

L'ENGINYERIA GENÈTICA i LA BIOTECNOLOGIA



At harvest time Ted's ethical objections to the use of frog genes in potato breeding were conveniently forgotten.

L'enginyeria genètica i la biotecnologia

- Tècniques per introduir gens en cèl·lules.
- Producció de còpies de DNA.
- Obtenció de la proteïna que codifica el gen.
- Introducció de gens en cèl·lules humanes.
- Obtenció de vacunes recombinants.
- Obtenció d'un animal transgènic.
- Obtenció d'una planta transgènica.
- La clonació reproductiva.
- Medicina regenerativa. Clonació terapèutica. Cèl·lules mare.

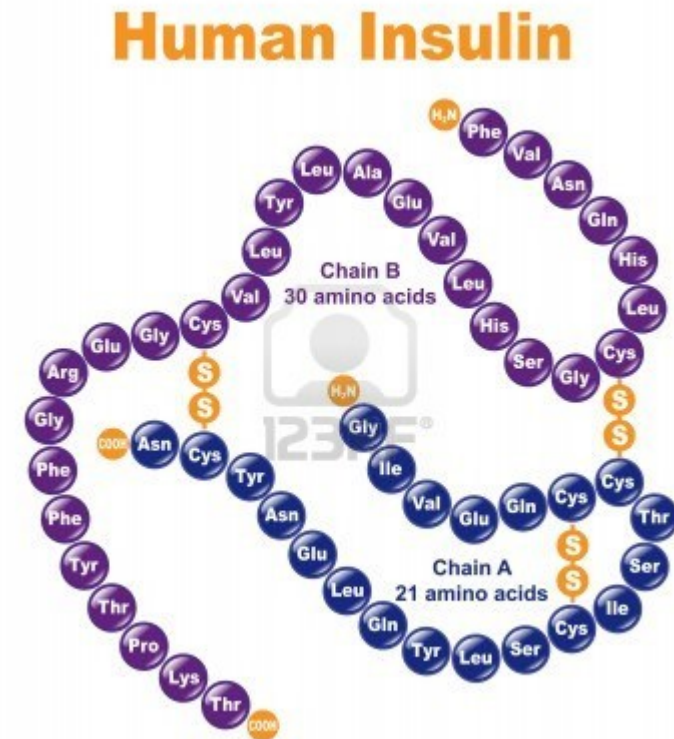
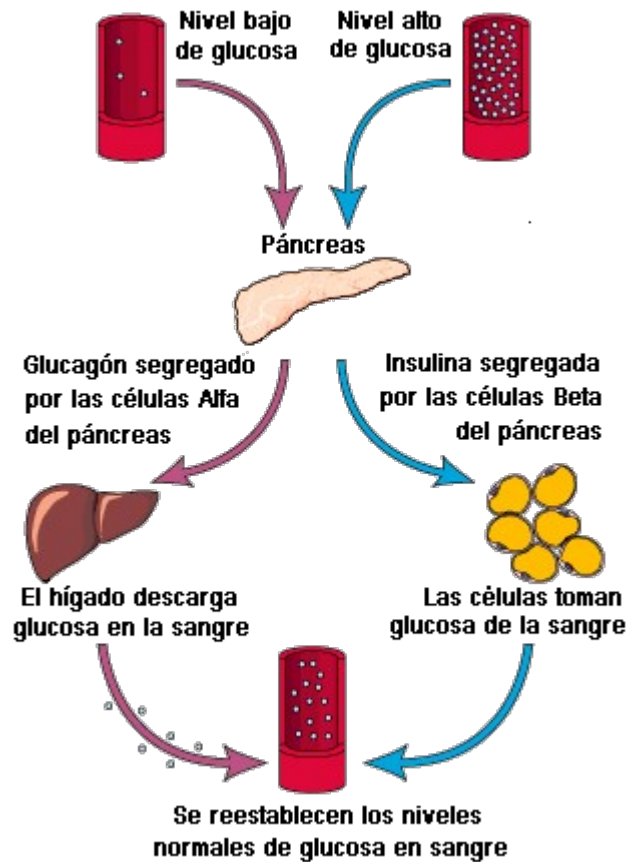
Obtenció de la proteïna que codifica un gen

Exemple

Obtenció de la insulina humana

Insulina:

- Hormona proteica que regula el nivell de glucosa a la sang.
- Segregada pel pàncrees.
- Formada per dos cadenes peptídiques: el pèptid A (21 aminoàcids) i el pèptid B (30 aminoàcids)

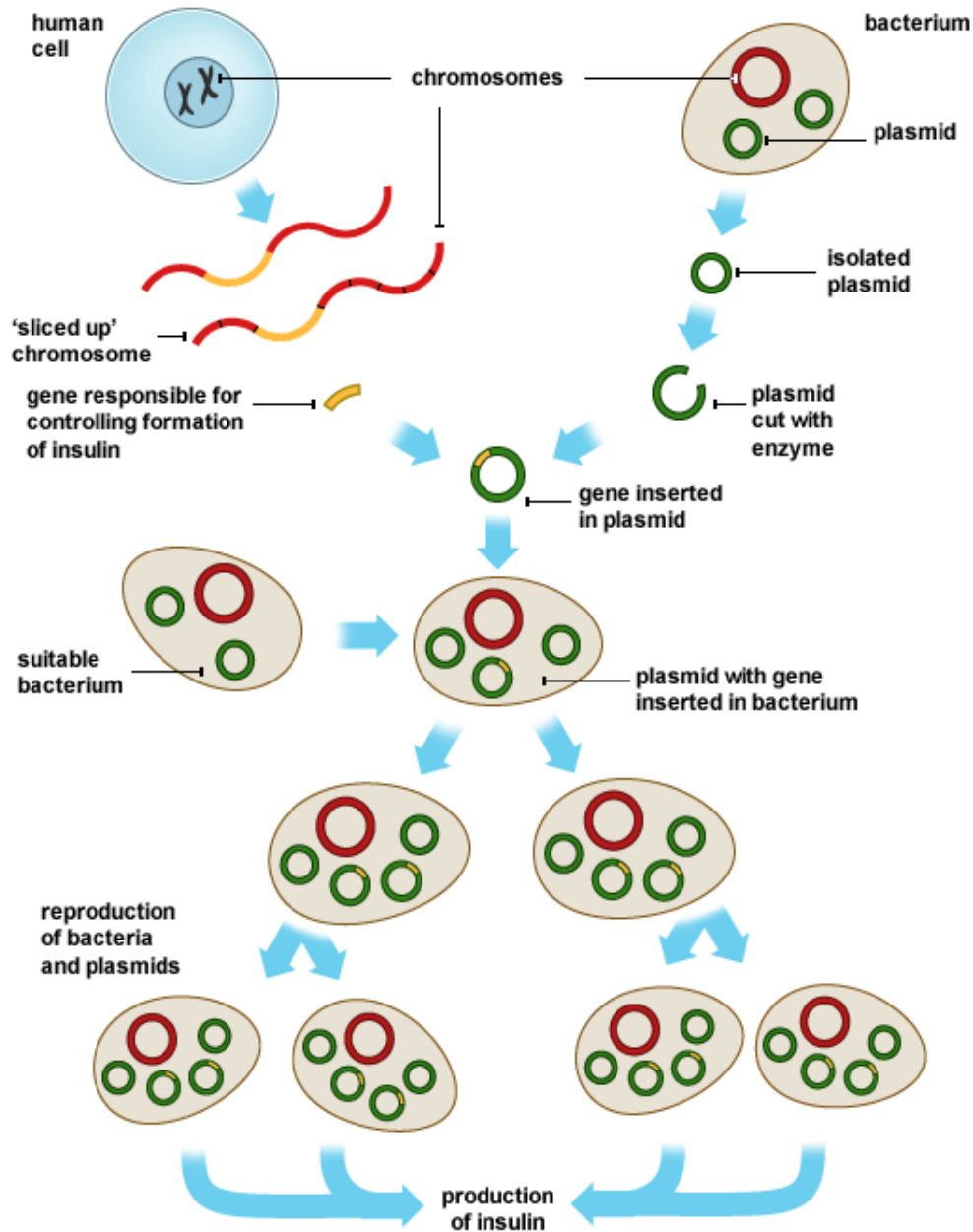


Diabetis mellitus

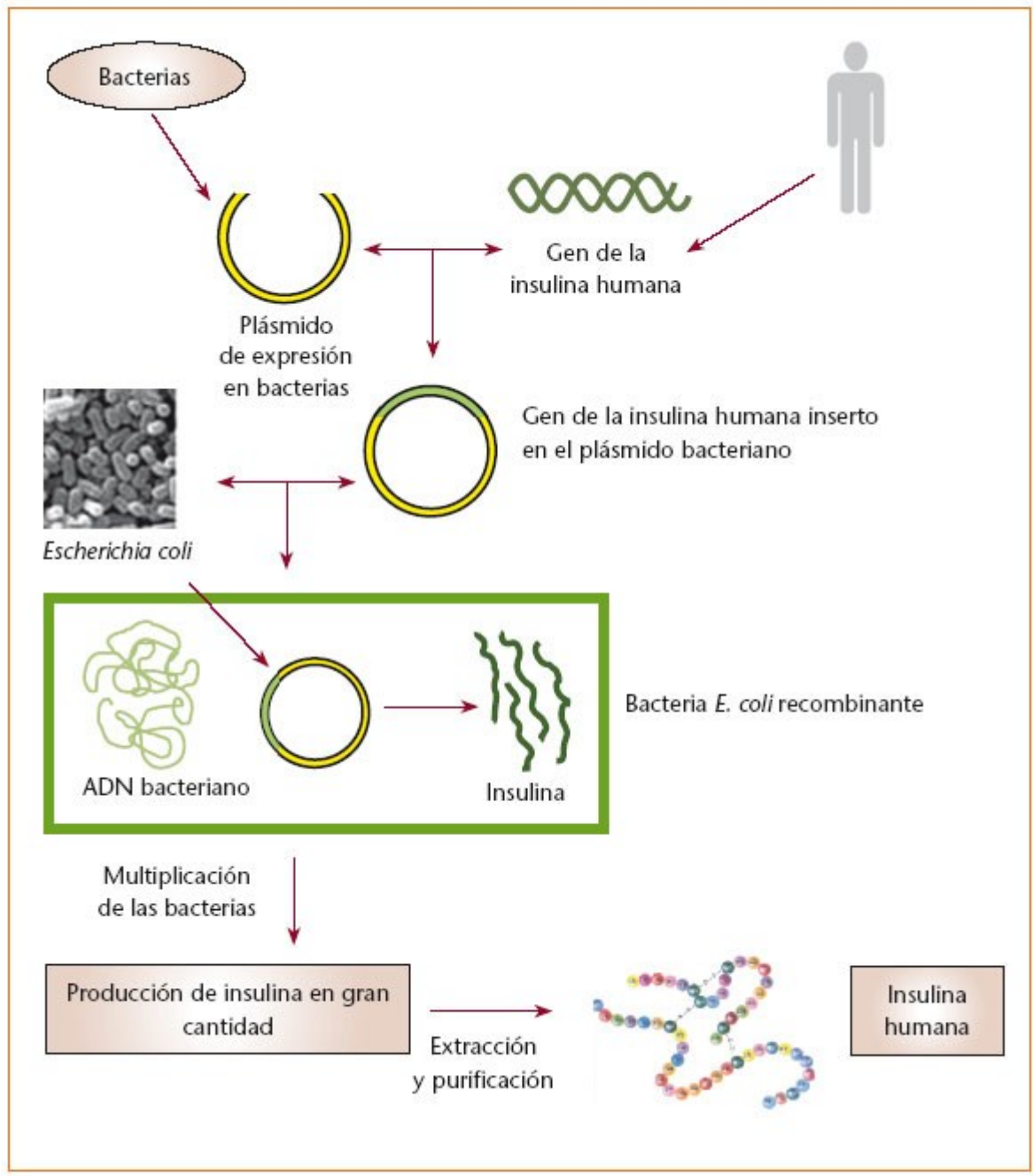
- Malaltia genètica provocada per poca o nul·la producció d'insulina.
- Alt nivell glucosa en sang i poc en les cèl·lules.
- **Tractament**: mesurar el nivell de glucosa en sang i **injectar insulina**.
- Antigament extracció *insulina porcina*.
- Des de 1978, **bacteris transgènics fabriquen insulina humana**.
- Com que el metabolisme bacterià és molt elevat, aquesta via d'obtenció de insulina és molt rendible. A més, al ser humana, es redueixen els problemes de rebuig.



