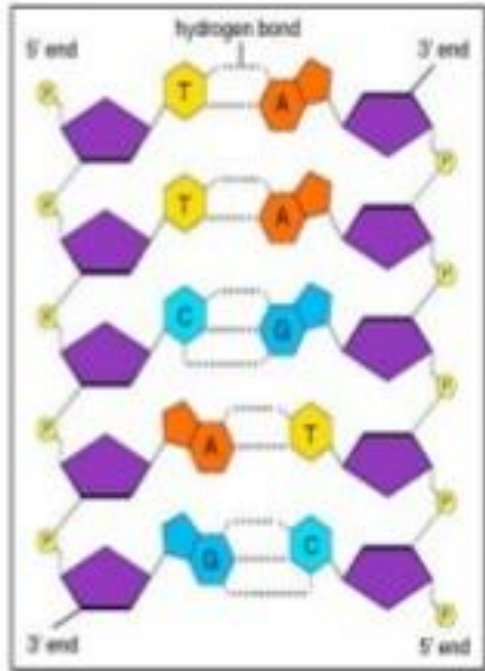
- Són enzims que tallen DNA específicament per una seqüència concreta.
- Presents en procariotes els quals els utilitzen com a sistema de defensa contra l'entrada d'ADN estrany.
- Per tal que no degradin l'ADN propi, cada enzim de restricció té associada una metilasa: aquesta reconeix la mateixa seqüència que l'enzim de restricció i el metila, cosa que evita que l'enzim de restricció el degradi.
- Característiques dels enzims de restricció:
 - Sempre tallen el DNA de la mateixa forma (seqüències de 4 a 12 nucleòtids).
 - Solen ser seqüències palindròmiques.
 - Solen deixar els extrems cohesius (petits fragments de DNA monocatenari), ja que no tallen al mateix punt.

Enzima	Origen Bacteriano	Sitio de Reconocimiento
<u>EcoRI</u>	<u>Escherichia coli</u>	5' GAATTC 3' CTTAAG
<u>BamHI</u>	<u>Bacillus amyloliquefaciens</u>	5' GGATCC 3' CCTAGG
<u>HindIII</u>	<u>Haemophilus influenzae</u>	5' AAGCTT 3' TTCGAA
<u>TaqI</u>	<u>Thermus aquaticus</u>	5' TCGA 3' AGCT
<u>NciI</u>	<u>Nocardia otitidis</u>	5' GCGGCCGC 3' CGCGGGCG
<u>HinII</u>	<u>Haemophilus influenzae</u>	5' GANTC 3' CTNAG
<u>Sau3A</u>	<u>Staphylococcus aureus</u>	5' GATC 3' CTAG
<u>PvuII*</u>	<u>Proteus vulgaris</u>	5' CAGCTG 3' GTCGAC
<u>SmaI*</u>	<u>Serratia marcescens</u>	5' CCCGGG 3' GGGCCC
<u>HaeIII*</u>	<u>Haemophilus eggittus</u>	5' GGCC 3' CCGG
<u>AhlI*</u>	<u>Arthrobacter luteus</u>	5' AGCT 3' TCGA
<u>EcoRV*</u>	<u>Escherichia coli</u>	5' GATATC 3' CTATAG
<u>KpnI⁽¹⁾</u>	<u>Klebsiella pneumonia</u>	5' GGTACC 3' CCATGG



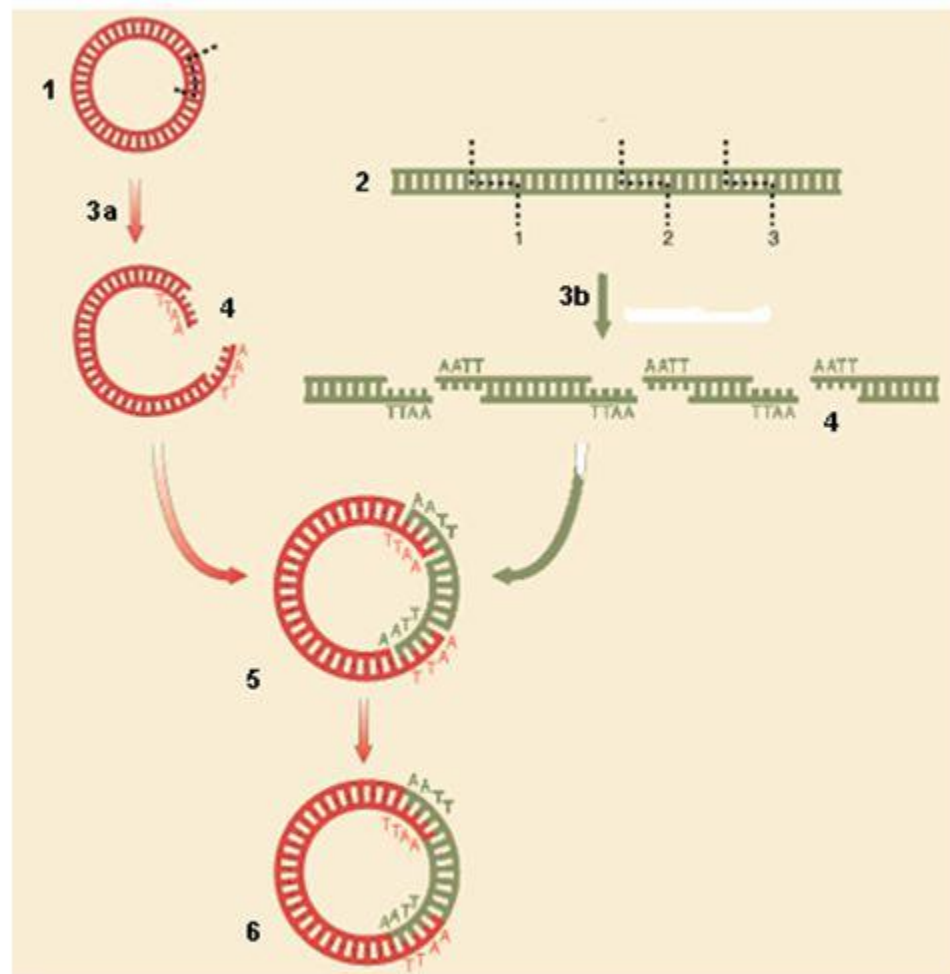


ADN



Els ENZIMS DE RESTRICCIÓ
(tenen capacitat de tallar el DNA
per punts determinats)

Construcción de ADN recombinante



1 ADN plásmido

2 ADN extraño

3 Corte del plásmido y ADN extraño con Eco RI (endonucleasa de restricción)

4 Formación de extremos cohesivos

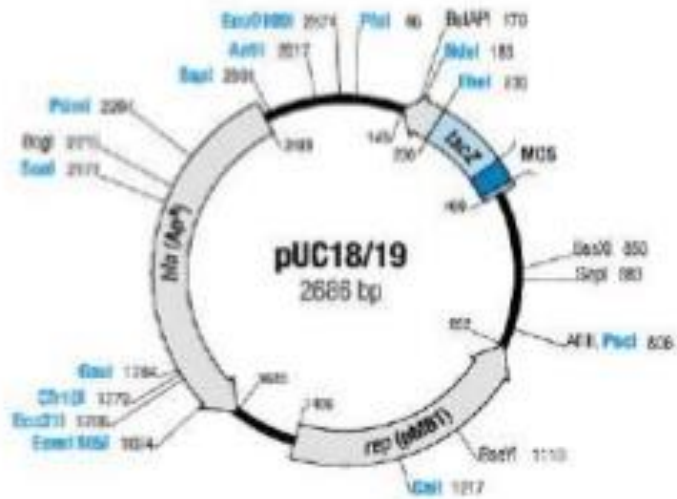
5 Formación de ADN recombinantes

6 Acción de ADN ligasa que sella los extremos

1.1.2. Vectors de clonació per a procariotes

- Els vectors de clonació són molècules transportadores que transfereixen i repliquen fragments d'ADN que porten inserits.
- Perquè serveixi de vector, una molècula ha de ser capaç de replicar-se juntament amb el fragment d'ADN que transporta. També ha de tenir seqüències de reconeixement que permetin la inserció del fragment d'ADN a clonar.
- Per inserir un fragment d'ADN al vector, s'utilitza un enzim de restricció, i es barreja amb fragments d'ADN produïts amb el mateix enzim.
- Els vectors que transporten un fragment inserit es denominen **vectors recombinats**.

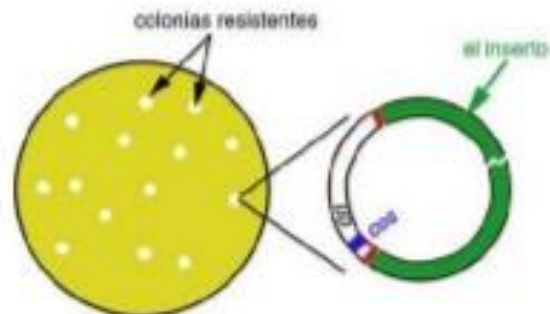
- Tipus de vectors de clonació:
 - **Plasmidis:** petits fragments de DNA circular bacterià de doble hèlix que posseeixen un origen de replicació propi, es repliquen de forma independent al genoma bacterià.
 - pBR313: incorpora marcadors de selecció (TcRiApR) i una sèrie de llocs de restricció útils per a la introducció de l'insert (llocs de clonatge).
 - Sèrie pUC.
 - **Bacteriòfags o fags** (només infecten bacteris): es poden manipular amb la finalitat d'eliminar una part del seu DNA i reemplaçar-la pel fragment desitjat.
 - Fag λ (eliminen gens del cicle lisogènic).
 - FagM13.
 - **Cosmidis:** Tipus de plasmidis que contenen els extrems complementaris del genoma del fag λ (extrems COS).



