l’enginyeria genètica

Enginyeria genètica

Tècnica que permet la modificació del genoma d'un individu.

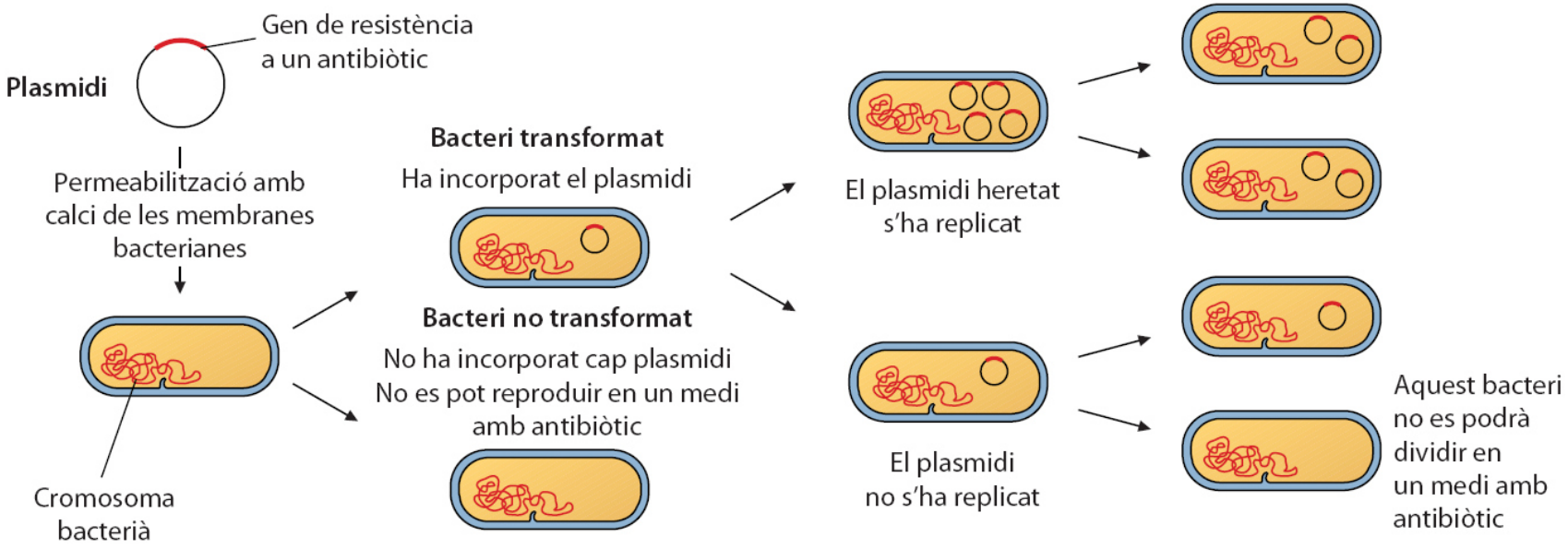
Genoma: Conjunt haploide de gens d'un individu.

Biotecnologia: manipulació dels organismes amb l'objectiu d'obtenir productes útils. Exemples que es duen a terme des de fa segles: fabricació de iogurt, vi, formatge, pà, entrecreuament de varietats animals i vegetals,...