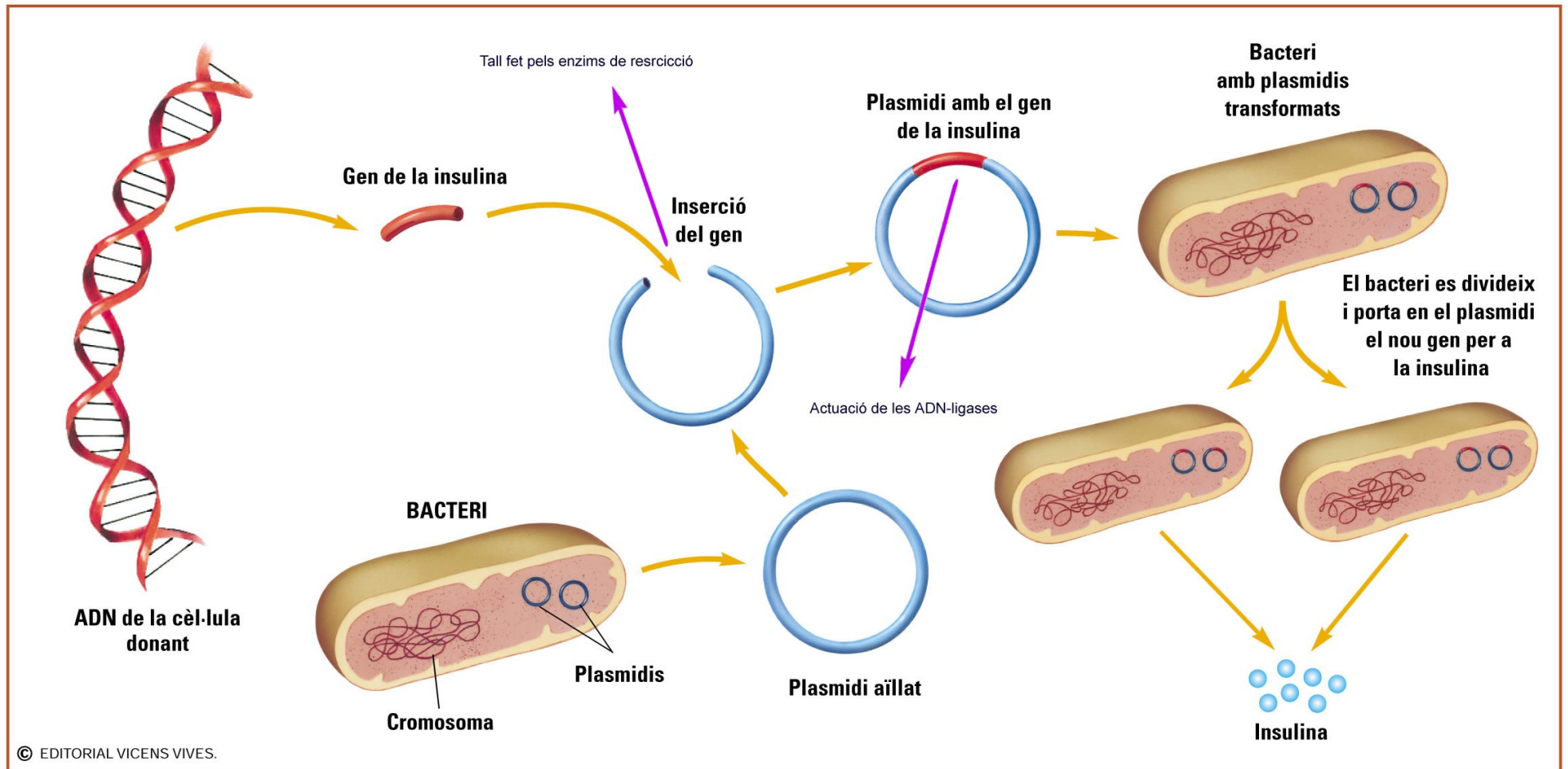
Mecanisme simplificat del procés d'obtenció d'insulina humana.



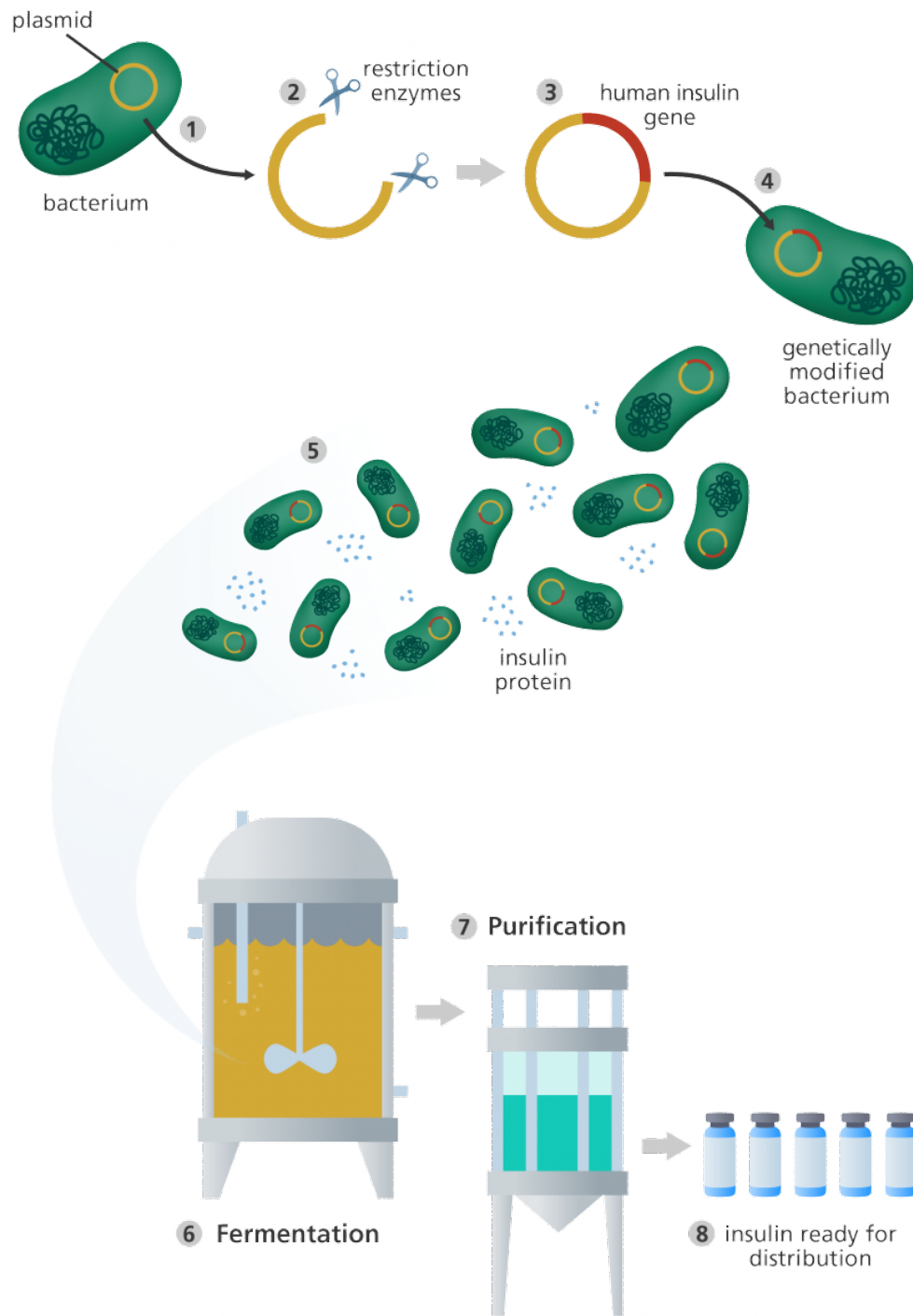
- Aïllament del gen de la insulina humana.
- Aïllament d'un plasmidi bacterià.
- Fragmentació de tots dos DNA pel mateix enzim de restricció.
- Inserció del gen de la insulina en el plasmidi.
- Inserció del plasmidi híbrid en un altre bacteri per transformació.
- Selecció dels bacteris que han incorporat el plasmidi amb el gen.
- Cultiu dels bacteris transgènics: els nous bacteris produeixen insulina gràcies al gen inserit.
- Extracció i purificació de la insulina per procediments industrials.



Mecanisme simplificat del procés d'obtenció d'insulina humana.