Sèrie pUC



Bacteriòfag

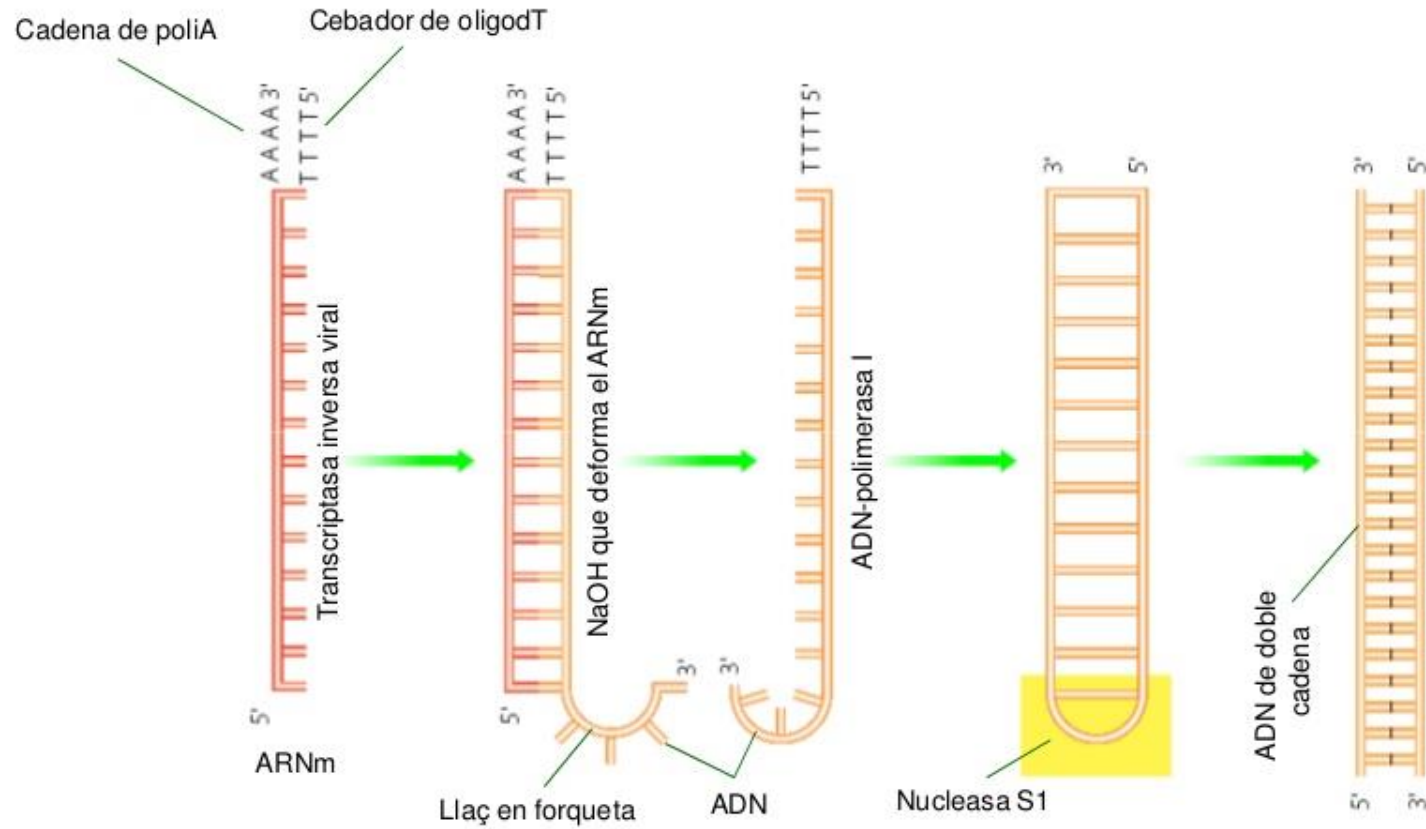


Cosmidis

1.1.3. Tecnologia del DNA complementari

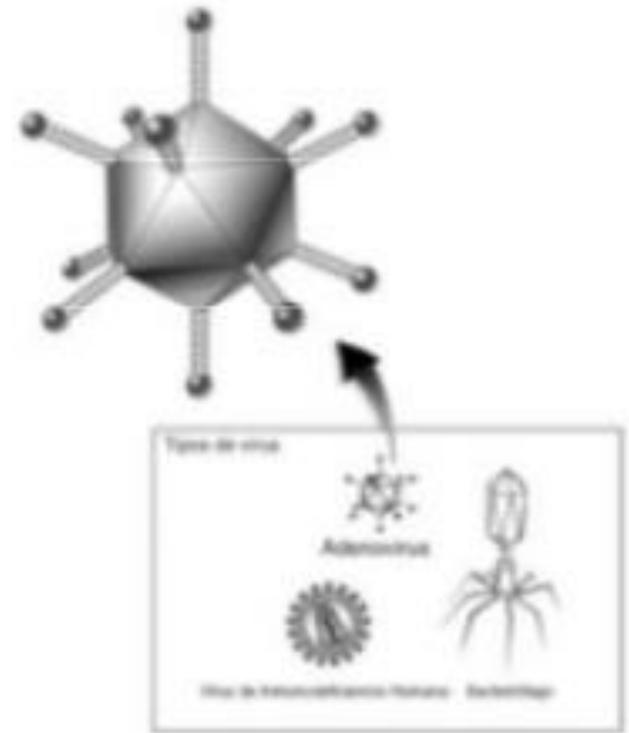
- Un dels fins de l'enginyeria genètica és l'obtenció de proteïnes d'interès humà: insulina, hormona del creixement, etc.
- La informació per la síntesi d'aquestes proteïnes la trobem al DNA.
- El DNA eucariota conté seqüències no codificants (introns).
- La informació de síntesi d'aquestes proteïnes també la trobem al mRNA (sense introns) però és necessari fer el pas de mRNA a DNA per insertar-ho al bacteri.

Mecanisme de síntesi de l'ADN complementari



1.1.4. Vectors de clonació per a eucariotes

- Per introduir els gens en cèl·lules eucariotes són necessaris altres vectors:
 - En el cas de les cèl·lules vegetals s'utilitza un plasmidi, el plasmidi Ti, que es troba als bacteris *Agrobacterium tumefaciens*.
 - Per introduir gens en cèl·lules animals s'utilitzen vectors virals (adenovirus).



1.1.5. Reacció en cadena per la polimerasa

- Tècnica fonamental per aconseguir, in vitro, múltiples còpies d'un determinat fragment d'ADN (clonació de DNA).
- Desenvolupada per Kary Mullis al 1986 (premi Nobel 1993).
- Per poder dur a terme la reacció de PCR són necessaris els següents elements:
 - DNA que es vol clonar.
 - Nucleòtids lliures.
 - Primers o encebadors.
 - DNA polimerasa termoresistent (Taq polimerasa).

- **Fases del cicle:**

- **Desnaturalització del DNA:** tractament a 80° perquè es separin les dues cadenes.
- **Hibridació dels encebadors:** s'afegeixen els encebadors i es disminueix la temperatura a fi de permetre la hibridació amb els llocs específics de la cadena.
- **Elongació de la cadena:** la DNA-polimerasa sintetitza una cadena senzilla de DNA en sentit 5'→3'.

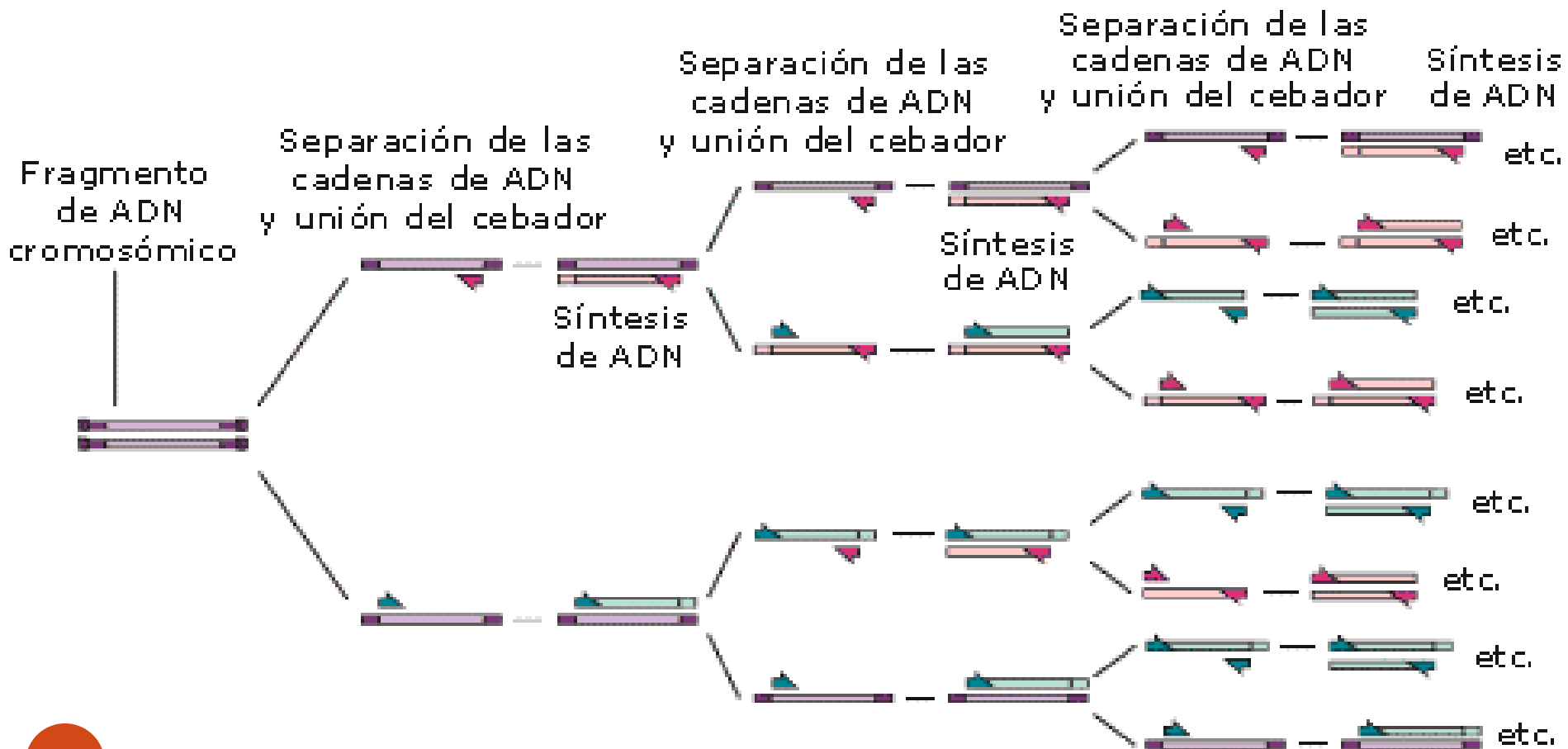
- La reacció es dur a terme en un termociclador.

- La PCR es una tècnica molt estessa (la utilitzen tots els laboratoris del món), ja que permet obtenir moltes còpies de DNA a partir d'una quantitat inicial molt petita.
- La Taq polimerasa és un enzim (DNA-polimerasa) exclusiu d'un arqueobacteri que viu en condicions extremes de temperatura (fins als 140°C).
- És molt útil perquè d'aquesta manera es pot dur a terme la fase de desnaturalització sense passar pena perquè es desnaturalitzin els enzims.

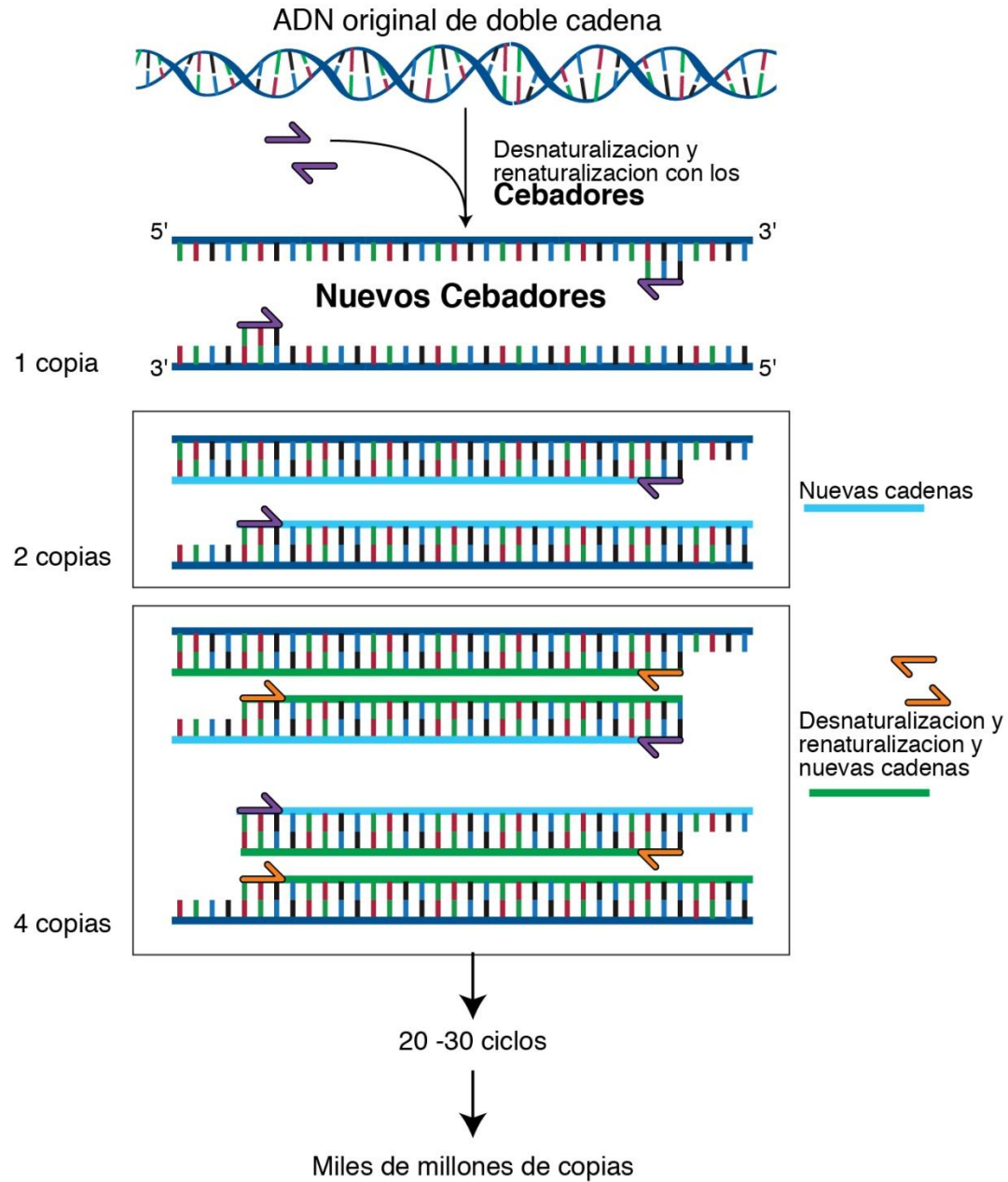
PRIMER CICLO
(2 moléculas de ADN
de doble cadena)