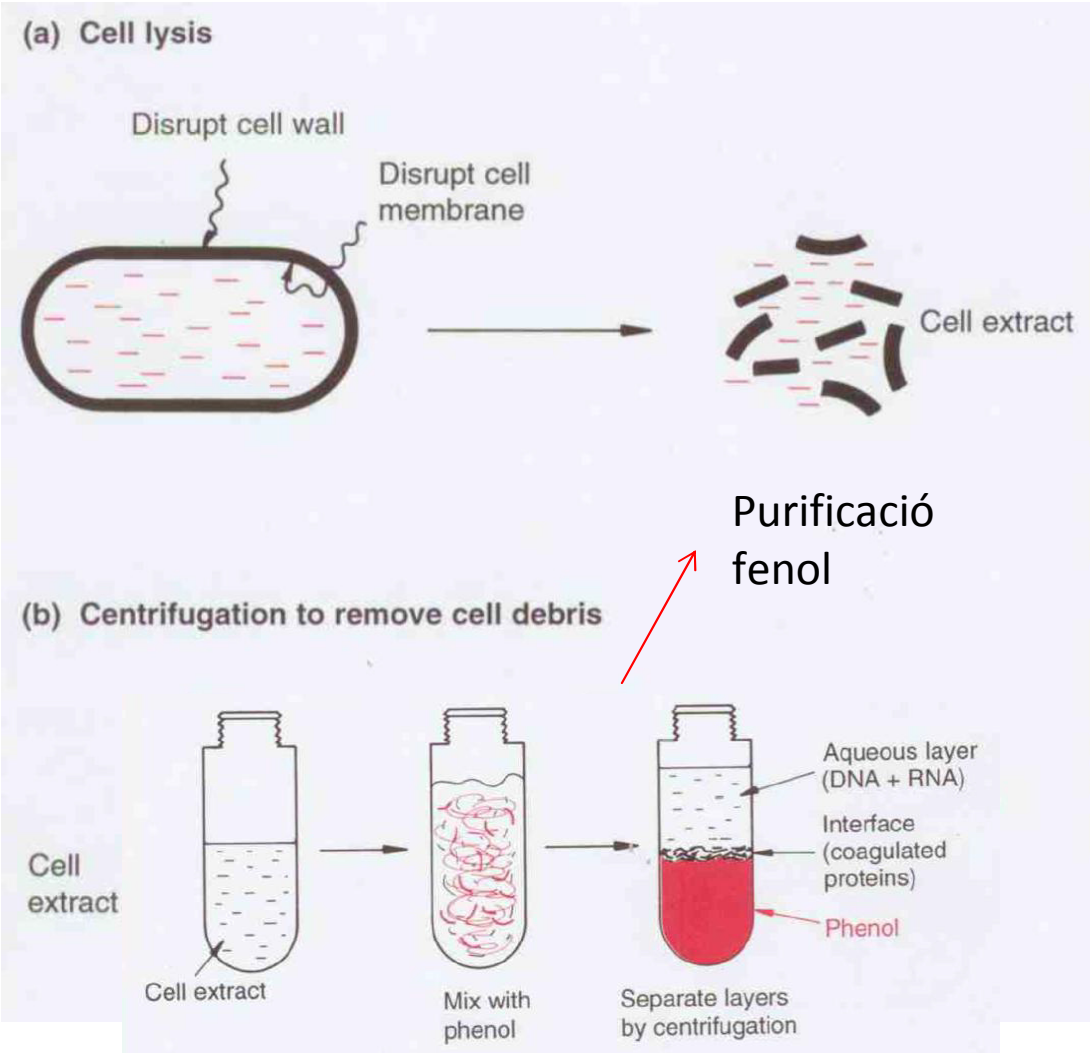
Genòmica: Estudi del conjunt dels gens i les seves interaccions

Proteòmica: Estudi del conjunt complert de proteïnes codificades pel genoma

Enginyeria genètica: transformació en bacteris



1. **Obtenció dels fragments d'ADN** que es volen manipular



1.Degradació de la paret:
-Bacteris: Lisozima
-Llevats, fongs i plantes: Liticases o trencament mecànic amb perles de vidre i agitació.
2.Degradació de la membrana:
S'empren diferents detergents o alternativament es fa una lisi osmòtica. Per mostres de teixit s'empren sistemes mecànics i hidrodinàmics
3. El contingut cel·lular una vegada alliberat **es centrifuga** per separar els fragments de paret, membranes i cèl·lules no trencades.