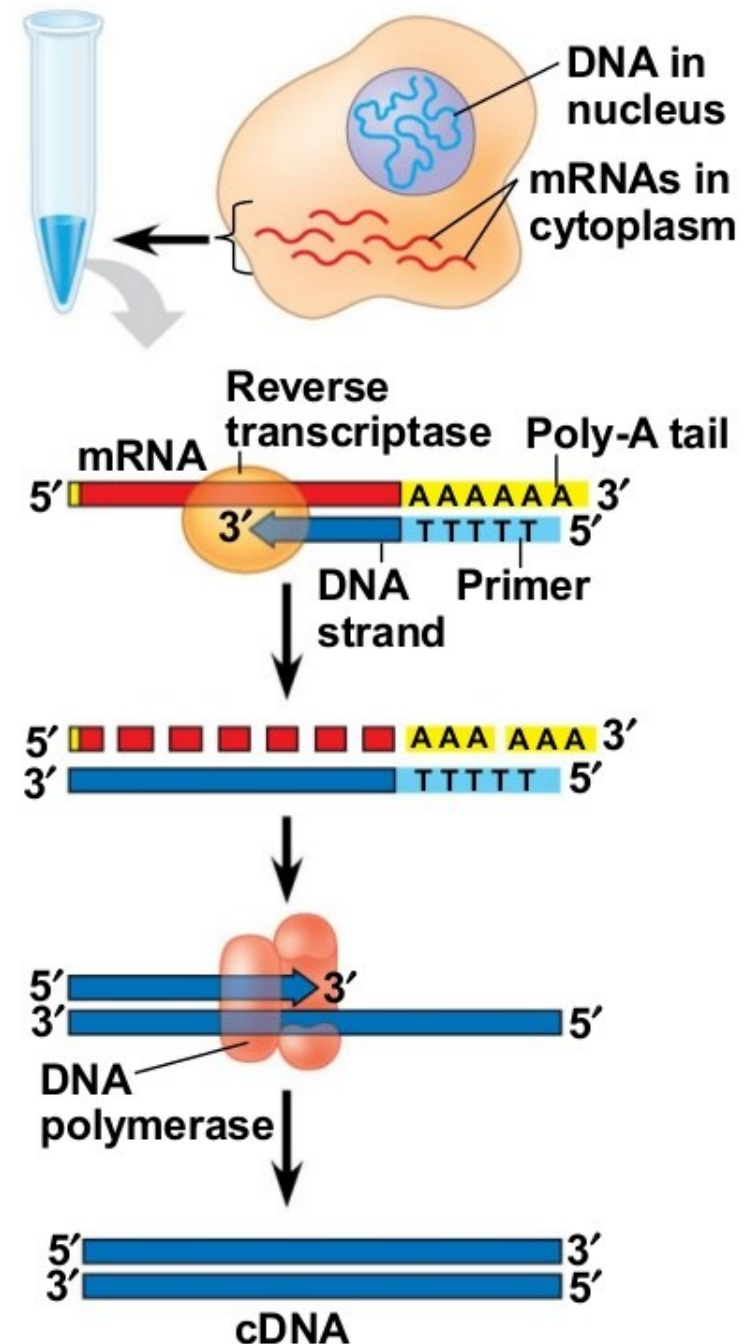


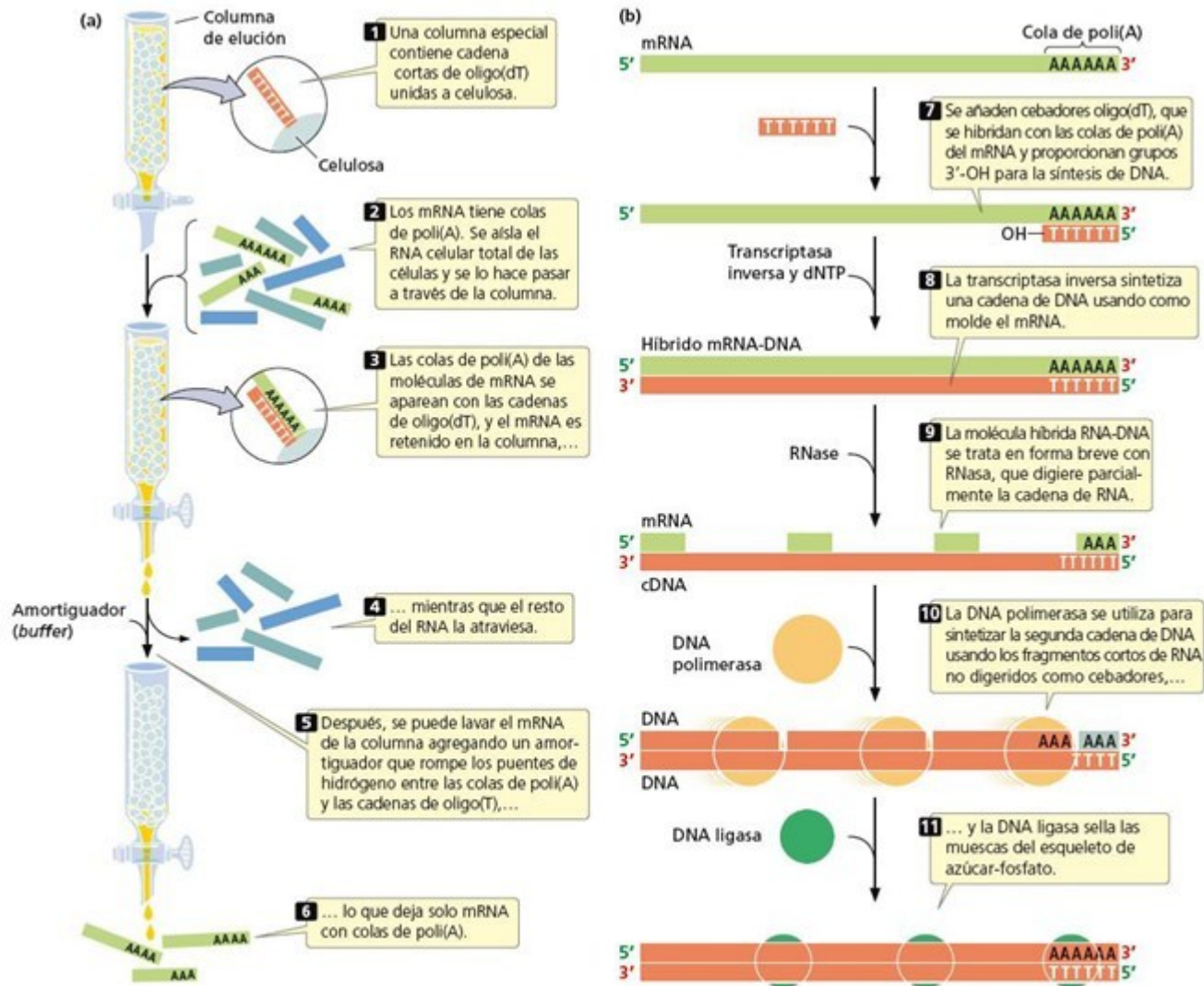
Mecanisme simplificat del procés d'obtenció d'insulina humana.



Procés d'obtenció de la insulina humana:
aprofundim una mica més...

Com que en els procarïotes no hi ha procés de maduració del mRNA, **si el que es vol és obtenir la proteïna que codifica un gen eucariòtic en un bacteri**, no es pot introduir el segment de DNA amb introns i exons tal qual, **prèviament s'ha d'aïllar el mRNA madur del gen d'interès i fer una transcripció inversa** (mitjançant l'enzim anomenat *transcriptasa inversa* o *retrotranscriptasa*) per tal d'obtenir un DNA sense introns que, un cop duplicat (DNAc) ja podrà ser combinat amb el plasmidi i introduït posteriorment al bacteri.





Genética. Un enfoque conceptual. 5ª ed. B.A. Pierce

© W.H. Freeman and Co.

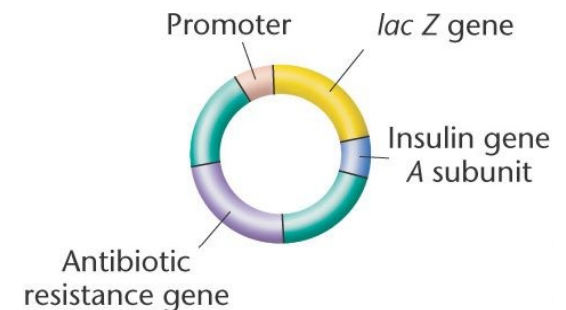
© Traducción Editorial Médica Panamericana.

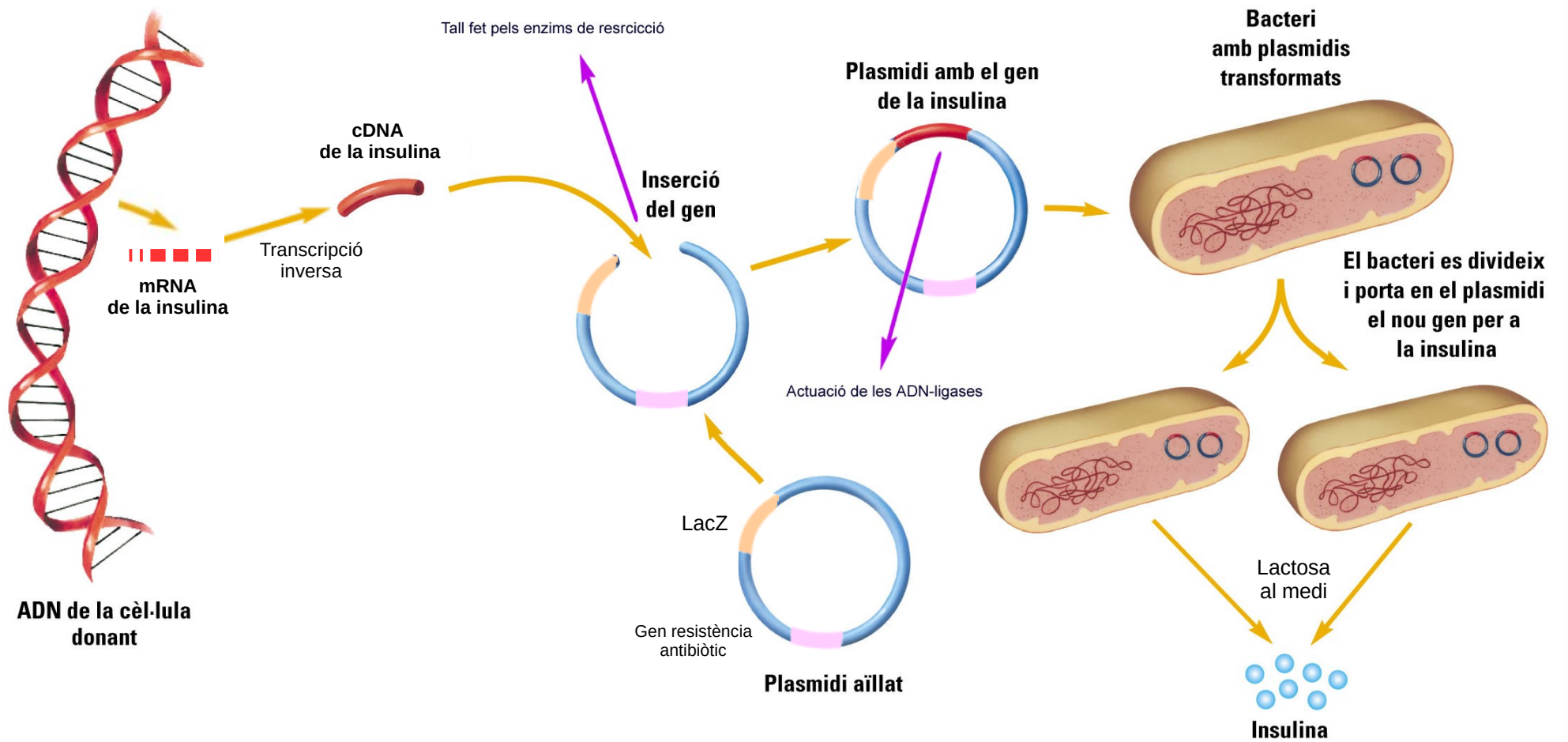
Síntesi d'un cDNA mitjançant la transcriptasa inversa:

S'afegeix al medi un encebador d'oligodT que s'aparellarà amb la cua poli A de l'extrem 3'OH del mRNA, proporcionant un extrem 3'OH per a que la transcriptasa inversa comenci la síntesi de DNA a partir del motlle de RNA i de desoxinucleòtids. Resulta així una molècula híbrida RNA-DNA que s'ha de convertir en una molècula de cDNA bicatenària. Un mètode molt comú per fer-ho és tractar l'híbrid amb una RNAasa que digereix parcialment el RNA. La digestió parcial deixarà petits fragments de RNA que serviran d'encebadors per a que una DNA polimerasa sintetitzi una segona cadena de DNA utilitzant la primera cadena com a motlle. Finalment, una altra DNA polimerasa reemplaçarà els fragments de RNA per DNA i una DNA ligasa tancarà les unions.