SEGUNDO CICLO
(4 moléculas de ADN
de doble cadena)

SEGUNDO CICLO
(8 moléculas de ADN
de doble cadena)



Reacción de la plimerasa en cadena

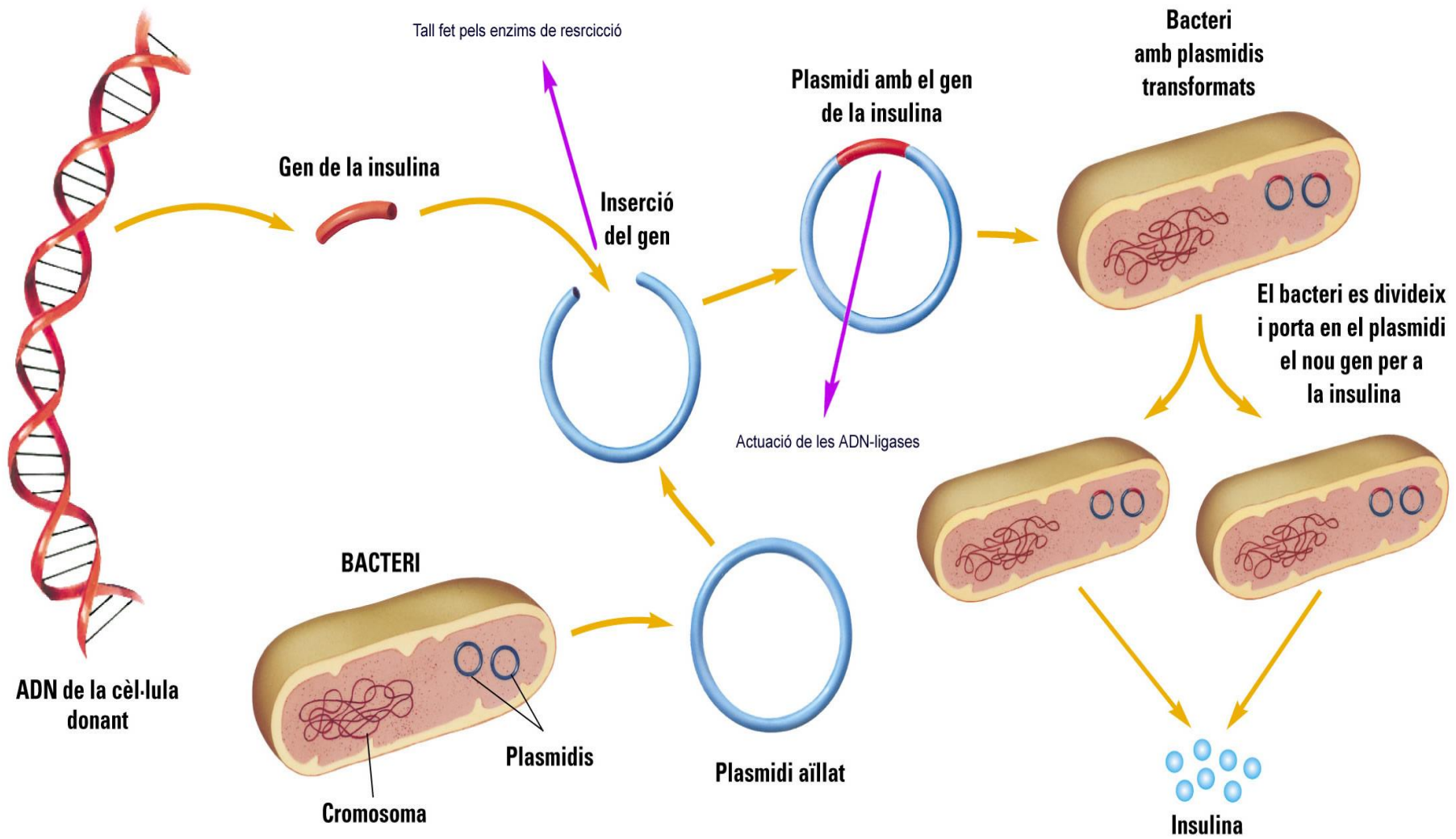


1.2. Aplicacions de l'enginyeria genètica

- A principi dels anys 70 es va descobrir un enzim capaç de tallar segments específics de les cadenes d'àcids nucleics.
- Durant segles s'han produït modificacions d'éssers vius, plantes i animals a través de l'anomenada **genètica clàssica**.
- Ara bé, quan aquesta genètica ja no es produeix a l'atzar sinó que és induïda al laboratori es parla **d'enginyeria genètica moderna**.

1.2.1. Producció de proteïnes terapèutiques

- Les malalties que tenen el seu origen en la manca d'alguna proteïna poden ser tractades gràcies a l'enginyeria genètica (producció d'aquestes proteïnes per bacteris i, posteriorment injectar-les en el pacient).
- Exemples:
 - **Insulina.** Controla els nivells de glucosa en la sang (proteïna formada per dues cadenes polipeptídiques (A i B), cada cadena la forma un bacteri).
 - **Hormona del creixement.** Tractament per certs casos d'enanisme.
 - **Interferó.** Important en el tractament d'infeccions víriques i certs tipus de càncer.
 - **Factor VIII de la coagulació.** S'evita l'hemofília.



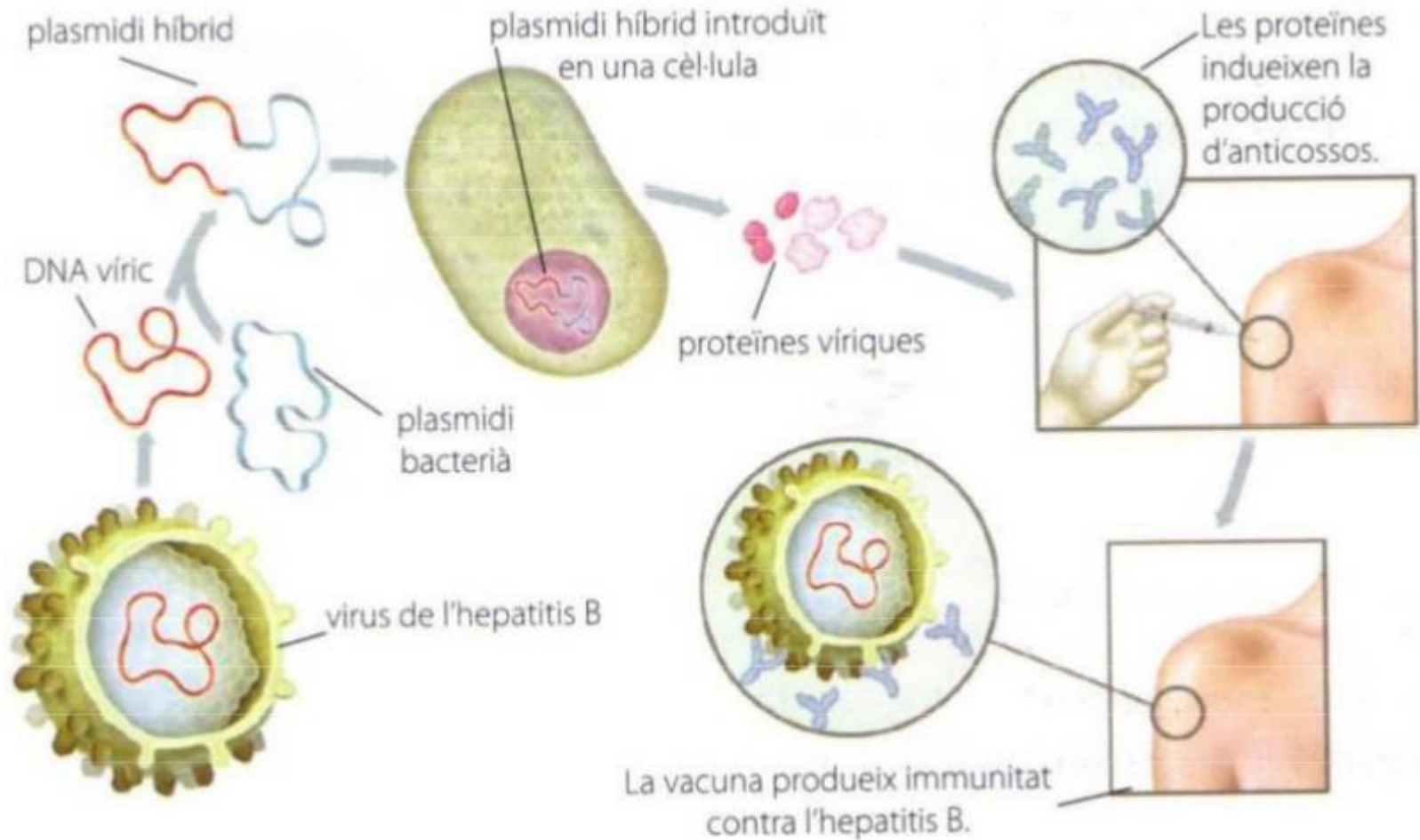
1.2.2. Producció d'enzims

- Des de fa unes dècades es disposa d'uns enzims relativament purs extrets industrialment de bacteris i fongs i, alguns d'ells amb una gran varietat d'activitats que poden ser utilitzats en l'elaboració d'aliments.
- Actualment l'enginyeria genètica contribueix a la biosíntesi d'enzims recombinats de gran puresa, que aporten major qualitat al producte final.