1. **Obtenció dels fragments d'ADN** que es volen manipular

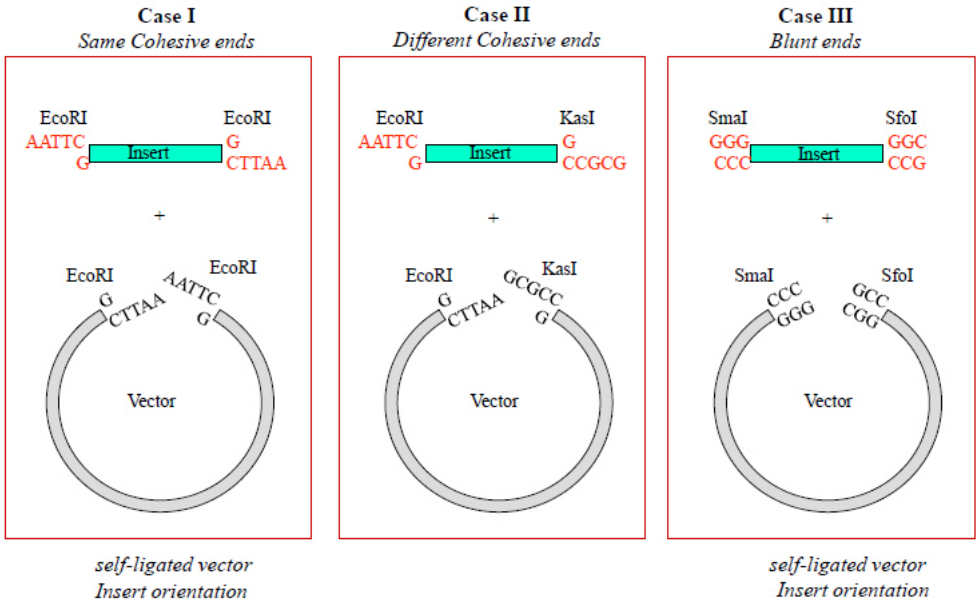
Amplificació per PCR

Múltiples còpies del gen d'interés

2. **Introduïr l'ADN** recombinant dins de les cèl·lules

Vectors: virus, plàsmids...