Procés per a l'obtenció de la insulina humana

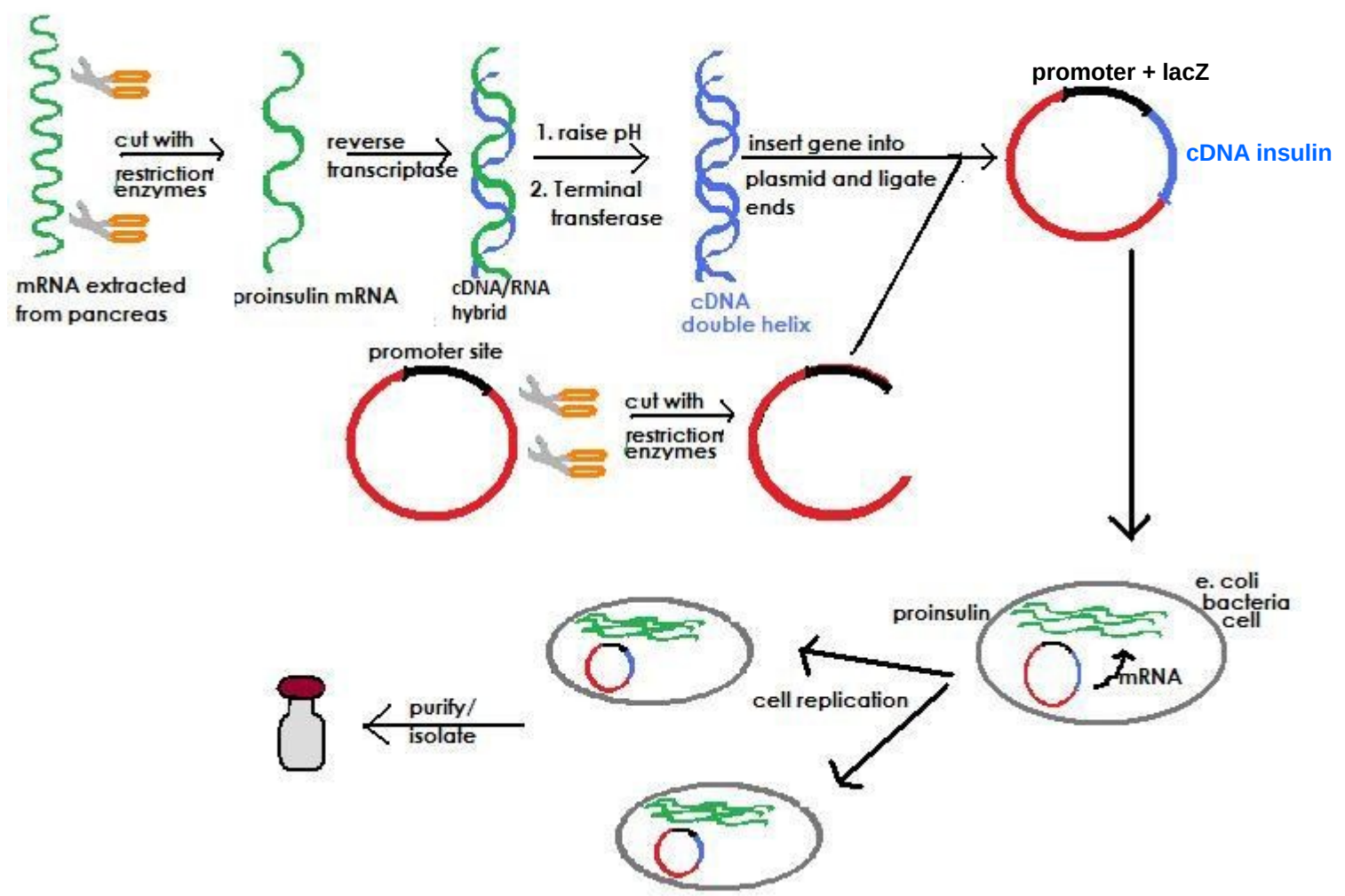
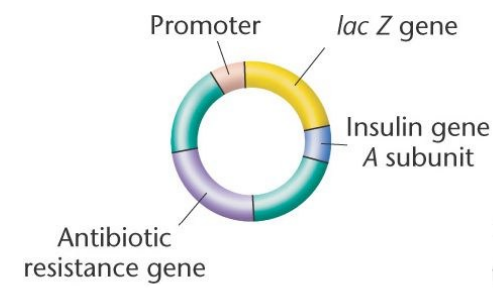
- Extracció del mRNA de la insulina d'una cèl·lula humana sana.
- A partir del mRNA obtenció del cDNA per transcripció inversa.
- Inserció del cDNA en un plasmidi bacterià, *darrera d'un operò LAC* i portador d'un gen marcador de resistència a un antibiòtic.
- Introducció del plasmidi híbrid en un altre bacteri per transformació.
- Selecció dels bacteris que han incorporat el gen de la insulina: cultiu del bacteri en un medi amb antibiòtic, fins tenir una gran població de bacteris amb el gen de la insulina.
- Afegir lactosa al medi, els bacteris comencen així a sintetitzar la proteïna.
- Extracció, purificació i comercialització de la proteïna.





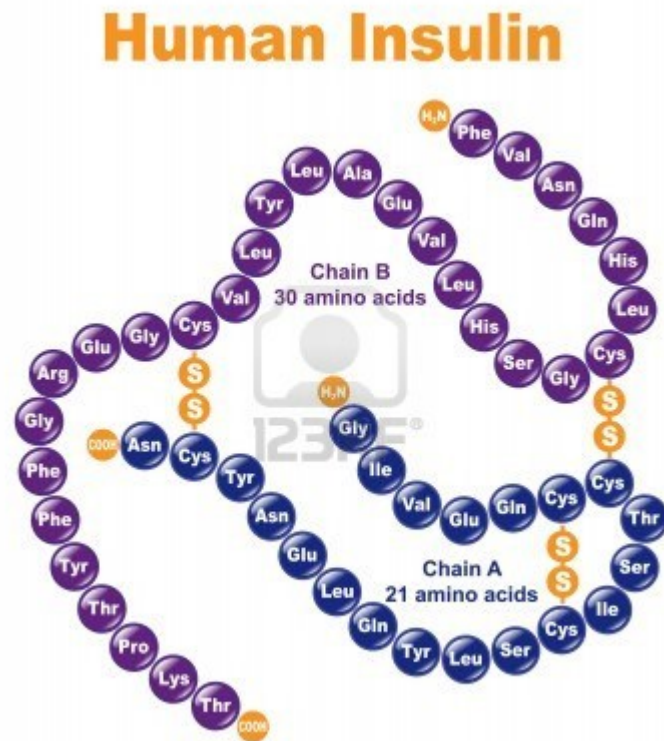
© EDITORIAL VICENS VIVES.

Procés d'obtenció d'insulina humana



La insulina és una proteïna formada per dos cadenes peptídiques: el pèptid A (21 aminoàcids) i el pèptid B (30 aminoàcids).

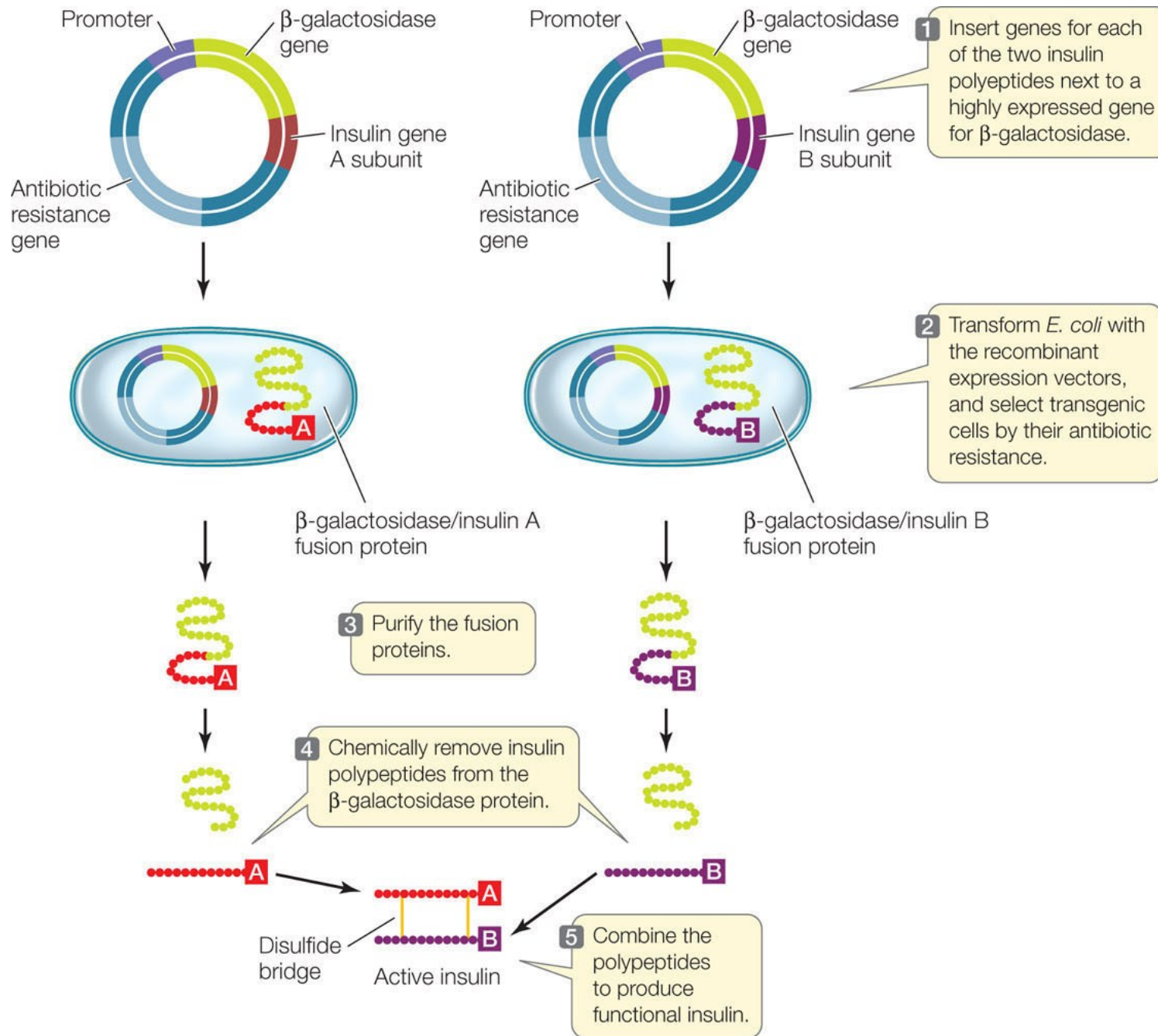
Cada cadena està codificada per un gen diferent.

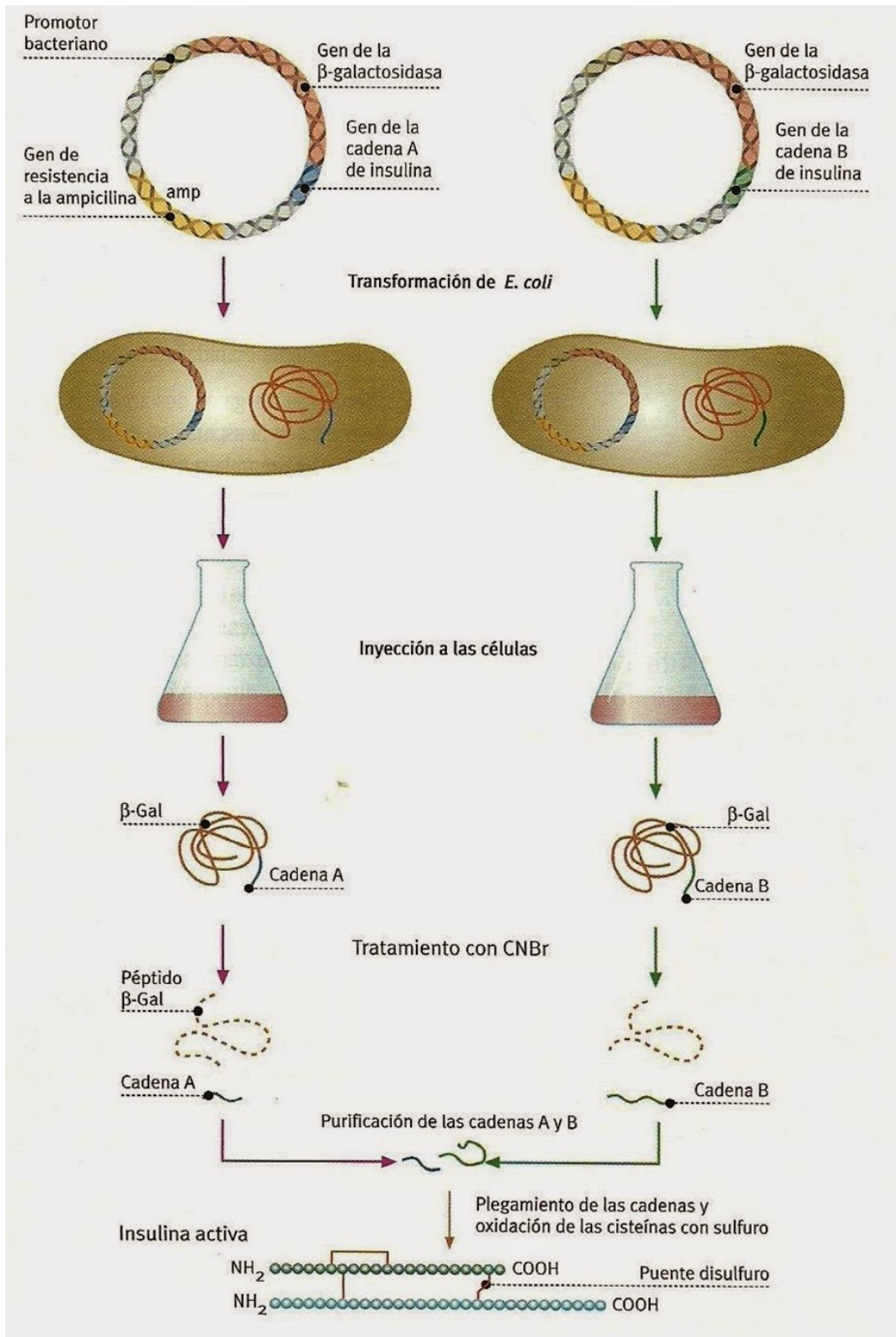


Per tant el procés d'obtenció de la insulina s'ha de fer per a cadascuna de les dues cadenes.