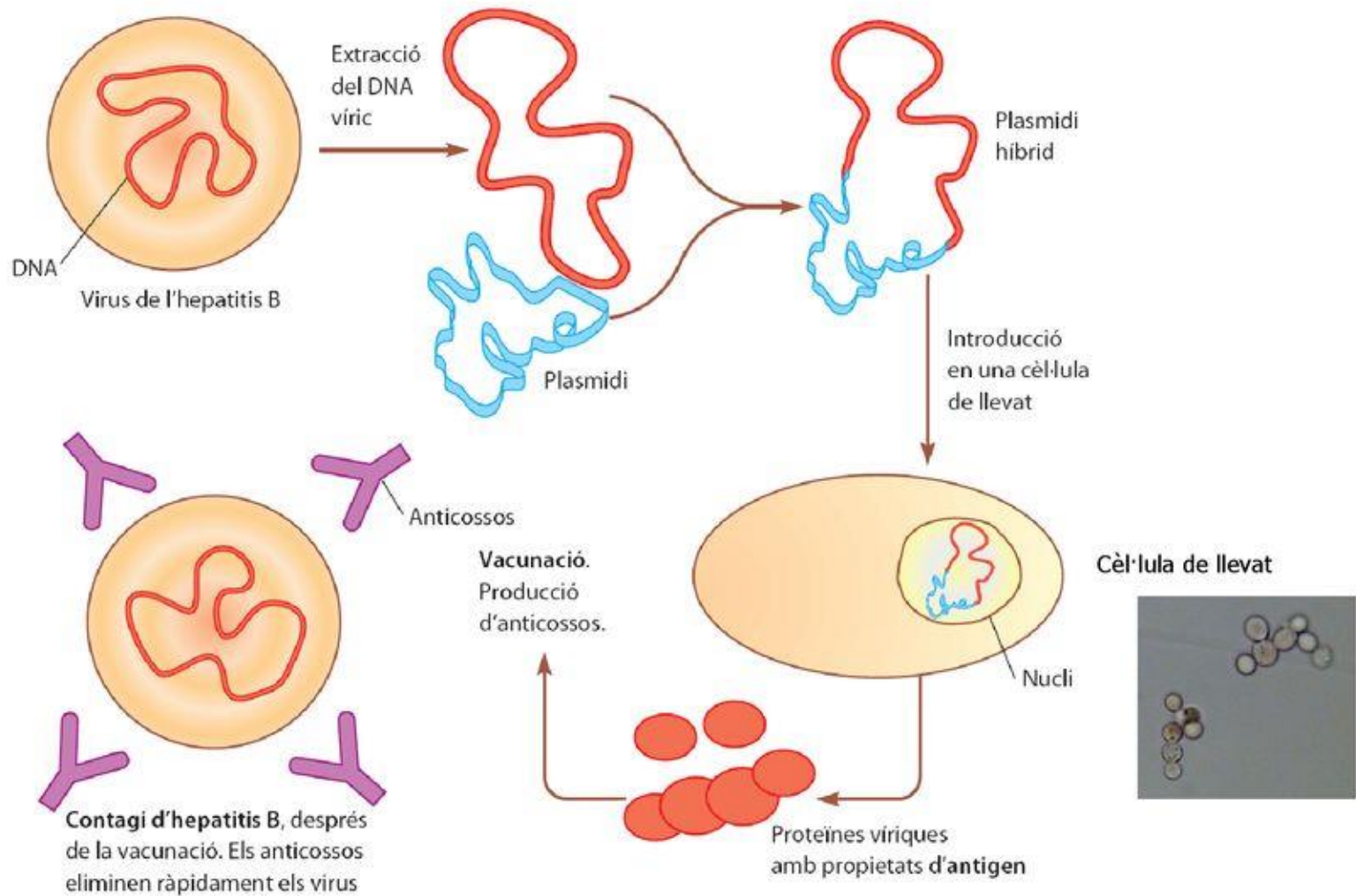
1.2.3. Producció de vacunes

- S'insereix algun gen del microorganisme patògen i s'insereix en una cèl·lula (bacteriana o eucariota) que produirà el gen en qüestió.
- Una vegada recollides les proteïnes es poden injectar a qualsevol persona per activar la resposta immunitària contra aquell antígen.
- L'avantatge és que no s'injecta el patògen (ni debilitat ni mort).
- S'obtenen vacunes més segures i amb menys efectes adversos.

Obtenció d'una vacuna recombinant

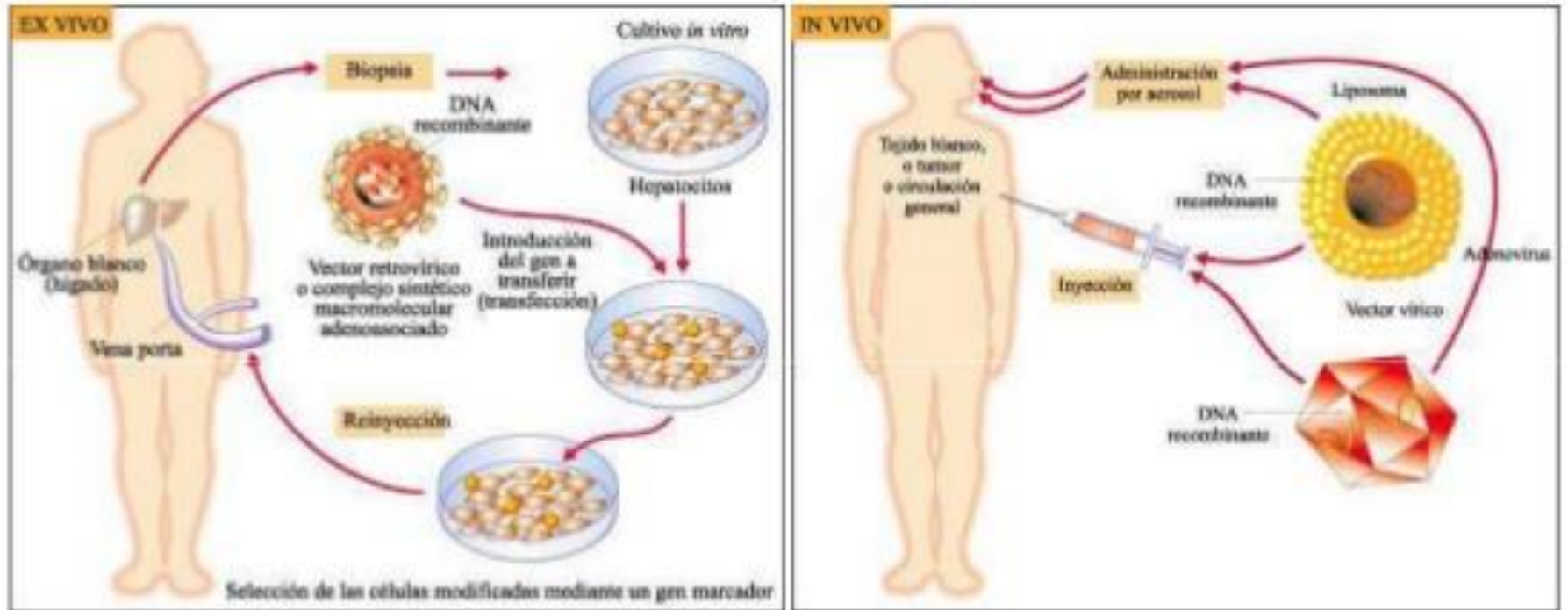


Biotecnologia: Obtenció de la vacuna recombinant contra el virus de l'hepatitis B

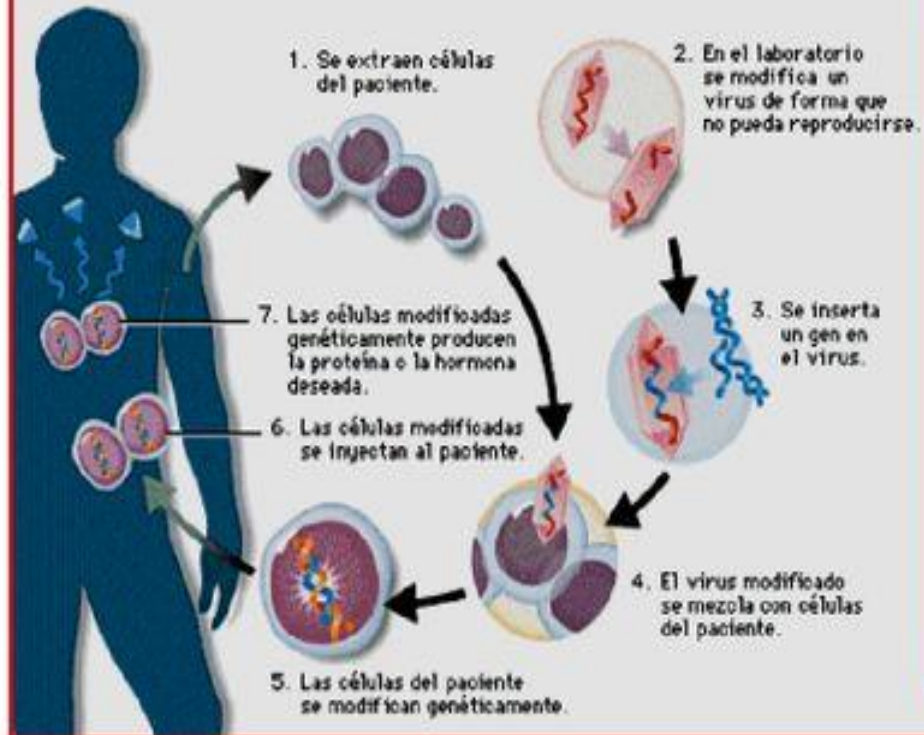


1.2.4. Teràpia gènica

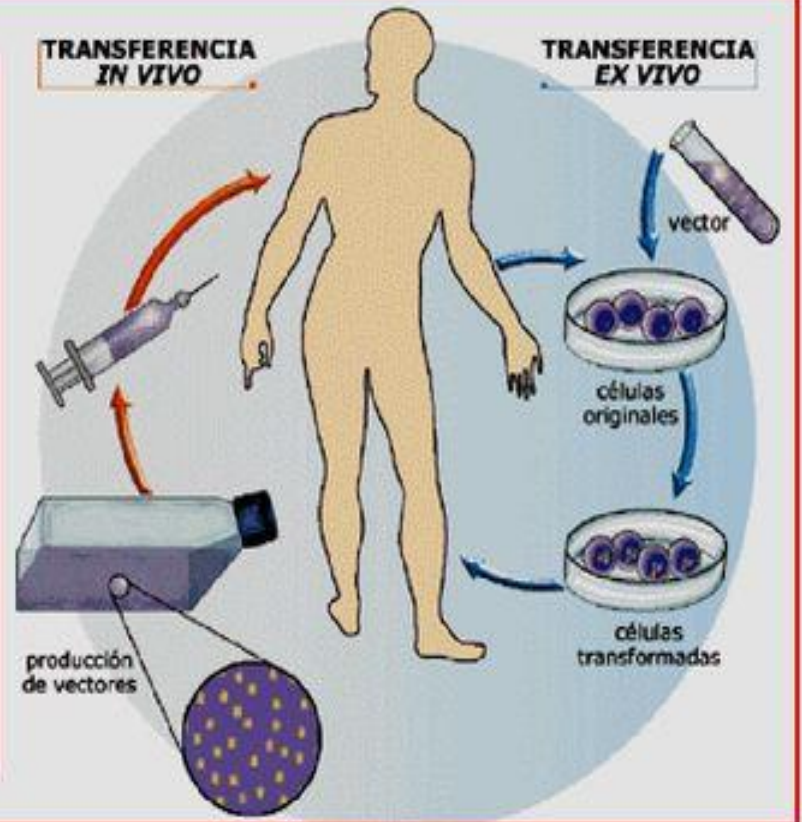
- Consisteix en introduir gens en éssers humans a fi de corregir alguna malaltia d'origen genètic (talassèmia, SCID-ADA).
- Es coneixen unes 3000 malalties genètiques en els humans. En la major part dels casos no se n'han identificat els gens responsables.
- Dos tipus:
 - **Teràpia de la cèl·lula somàtica:** es produeix un canvi en tan sols determinades cèl·lules i no afecta a la resta ni a les cèl·lules germinals, per la qual cosa, el canvi no és hereditari.
 - **Teràpia de la cèl·lula germinal:** si el gen correcte es fes arribar a un òvul, a un espermatozoide o a un zigot.



Terapia génica

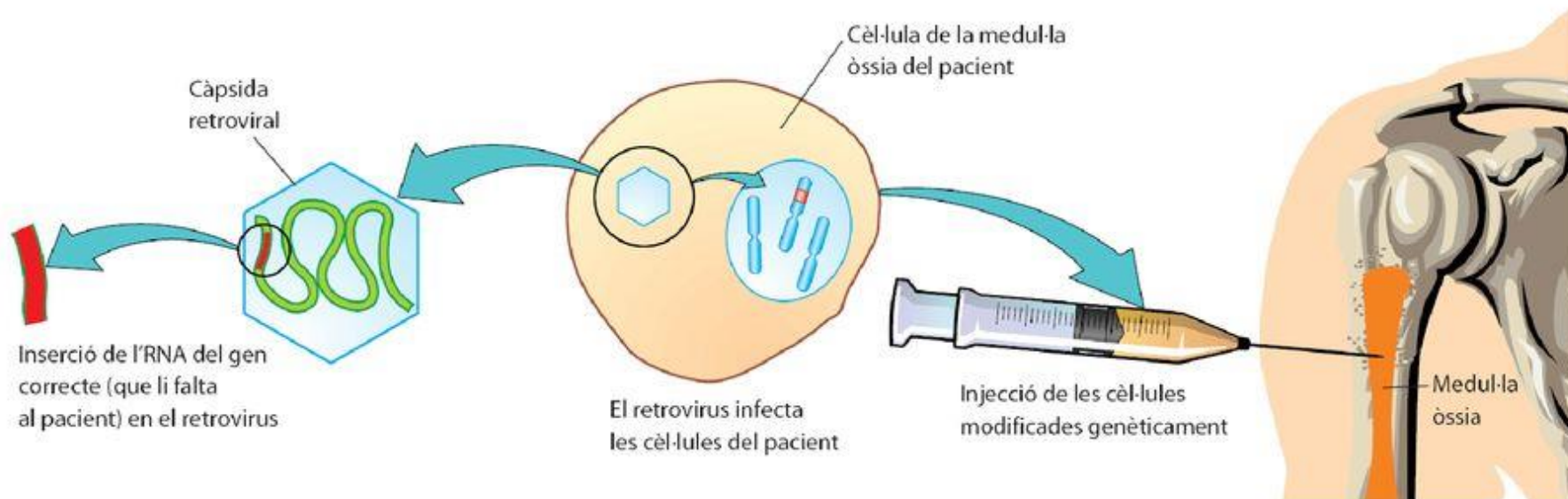


TRANSFERENCIA *IN VIVO*



Biotecnologia: Teràpia gènica

Teràpia gènica de la immunodeficiència combinada greu lligada a la manca de l'enzim ADA. "Nens bombolla"



Teràpia gènica contra [la talassèmia](#). S'introdueix el gen que codifica la cadena α o β de la hemoglobina en els eritroblasts de la medul·la òssia de la persona malalta.