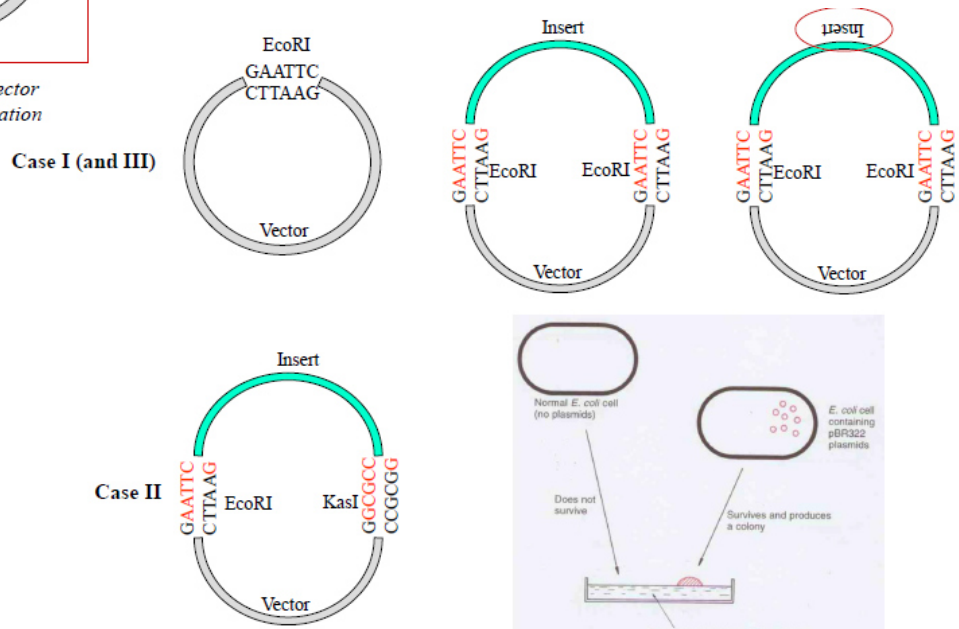
Enginyeria genètica



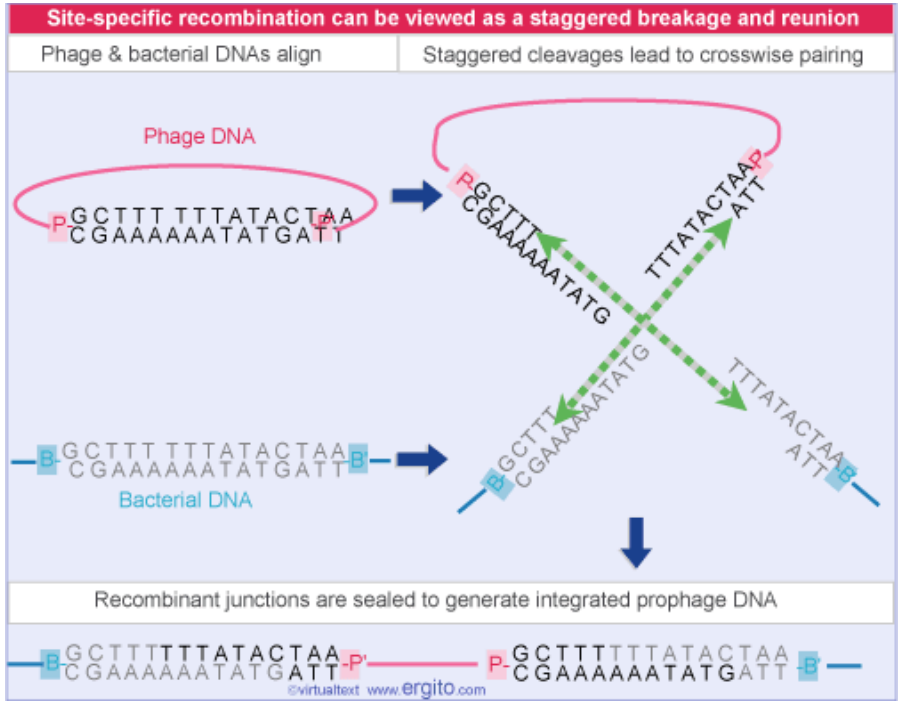
self-ligated vector
Insert orientation

self-ligated vector
Insert orientation

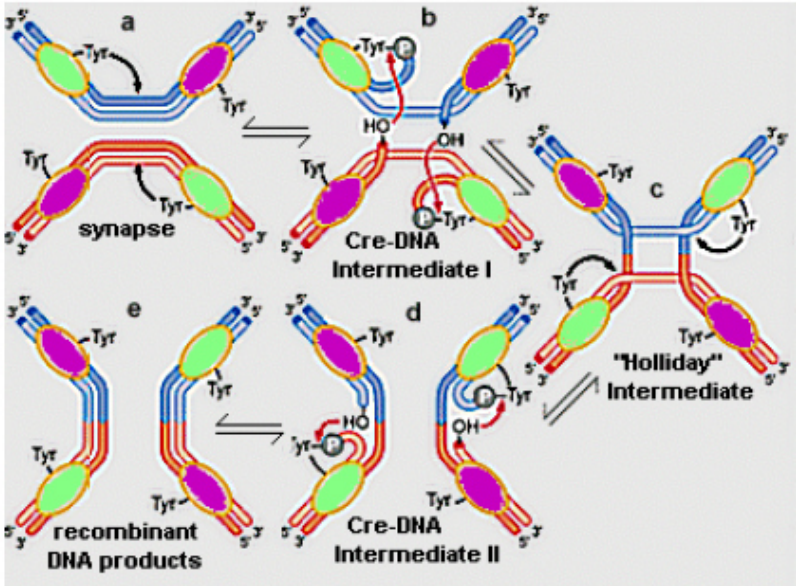
Enzims de restricció



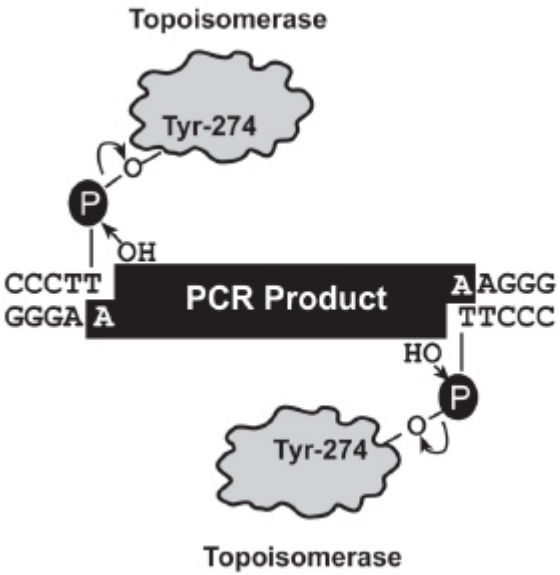
Enginyeria genètica: Formació d'un DNA recombinant