Un cop es tenen els dos pèptids aïllats, s'activen els grups SH- per unir els dos pèptids amb ponts disulfur.

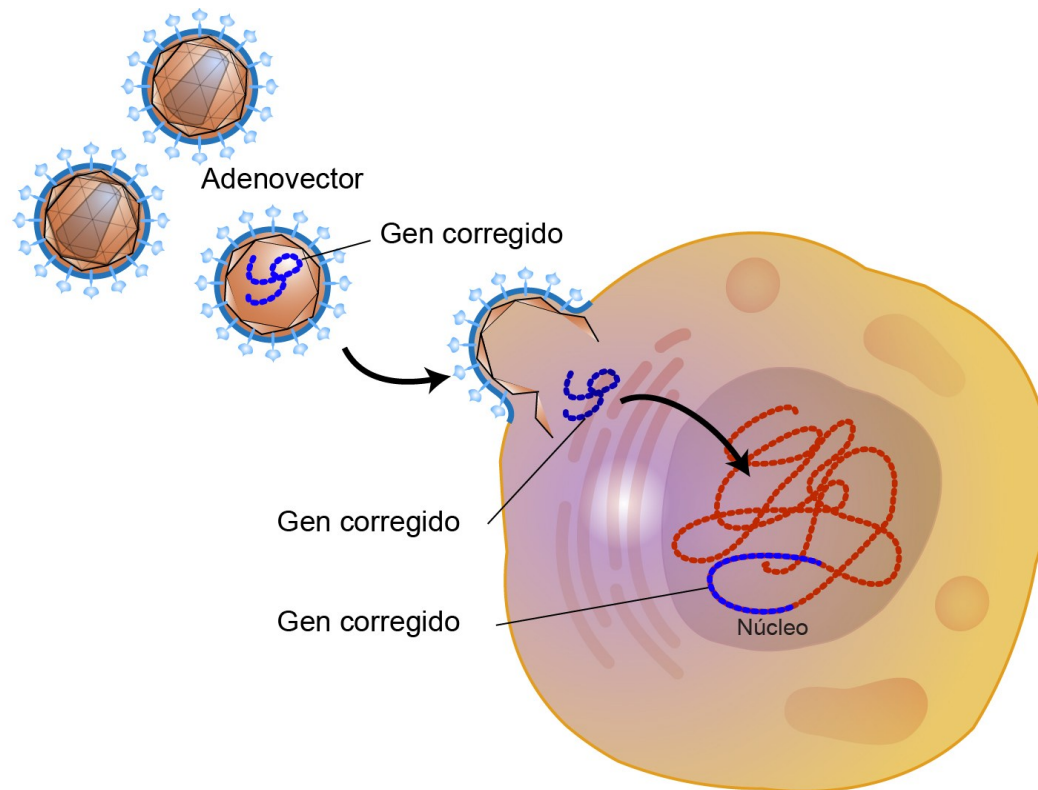
D'aquesta manera la insulina humana madura ja està llesta per ser comercialitzada.

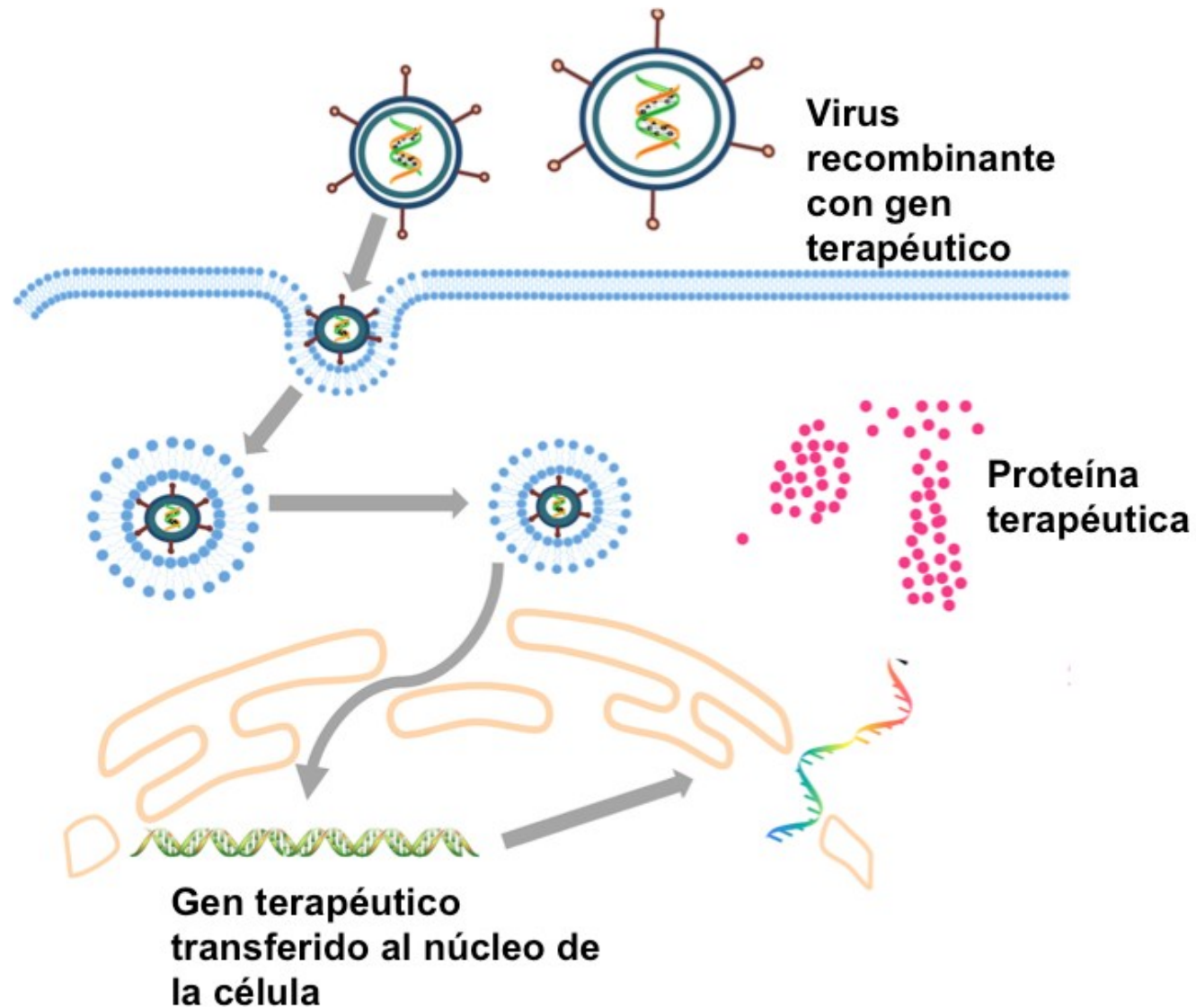




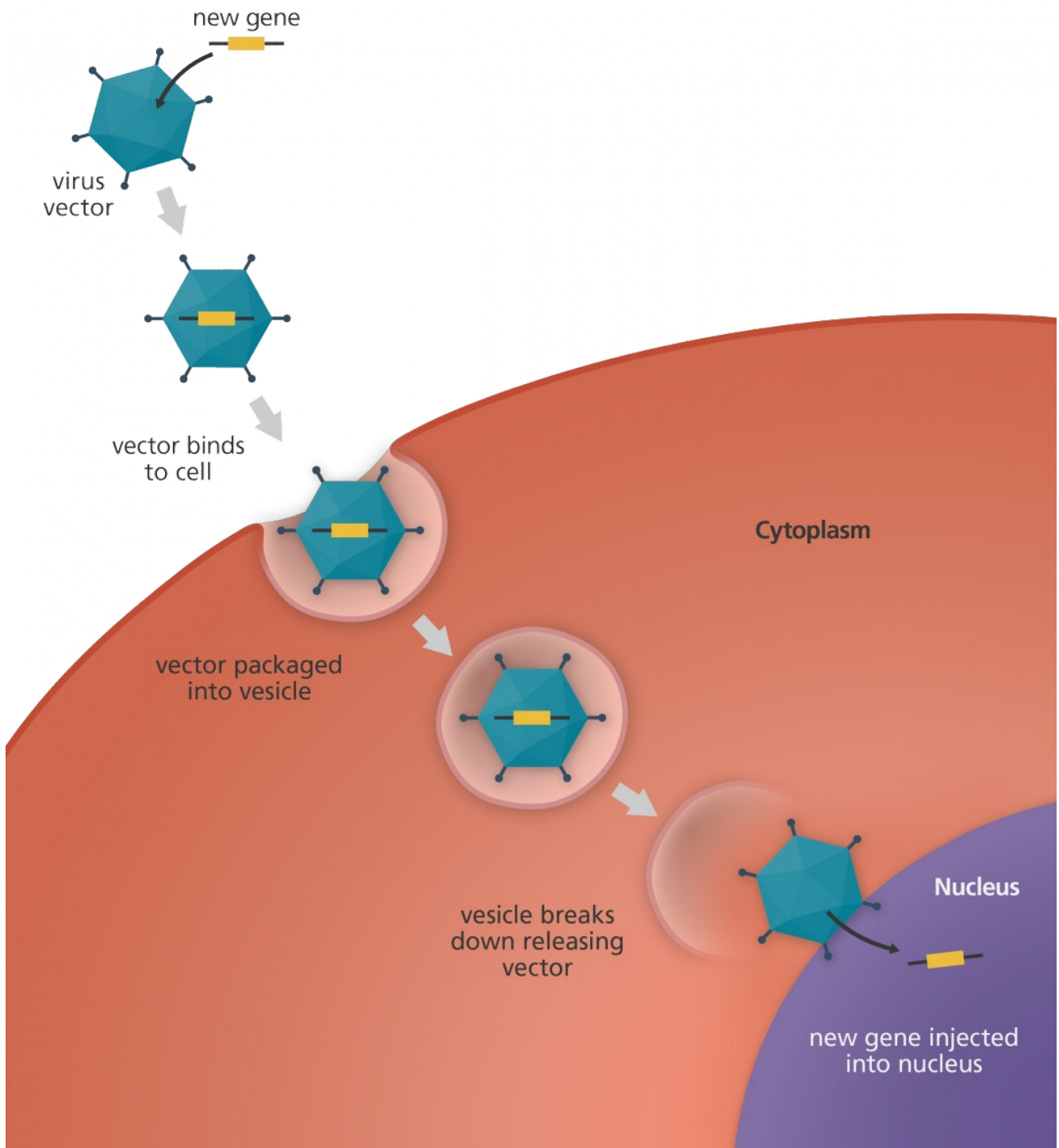
Introducció de gens en cèl·lules humanes

Una de les vies seguides en teràpia gènica és la **introducció del gen correcte a les cèl·lules humanes** mitjançant **virus** com a vectors (retrovirus, adenovirus, herpesvirus...).