En un futur: la citrul·linèmia, fenilcetonúria, la hipercolesterolèmia familiar i la manca de purina-nucleosid-fosforilasa.

1.2.5. Aplicacions de l'enginyeria genètica en l'agricultura

- Els organismes eucariotes desenvolupats a partir d'una cèl·lula en que s'han introduït gens estranys s'anomenen organismes transgènics.
- Per introduir gens en les cèl·lules vegetals i obtenir plantes transgèniques s'utilitza el plasmidi Ti d'*Agrobacterium tumefaciens* o altres tècniques com la microinjecció i les microbales de metall recobertes de DNA.

- **Opcions de millora:**

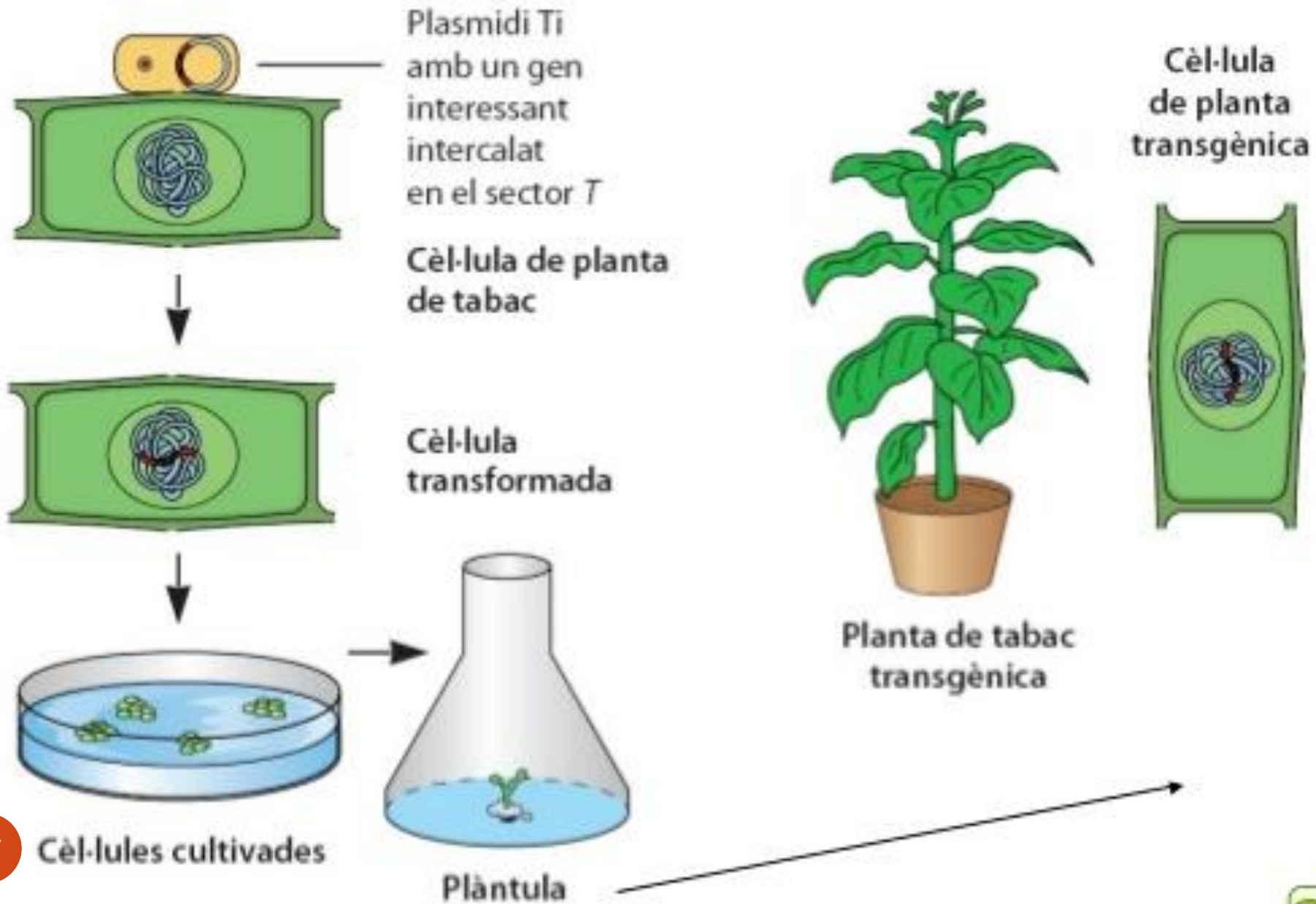
- Obtenir plantes resistents a herbicides.
- Aconseguir plantes resistents a insectes.
- Millorar la resistència a canvis ambientals.
- Modificar característiques de les plantes.
- Millorar les característiques nutritives del producte.

- **Riscos:**

- Alteració de la qualitat nutricional.
- Amenaça a la diversitat biològica.
- Generació de resistències a antibiòtics.
- Potencial tòxic.
- Transferència gènica no intencionada a plantes silvestres u altres cultius.

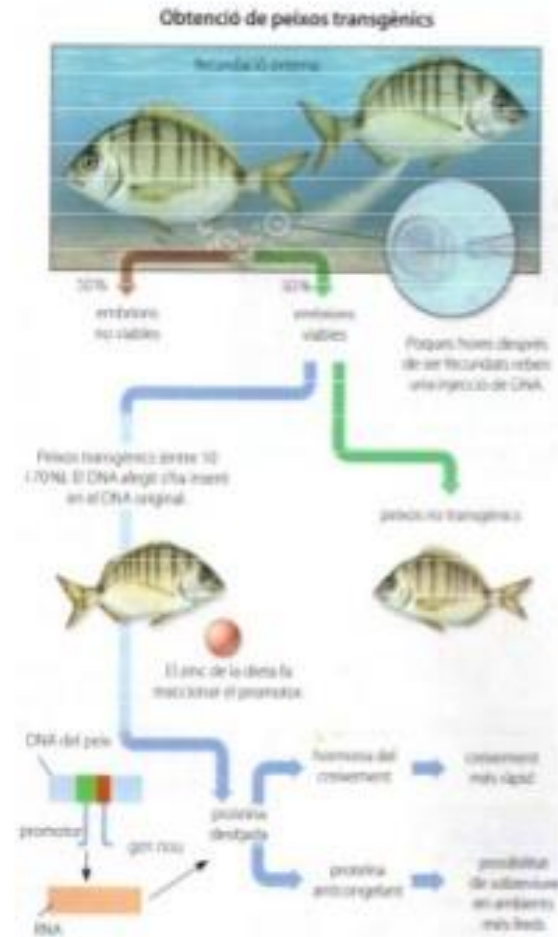
- Alguns cultius utilitzats:
 - **Dasca *Bt***. Incorpora un gen que li fa produir un insecticida.
 - **Soja resistent a herbicides**. Permet utilitzar herbicides que no danyen el cultiu.
 - **Tomàquet de maduració tardana**. Madura lentament i no s'ha de collir verda.
- Cultius en desenvolupament:
 - **Arròs daurat**. Produeix vitamina A, per tant, ajudarà a combatre la manca d'aquesta vitamina.
 - **Cultius amb gens *nif***. Permet utilitzar el nitrogen atmosfèric a algunes plantes.

Utilització del plasmidi Ti com a vector de gens en plantes



1.2.6. Aplicacions de l'enginyeria genètica en la ramaderia

- Encara que no s'ha aprovat l'ús d'animals transgènics pel consum humà es creixent l'interès científic en aplicar tècniques d'enginyeria genètica en aquest camp.

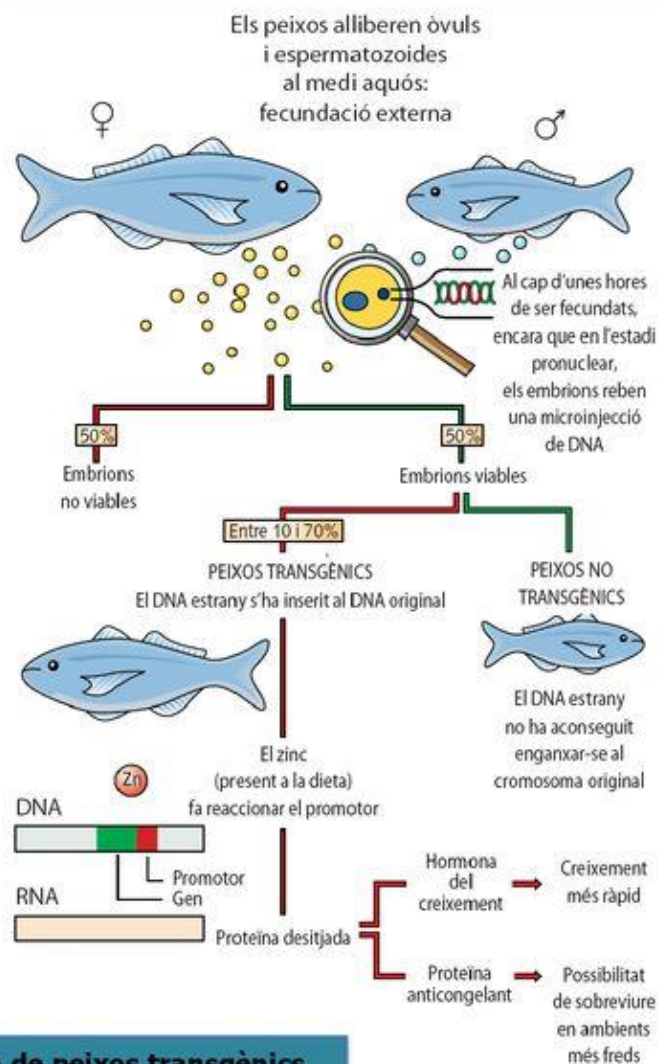


Biotecnologia: Enginyeria genètica aplicada a la producció animal

Els millors resultats en peixos ja que tenen fecundació externa (10-70%) en mamífers el percentatge d'embrions transgènics 1%.

EXEMPLES:

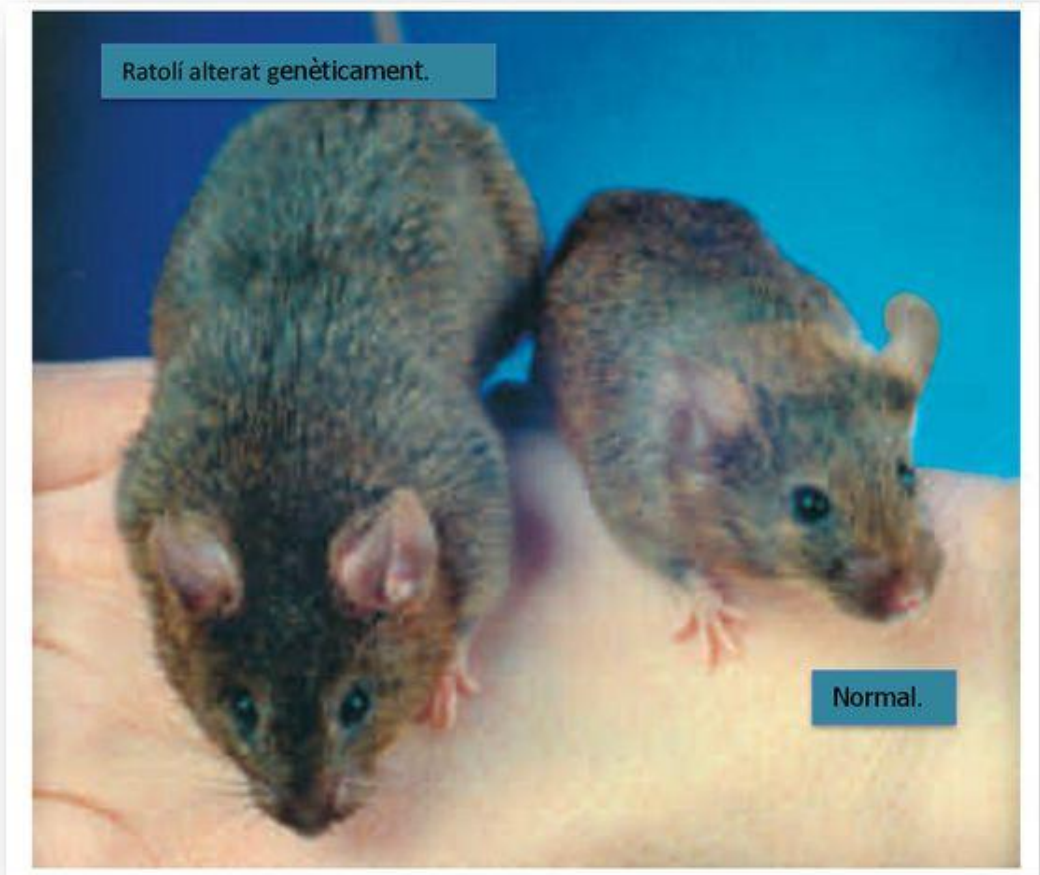
- **Carpes transgèniques** amb el gen de l'hormona del creixement de la truita arc iris. S'ha unit a un promotor que s'estimula en afegir zinc a la dieta.
- **Salmons transgènics** que resisteixen les baixes temperatures. S'els hi ha introduït un gen d'una pelaia de l'Àrtic que fabrica una proteïna que s'uneix als cristalls de gel que es formen a la sang i evita el seu creixement.



Obtenció de peixos transgènics.

Biotecnologia: Enginyeria genètica aplicada a la producció animal

- **1982 Ratolins transgènics** amb l'hormona del creixement de rates, va ser el primer animal transgènic





2. La clonació d'essers vius

- La clonació es l'obtenció d'éssers vius idèntics originats per reproducció asexual a partir d'una única cèl·lula o organisme o escissió artificial d'estats embrionaris primerencs.



2.1. Clonació de plantes

- Pot tenir lloc de forma natural, cada vegada que una planta es reproduïx asexualment (els agricultors ho poden fer mitjançant esqueixos).
- Les plantes tenen teixits **totipotents** (amb capacitat de diferenciar-se en qualsevol tipus de teixit).
- La regeneració d'una planta a partir d'una sola cèl·lula, **cal·lus vegetal**, és útil per a l'obtenció de plantes modificades per enginyeria genètica.

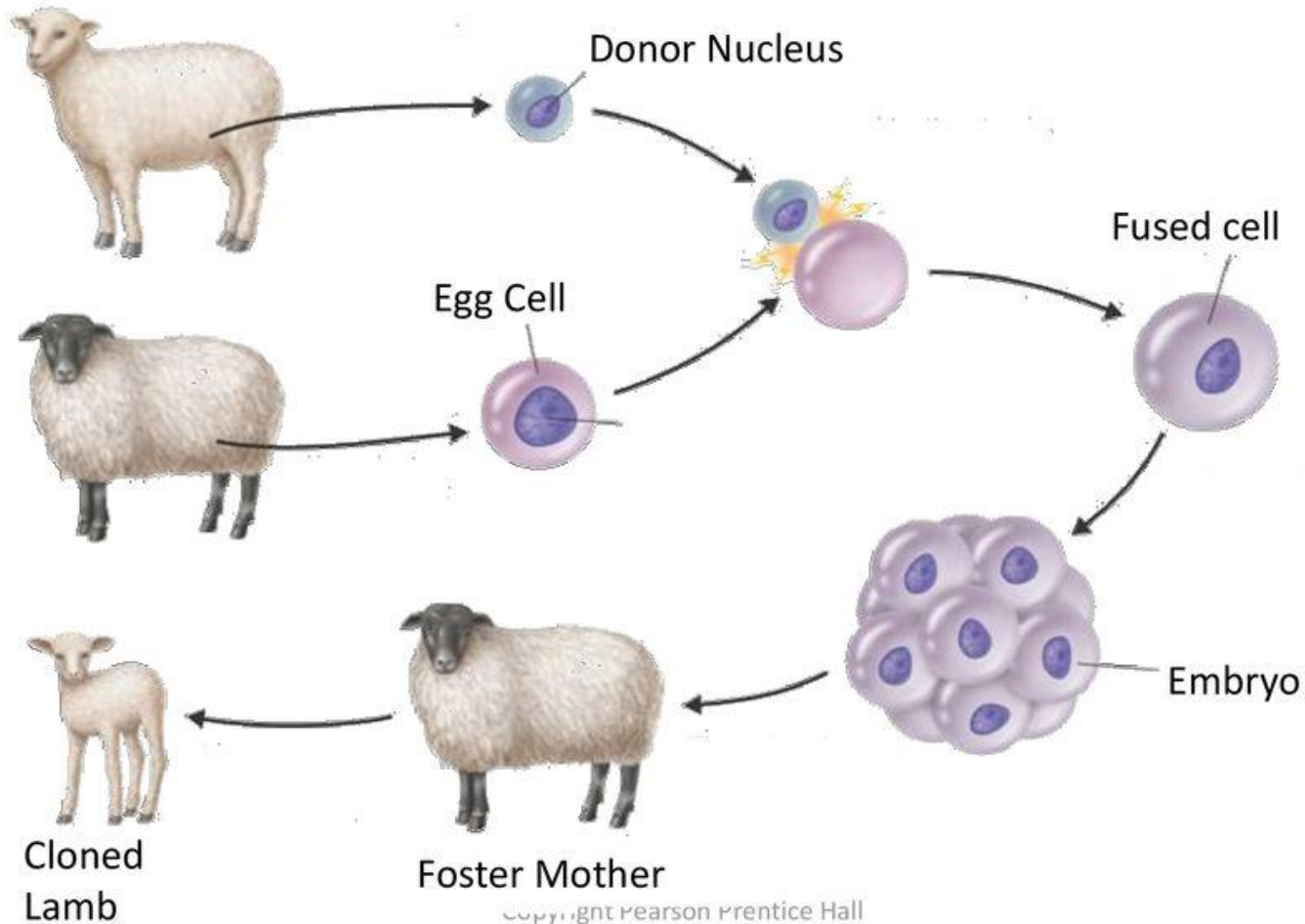


2.2. Clonació d'animals

- Més complexa que a les plantes (no es coneixen cèl·lules totipotents).
- Les cèl·lules embrionàries en les primeres fases del desenvolupament poden formar un individu complet.
- Exemples:
 - Ovella Dolly, 1996/97.
 - Clonació de vaques, 1998.
 - Clonació de porcs, 2000.
 - Copycat, 2002, el primer moix clonat de la història.

Cloning

- Cloning Dolly



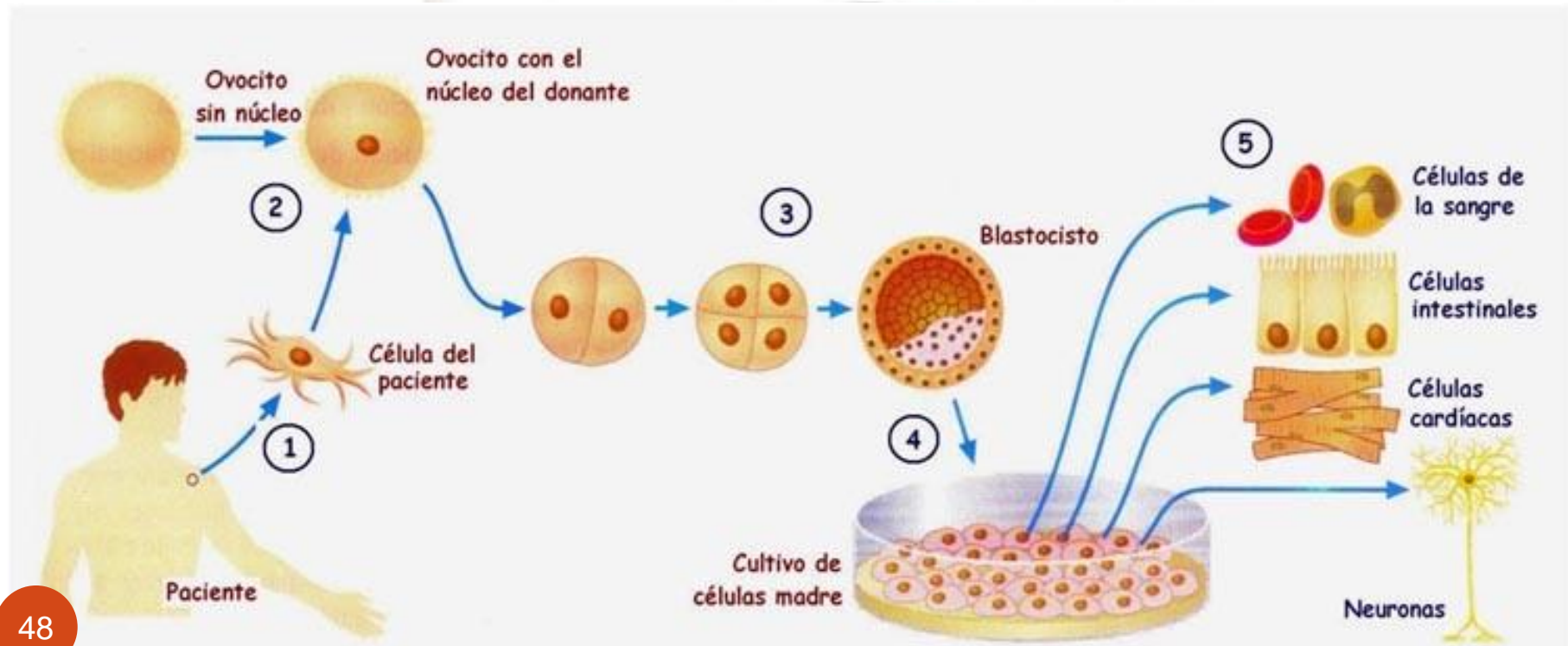
2.3. Clonació terapèutica

- Pot suposar una solució als problemes de transplantaments per falta de donants i/o d'òrgans compatibles.
- Amb les mateixes cèl·lules del pacient, cultivades en el laboratori es poden originar cèl·lules, teixits i òrgans que el pacient necessiti.
- La dificultat radica en que les cèl·lules d'un adult estan diferenciades, per lo que es complicat que es transformin en un tipus cel·lular diferent.
- Les cèl·lules amb capacitat de formar diversos tipus cel·lulars es diuen **cèl·lules mare pluripotents**.
- La utilització de cèl·lules mare per curar malalties rep el nom de **teràpia cel·lular** (diabetis, leucèmia infantil, infart de miocardi, etc).