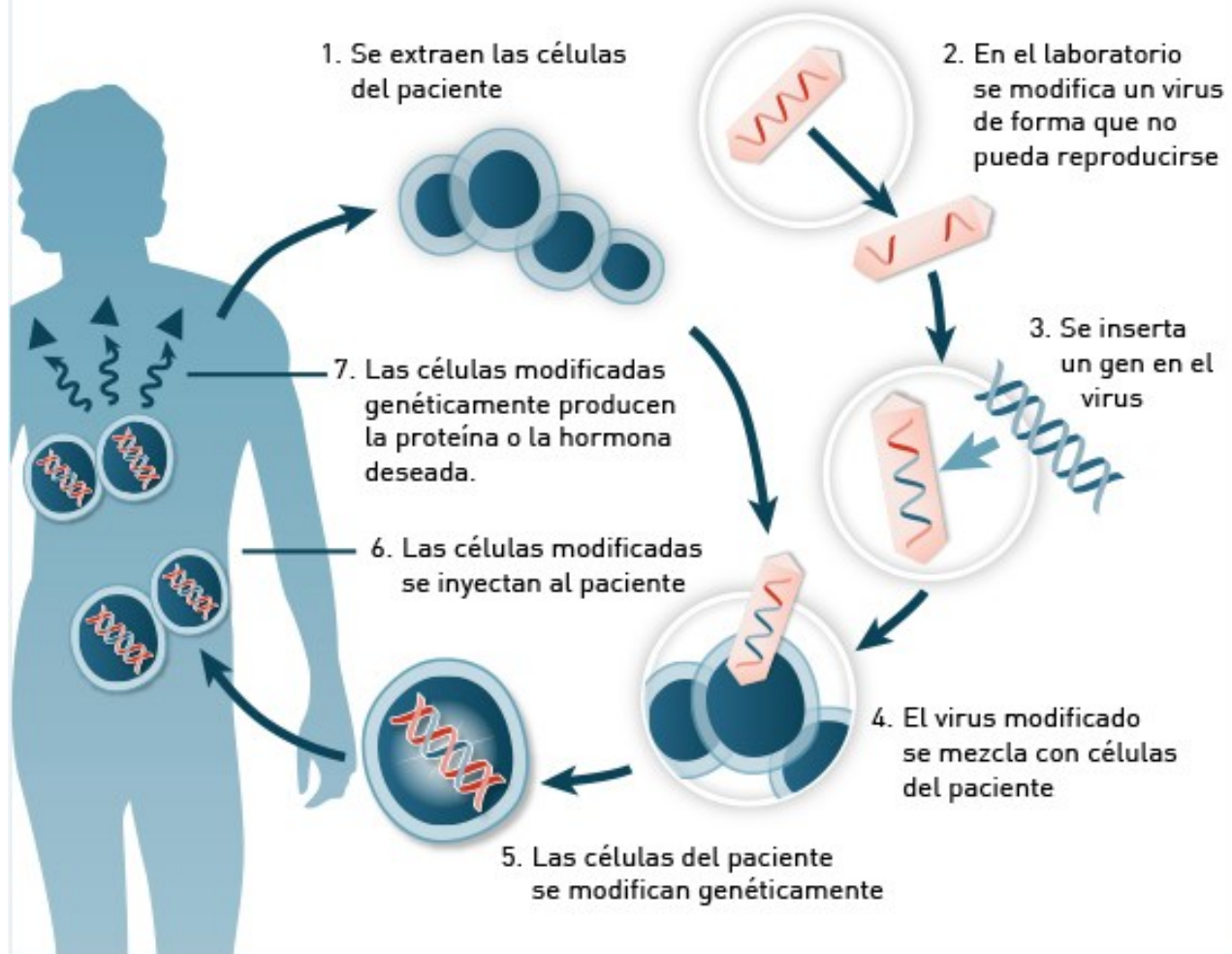


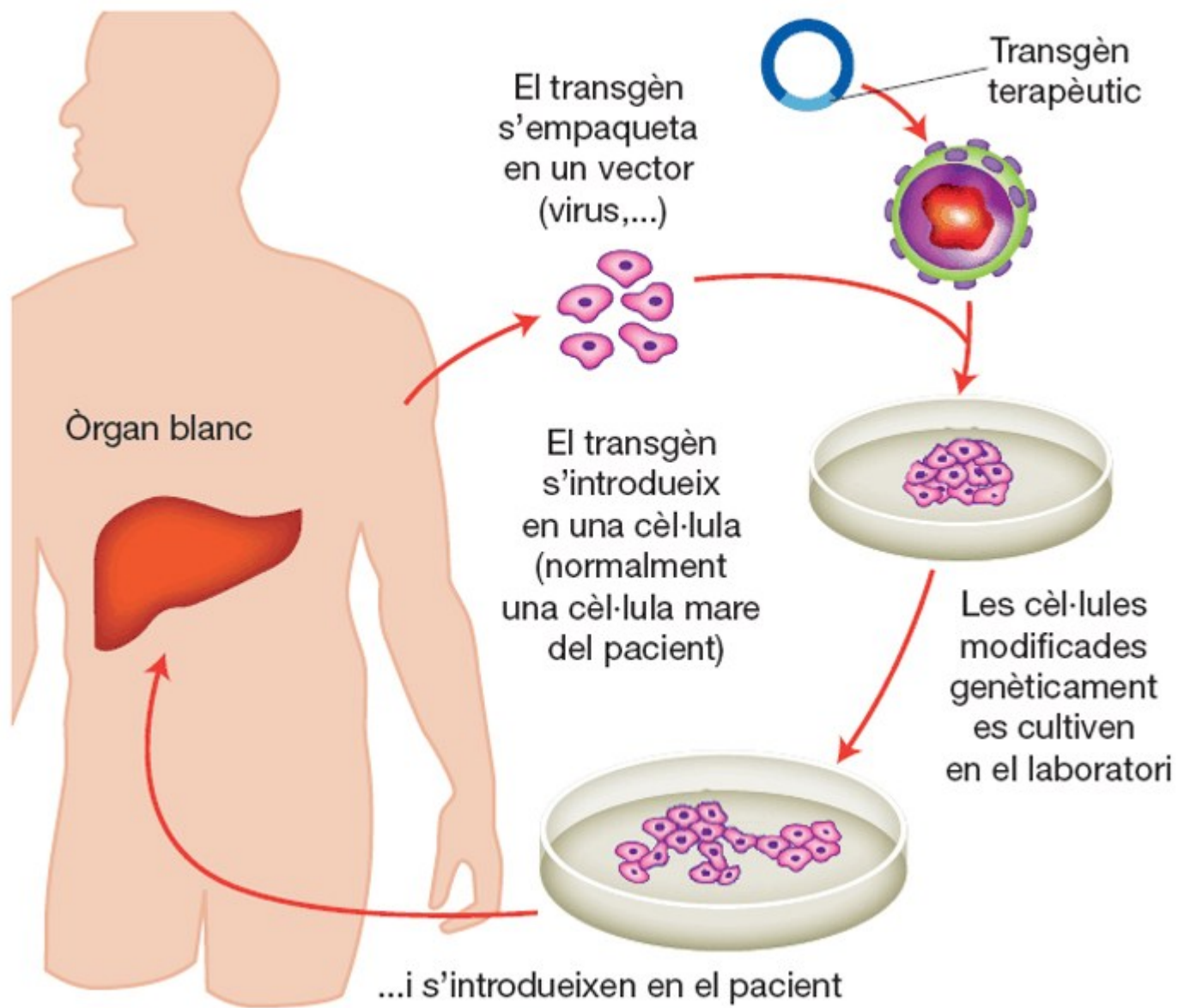


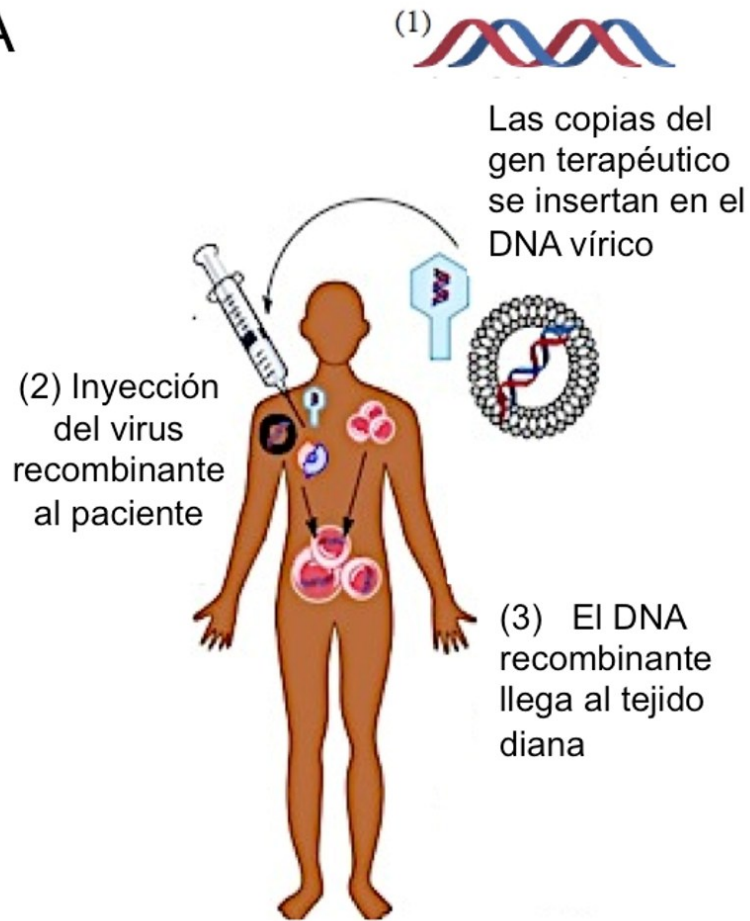
Fonament de la teràpia gènica. Virus no patògens es modifiquen mitjançant enginyeria genètica inserint-los una versió correcta d'un gen humà. Els virus modificats genèticament s'injecten a les cèl·lules dels pacients que tenen una versió defectuosa del gen. Si el tractament té èxit, les cèl·lules expressaran la proteïna correcta o terapèutica, la qual cosa millorarà, en part, els símptomes de la malaltia.