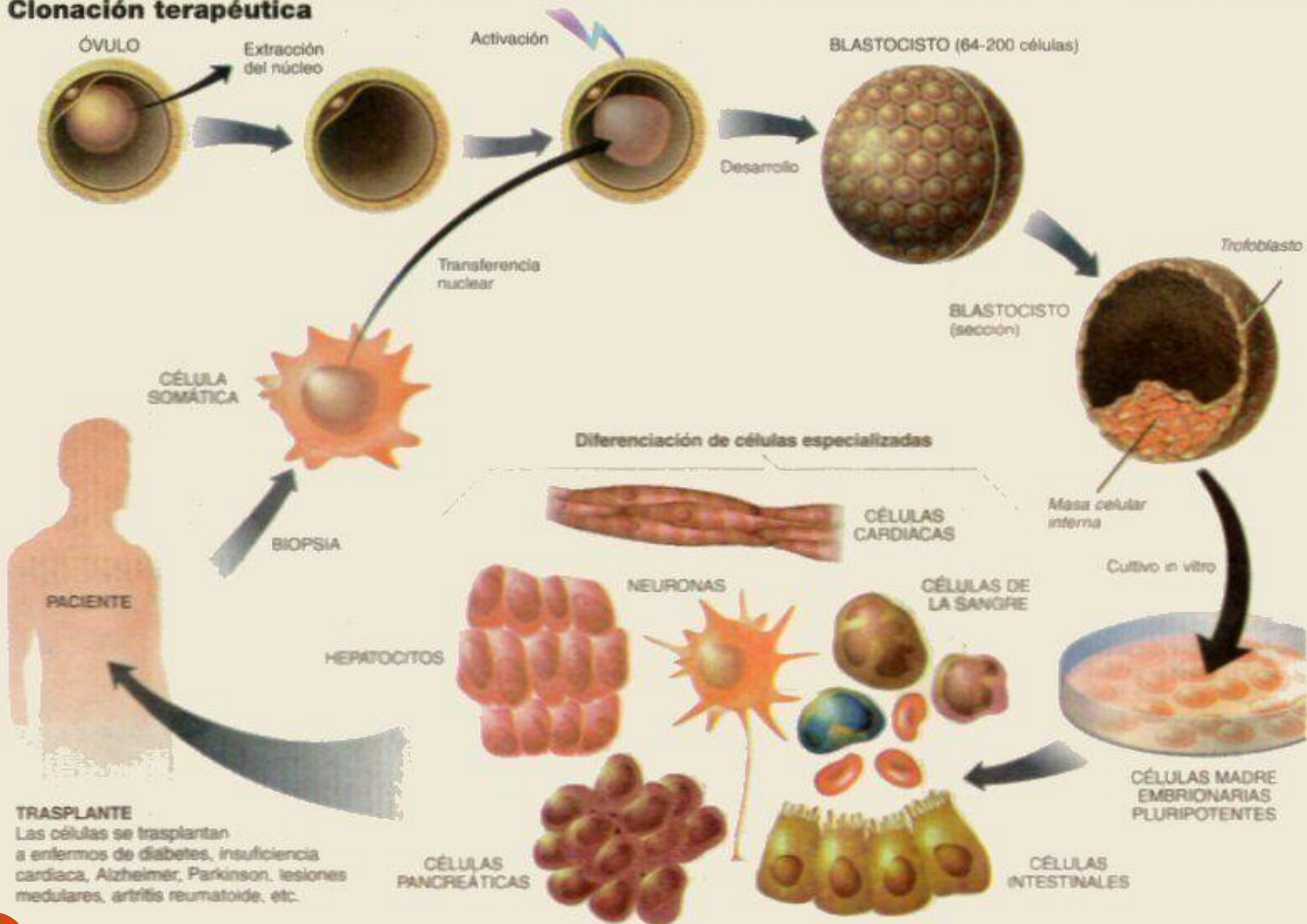
2.3.1. Cèl·lules mare embrionàries

- Són cèl·lules cultivades obtingudes a partir de masses de cèl·lules internes no diferenciades de la primera fase de l'embrió humà (blastocist, 50 i 150 cèl·lules).
- La recerca amb cèl·lules mare embrionàries humanes és molt controvertida ja que per iniciar un nou llinatge cel·lular, cal la destrucció de l'embrió i per tant d'un ésser humà en potència.
- En un intent de superar aquests problemes, morals, polítics i ètics, els investigadors ètics han estat experimentant amb tècniques alternatives d'obtenció de cèl·lules mare per extracció sense que això representi la destrucció de l'embrió humà.
- Les cèl·lules mare del cordó umbilical són derivades de la sang de la placenta i el cordó umbilical després de néixer.

- La transferència nuclear somàtica consisteix en introduir el nucli d'una cèl·lula somàtica en un òocit enucleat.
- Quan aquest arriba al cinquè dia es poden obtenir cèl·lules mare pluripotents (procés denominat **clonació terapèutica**).



Clonación terapéutica



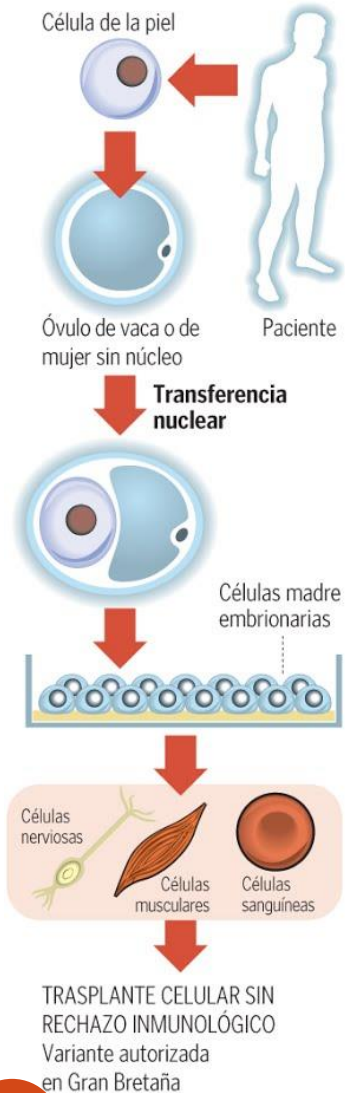
2.3.2. Cèl·lules mare adultes

- L'ús de cèl·lules mare embrionàries planteja problemes tant de caire pràctic com ètic.
- El 2001 Catherine Verfaillie va descobrir l'existència de cèl·lules mare adultes multipotents a la medul·la òssia.
- Aquestes cèl·lules presenten tres característiques bàsiques:
 - Són fàcils d'aconseguir (mitjançant una punció).
 - No presenten problemes d'histocompatibilitat, ja que poden provenir del mateix malalt.
 - No originen tumors (menor taxa de proliferació).
- En els éssers humans s'han trobat aquestes cèl·lules a la medul·la òssia, al teixit adipós, al cordó umbilical, a la placenta, al cervell, al múscul cardíac, etc.

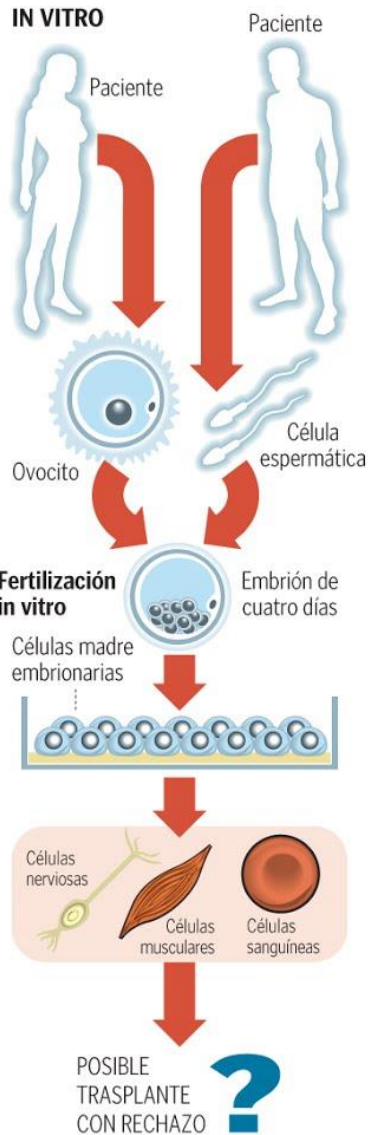
DIFERENTES FORMAS DE OBTENER CÉLULAS MADRE

Células madre embrionarias

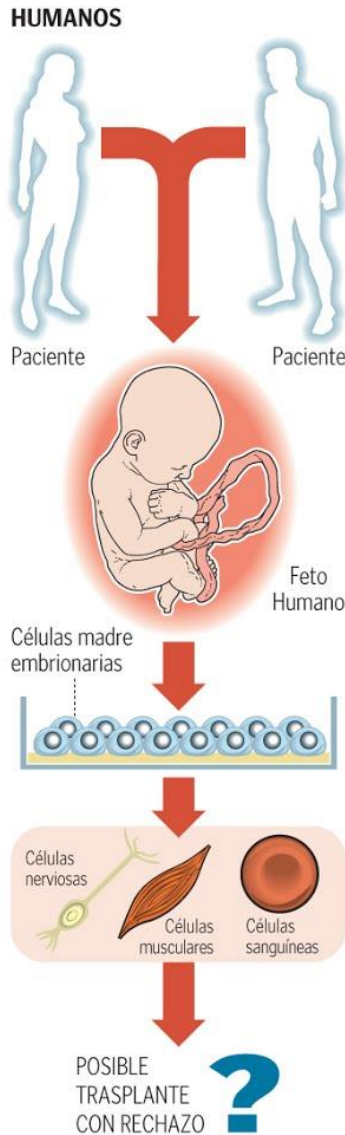
TÉCNICA DE TRANSFERENCIA NUCLEAR (CLONACIÓN TERAPÉUTICA)



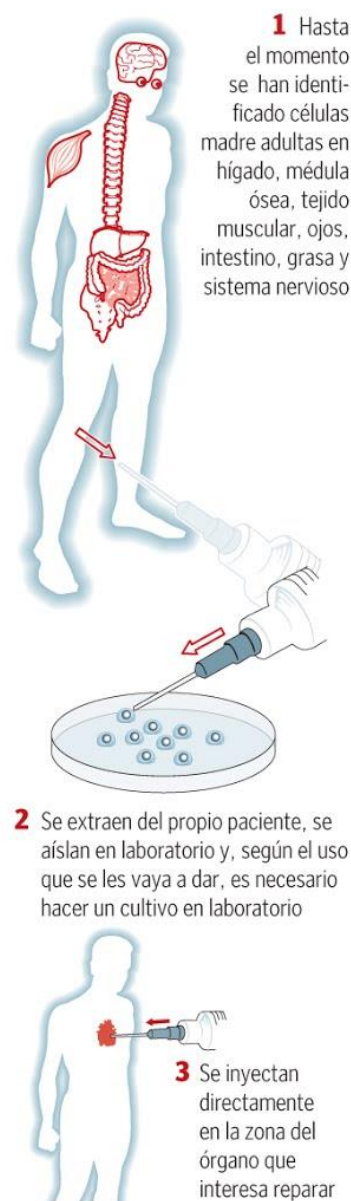
EMBRIONES OBTENIDOS POR FERTILIZACIÓN IN VITRO



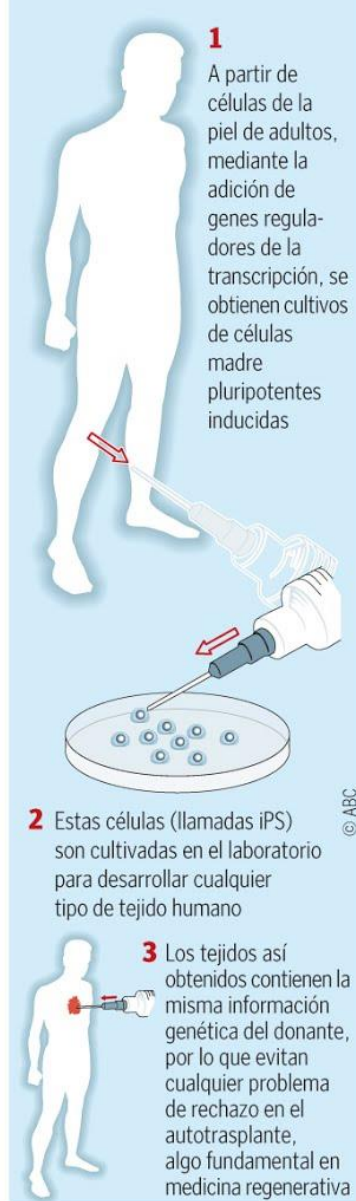
TEJIDOS FETALES HUMANOS



Células madre adultas



Células reprogramadas

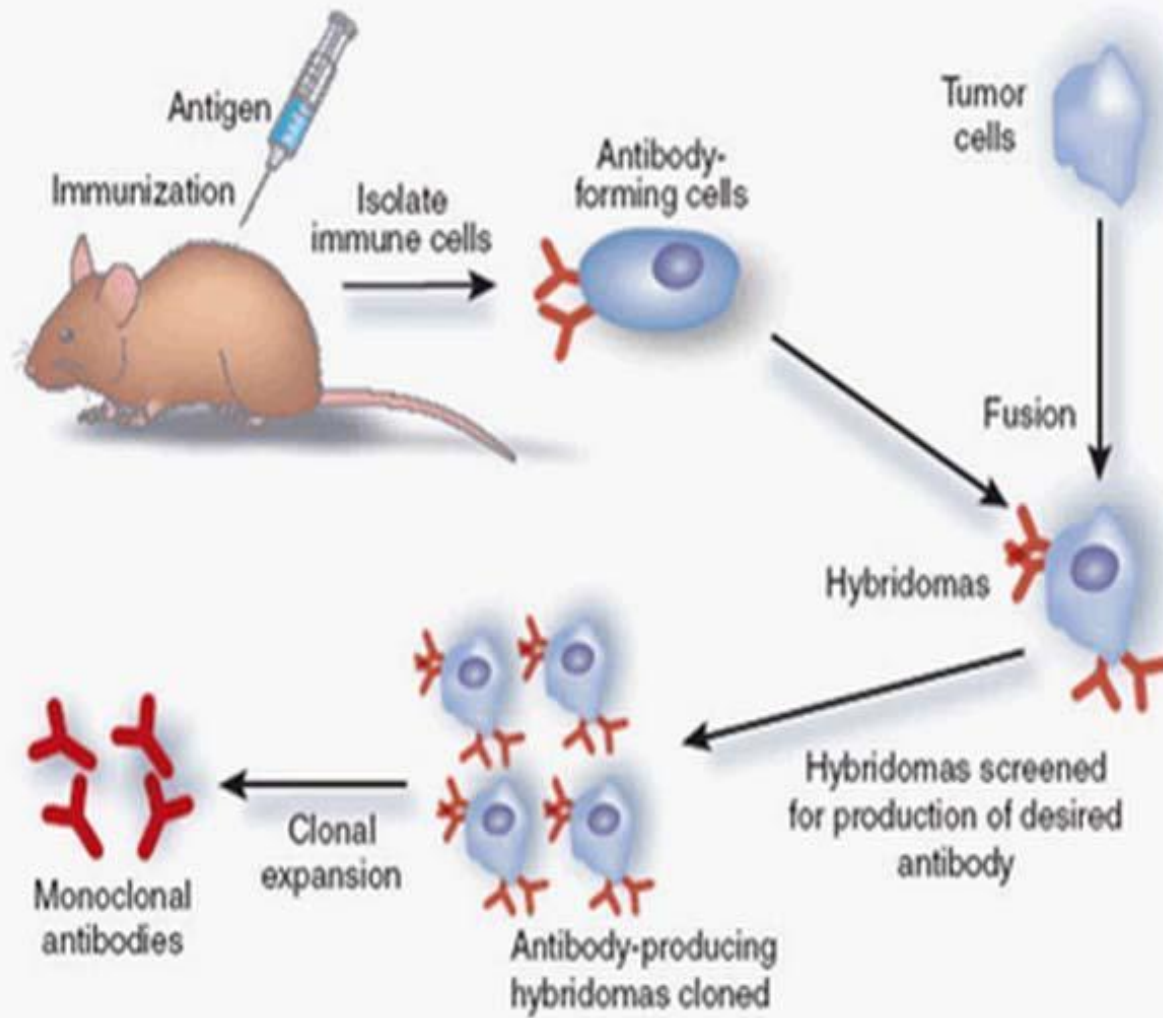


2.3.3. Cèl·lules mare i teràpia cel·lular

- Es poden distingir diferents tipus de cèl·lules mare en funció de la capacitat de diferenciar-se
 - **Totipotents:** les cèl·lules mare són produïdes per fusió d'un òvul i un espermatozoide així com les produïdes en les primeres divisions del zigot. Aquestes cèl·lules poden esdevenir qualsevol tipus cel·lular sense excepció.
 - **Pluripotents:** cèl·lules mare descendents de les totipotents que poden esdevenir qualsevol tipus cel·lular excepte les totipotents.
 - **Multipotents:** les cèl·lules mare només poden produir una família emparentada de cèl·lules diferenciades (les multipotencials hematopoètiques, per exemple, poden crear hematòcrits, limfòcits i plaquetes).
 - **Unipotents:** cèl·lules mare que només poden produir un tipus concret de cèl·lula, però amb capacitat d'autorenovar-se cosa que les diferencia de les no cèl·lules mare.

3. Els anticossos monoclonals

- Antigen → Limfòcits B → Cèl·lules plasmàtiques (B activats) → Anticossos
- Davant la primera exposició a un antigen, s'activaran diferents limfòcits que produiran diferents anticossos (**anticossos policlonals**), ja que cada un reconeixerà un determinant antigènic).
- Si es cultivés un determinat limfòcit al laboratori, aquest produiria un determinat tipus d'anticossos (**anticossos monoclonals**).
- Com que els limfòcits no es poden cultivar en el laboratori s'utilitzen **hibridomes** (cèl·lules canceroses fusionades amb un tipus de limfòcit).
- Els hibridomes permeten obtenir al laboratori anticossos monoclonals.



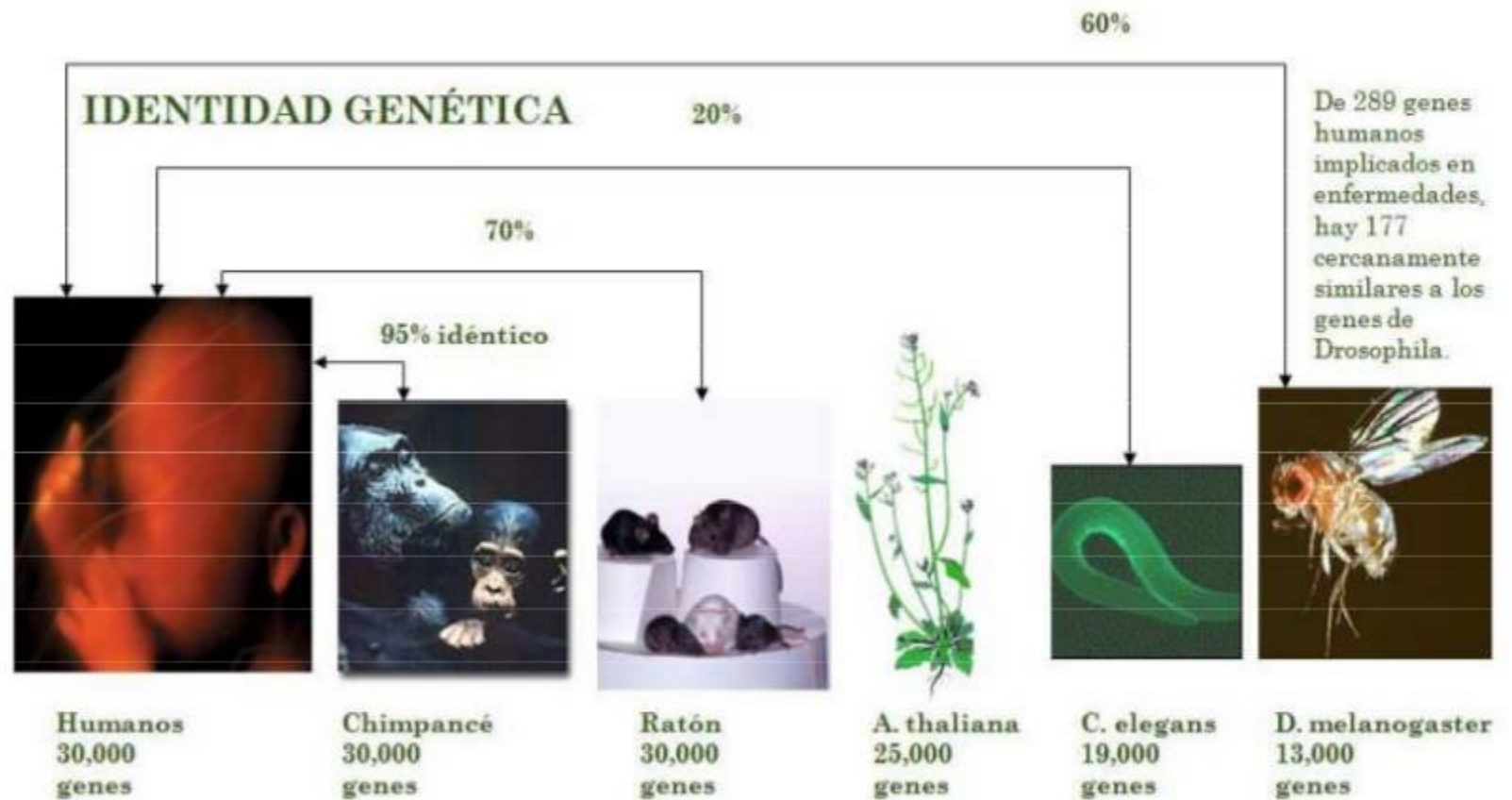
Production Of Monoclonal Antibodies

3.1. Aplicacions dels anticossos monoclonals

- **Investigació.** Poden ser emprats com marcadors de fluorescència (d'aquesta manera es pot saber a quin lloc s'uneixen els anticossos).
- **Diagnòstic de malalties:**
 - Exemple: prova pel diagnòstic de la Sida.
- **Tractament de malalties:**
 - Càncer. Producció d'anticossos que s'uneixin a marcadors de cèl·lules tumorals. Aquest anticossos poden anar acompanyats de substàncies radioactives o citotòxiques.
- Abans, la major part dels anticossos monoclonals procedien de ratolins; però gràcies a les tècniques d'enginyeria genètica avui en dia s'empren anticossos humanitzats.

4. El Projecte Genoma Humà

- Al final dels anys vuitanta es va proposar l'objectiu internacional de conèixer la seqüència de nucleòtids de l'ésser humà.
- Amb aquest propòsit, el 1988 es va fundar l'Organització del Genoma Humà (HUGO) i el 1990 es va iniciar l'anomenat **projecte Genoma Humà**.
- Una via de treball ha estat conèixer quin ordre tenen els gens i quina distància hi ha entre ells, la qual cosa s'anomena **mapa genètic humà**.



4.1. Història del Projecte Genoma Humà

- Una vegada en marxa el projecte Genoma humà (HUGO) finançat amb fons públics es va unir a la cursa una empresa privada (CELERA), projecte que dirigia en Craig Venters.
- Finalment, al febrer de 2001 es van publicar els resultats d'aquests dos projectes (CELERA al Science i HUGO al Nature).



4.2. Genoma Humà

- **Genòmica.** El terme genoma es refereix al contingut de DNA cel·lular total d'un organisme.
- La genòmica es va veure arran del projecte genoma.
- El DNA humà conté uns 20.000-25.000 gens (molts menys del que es pensava).
- Un 1'5% són exons, mentre que un 40% són introns, promotors o seqüències més o menys llargues.
- Finalment un 59% són seqüències més o menys repetides (part d'aquestes seqüències guarden relació amb els centròmers dels cromosomes).

4.3. Proteòmica

- **Proteòmica.** Conjunt de proteïnes d'un organisme.
- Hi ha moltes més proteïnes que gens (en funció de com maduri un mateix mRNA donarà lloc a diverses proteïnes).
- Es pot conèixer amb exactitud el patró genètic activat en cada ésser viu (estudi de malalties, estudis nutricionals, etc.).

4.4. Beneficis del Projecte Genoma Humà

- Permetrà tenir un patró normal de referència per a la teràpia gènica.
- Es podrà conèixer si els individus són portadors de malalties genètiques.
- Es podran prendre precaucions per prevenir malalties.

5. Riscos i implicacions ètiques de la biotecnologia

- Alguns membres de la comunitat científica han manifestat preocupació pel risc que suposa el seu ús.
- Es va crear el Comitè Internacional de Bioètica de la UNESCO per donar resposta a les qüestions plantejades sobre la biotecnologia.
- Es pretén evitar atemptar contra la dignitat humana i promoure que la ciència no sigui identificada com una activitat perillosa i sospitosa.

5.1. Criteris del Comitè Internacional de Bioètica de la UNESCO

- Els criteris bàsics establerts són:
 - Límits per motius ecològics i de sanitat.
 - Límits per motius ètics i morals.
 - Límits per motius socials.
 - Límits per motiu polítics.



5.2. Situació a Espanya

- El 2007 és va establir la Llei d'investigació bioètica.
- Existeixen comunitats lliures de transgènics: Astúries, Balears, País Basc e Illes Canàries.