Terapia génica

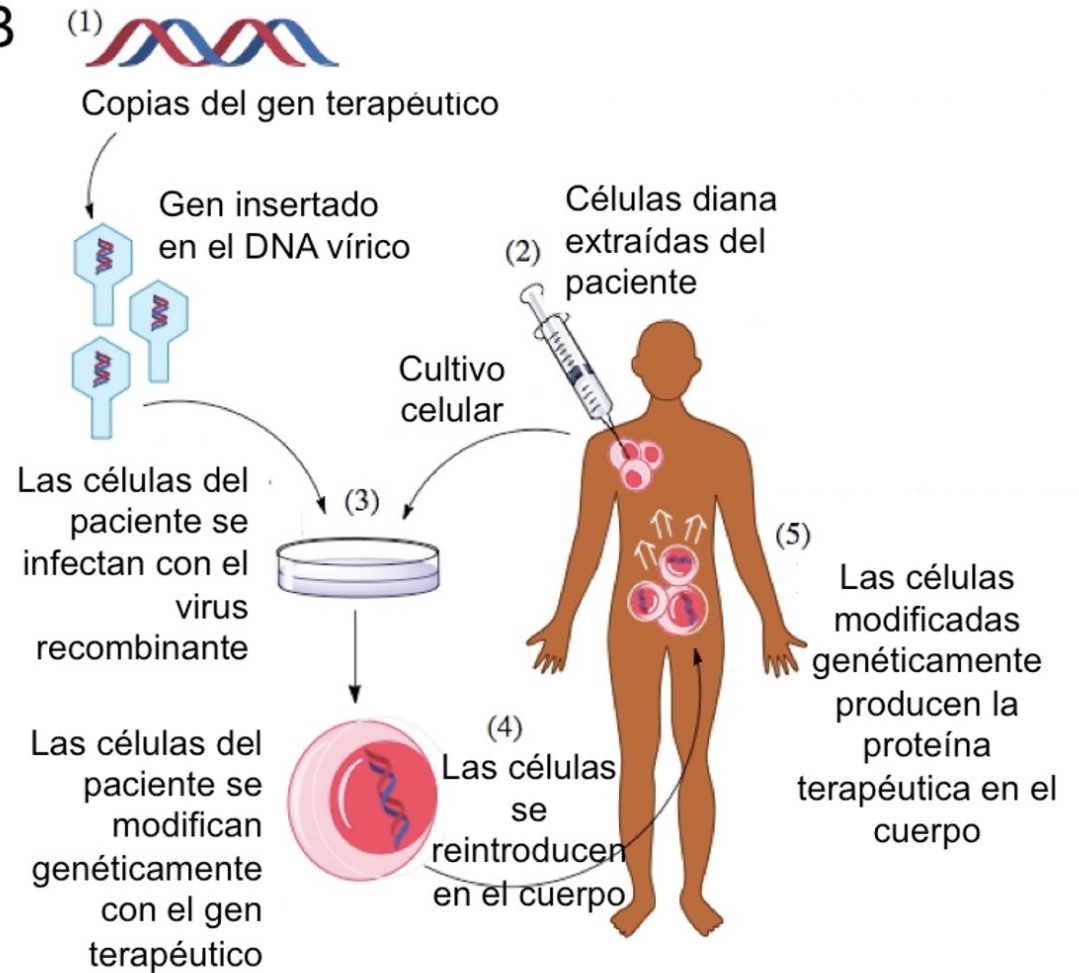




A

Teràpia gènica "in vivo".

Els virus recombinants portadors del gen terapèutic s'injecten directament al pacient. El virus assoleix l'òrgan diana.

B

Teràpia gènica "ex vivo".

Els virus recombinants portadors del gen terapèutic infecten "in vitro" les cèl·lules del pacient; posteriorment les cèl·lules modificades es reintrodueixen en el pacient.

Malaltia dels infants bombolla

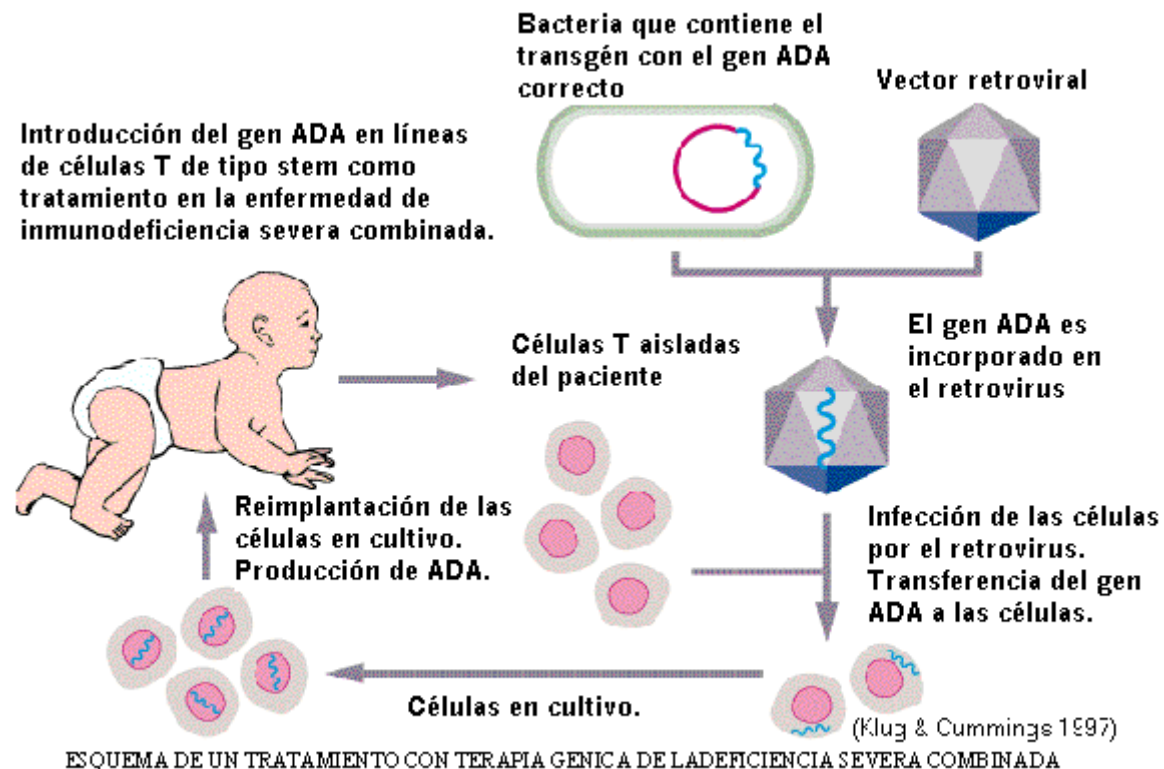
- Causa: mancaça de l'enzim ADA (adenosina-desaminasa) en els limfòcits.
- **Produeix una immunodeficiència congènita severa:** el sistema immunitari no funciona i qualsevol patògen provoca la mort de l'individu.
- Han de viure aïllats i en medis totalment desinfectats.
- Solució: trasplantament medul·la òssia donant compatible (germà).

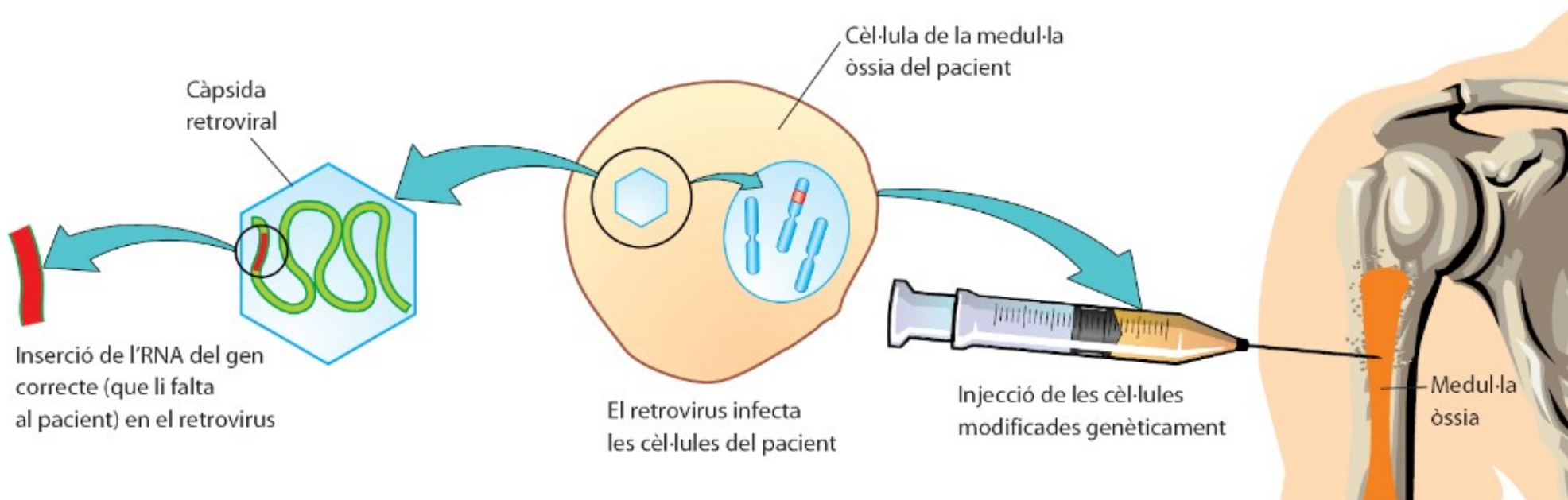


Introducció d'un gen en cel·lules humanes mitjançant un retrovirus (virus de RNA):

Exemple introducció del gen ADA

- Inserció del RNA del gen correcte a un retrovirus.
- Infecció del retrovirus a un cultiu de cel·lules extreptes de la medul·la òssia del pacient.
- Selecció de les cel·lules que han estat modificades mitjançant un gen marcador.
- Injecció de les cel·lules modificades genèticament a la medul·la òssia del pacient.
- Producció de limfòcits amb gen ADA correcte.



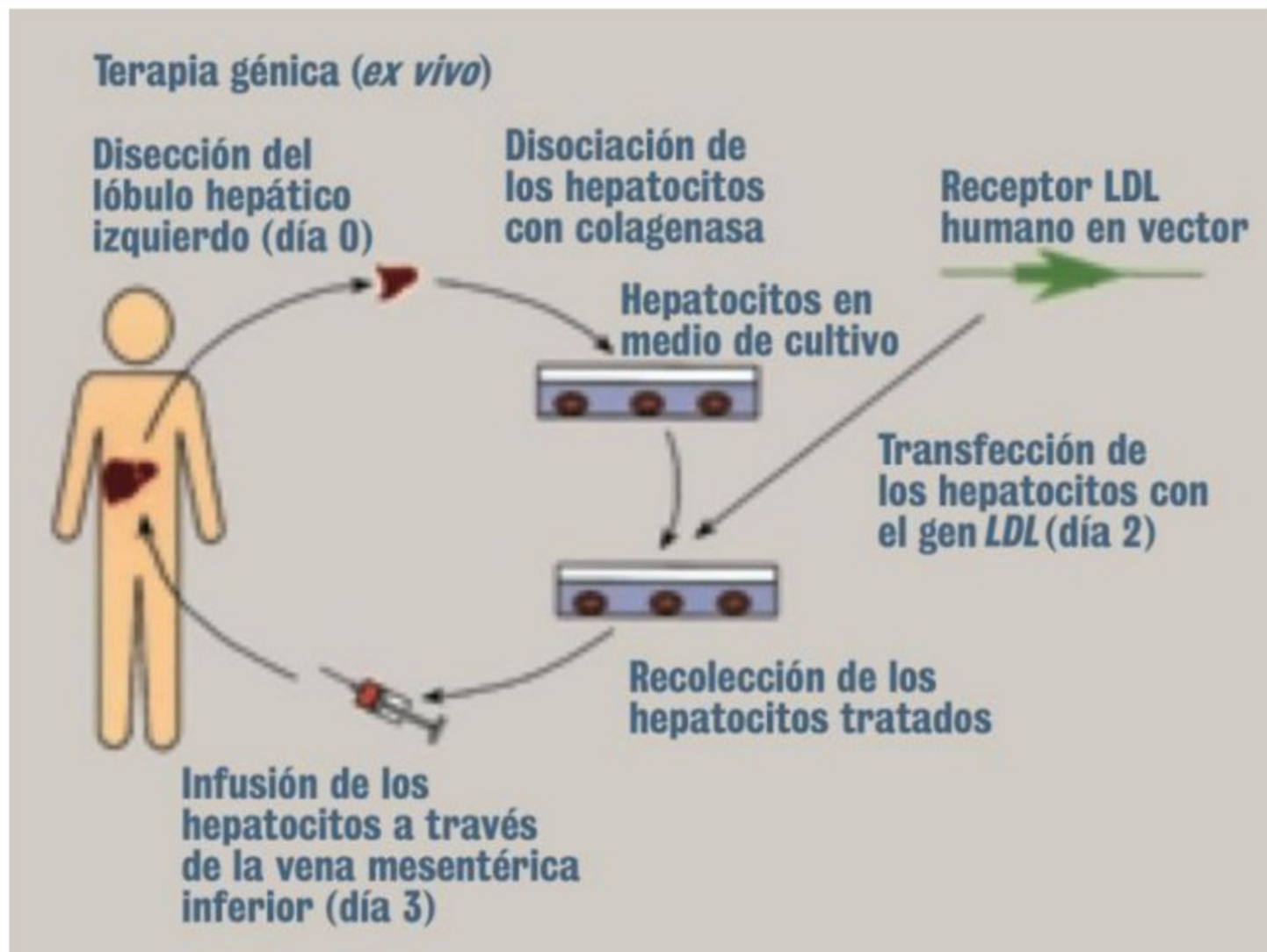


Teràpia gènica de la immunodeficiència combinada greu lligada a la manca de l'enzim ADA.

Problema:

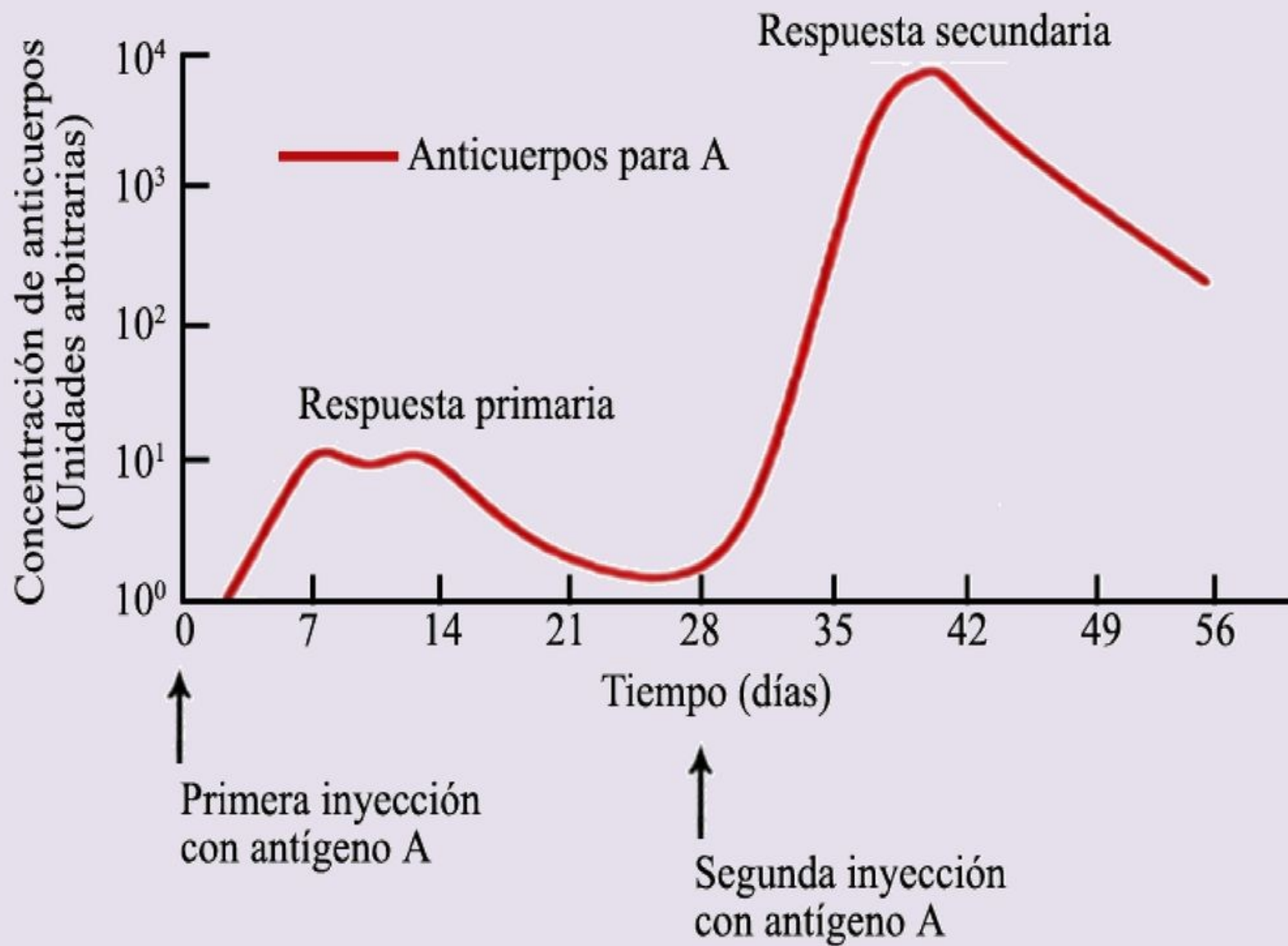
- Les cèl·lules implantades poden desenvolupar tumors en la medul·la òssia. La inserció del gen terapèutic pot causar l'activació de gens responsables de la leucèmia.
- Tot i així actualment aquests problemes s'estan superant, amb virus més eficients.
- En fase d'investigació. Avui dia hi ha assaigs clínics per a unes 50 malalties diferents.

Terapia génica de hipercolesterolemia *ex vivo*



Obtenció de vacunes recombinants

- Vacuna: preparat químic o orgànic destinat a estimular les defenses naturals de l'organisme.
- El sistema immunitari produeix després de la vacuna “*cèl·lules de memòria*” contra el patògen de la vacuna.
- Quan l'organisme es infecta pel patògen real, reacciona ràpidament activant les cèl·lules de memòria que produeixen anticossos i altres mecanismes immunitaris per eliminar el patògen.

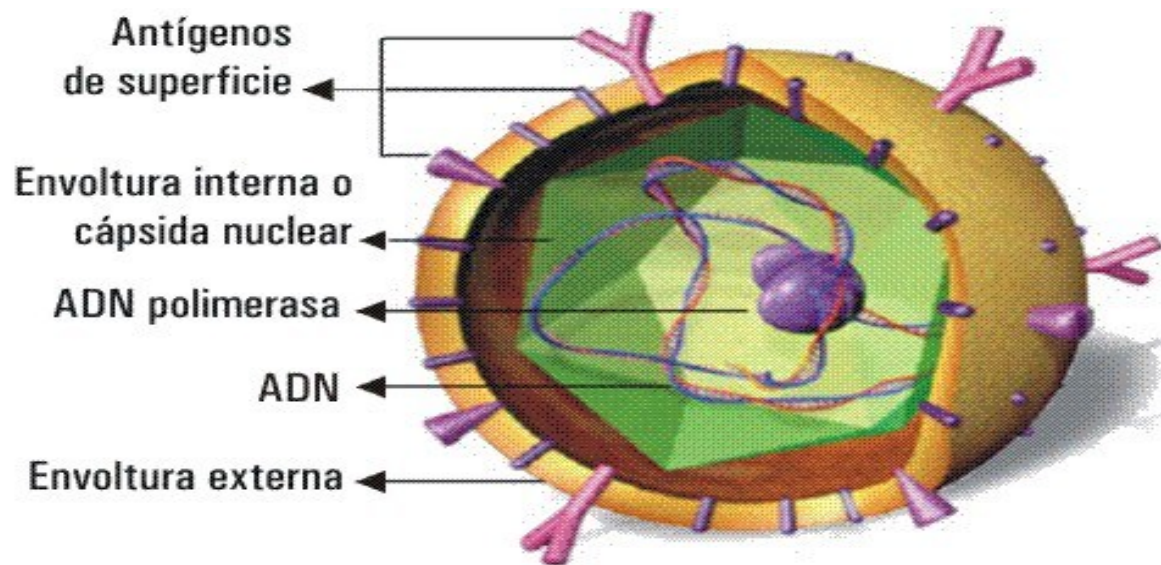


Tipus de vacunes convencionals:

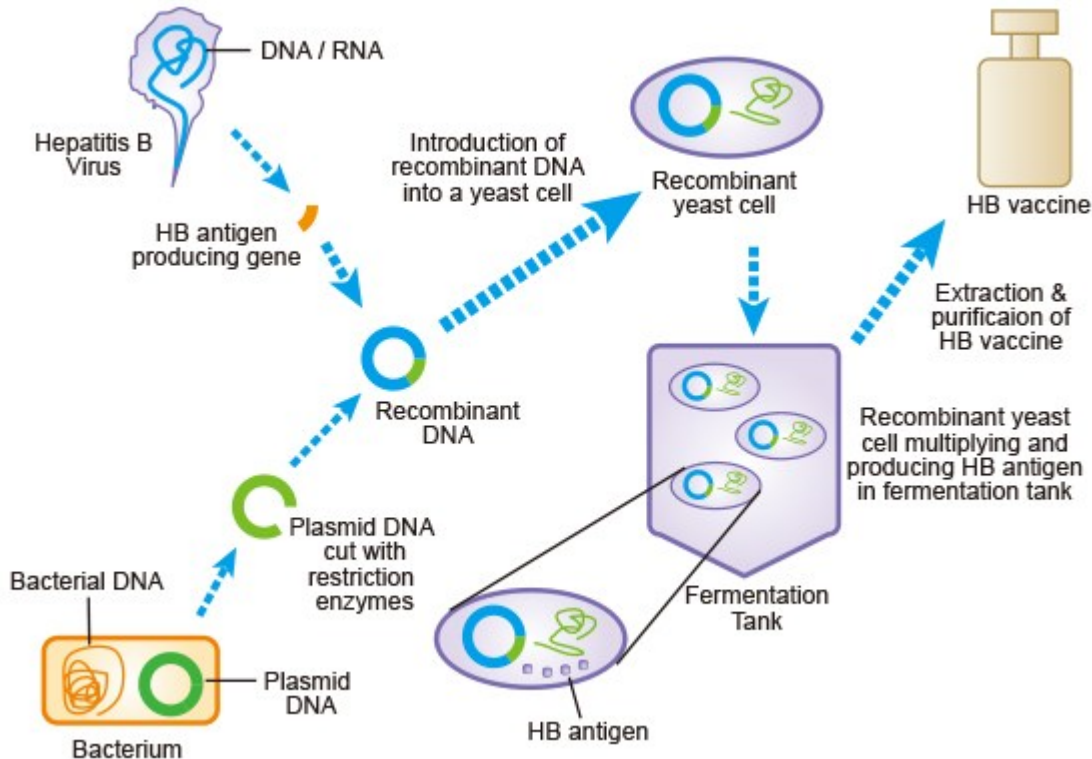
- ***Amb microorganismes atenuats:*** alt poder immunogènic; una sola dosi, perill de que es converteixin en virulents.
- ***Amb microorganismes morts:*** necessiten varies dosi per produir els efectes desitjats.
- ***Amb macromolècules purificades:*** es difícil purificar la quantitat suficient (solució la enginyeria genètica).

Hepatitis B:

- Malaltia infecciosa vírica que es transmet per via sanguinària o per via sexual.
- Pot causar infecció aguda, cirrosi hepàtica, càncer de fetge, insuficiència hepàtica i, eventualment, la mort.
- Antigen de la Hepatitis B: glicoproteïnes de membrana que el sistema immunitari reconeix com estranyes i produeix la resposta immunitària.



Procés d'obtenció de la vacuna de la hepatitis B:



- S'aïlla el gen víric que codifica per a la proteïna antigènica de la superfície del virus (gen HB) i s'insereix en un plasmidi bacterià (mitjançant enzims de restricció).
- El plasmidi híbrid resultant s'introdueix en una cèl·lula de **llevat** *
- S'indueix la reproducció del llevat i l'expressió del gen. El llevat produeix la proteïna antigènica.
- Extracció, purificació i comercialització dels antígens.
- Es procedeix a la vacunació.

* Els antígens vírics són glicoproteïnes. Els llevats són cèl·lules eucariotes, tenen aparell de Golgi imprescindible per a la glicosilació de les proteïnes