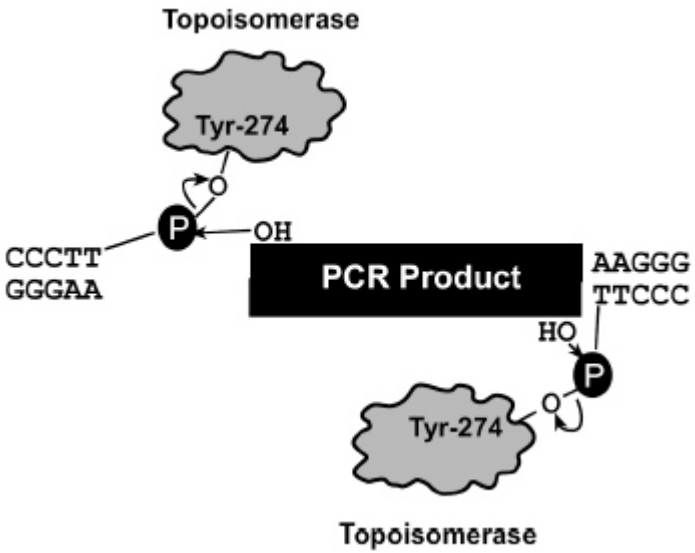


Recombinasa Cre del fag P1



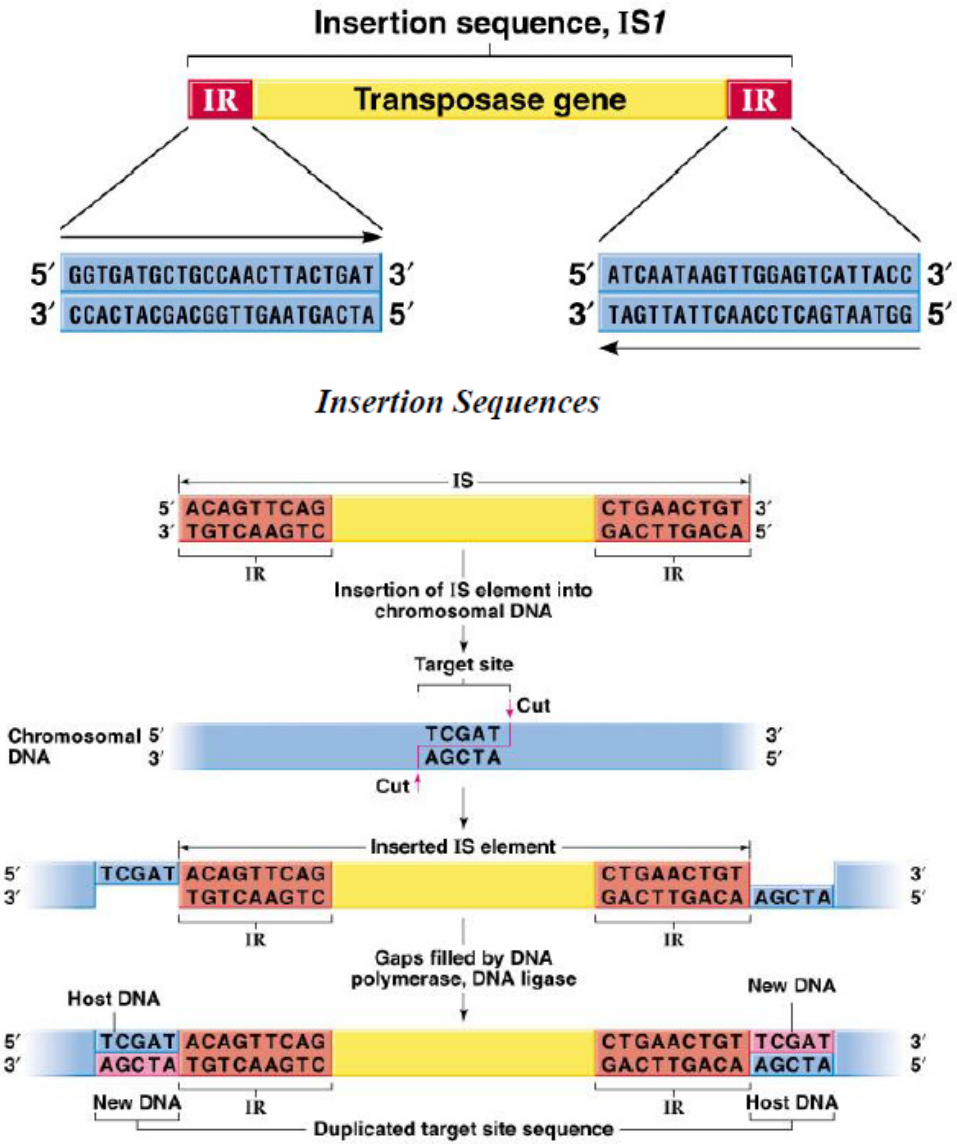
Enginyeria genètica: Formació d'un DNA recombinant





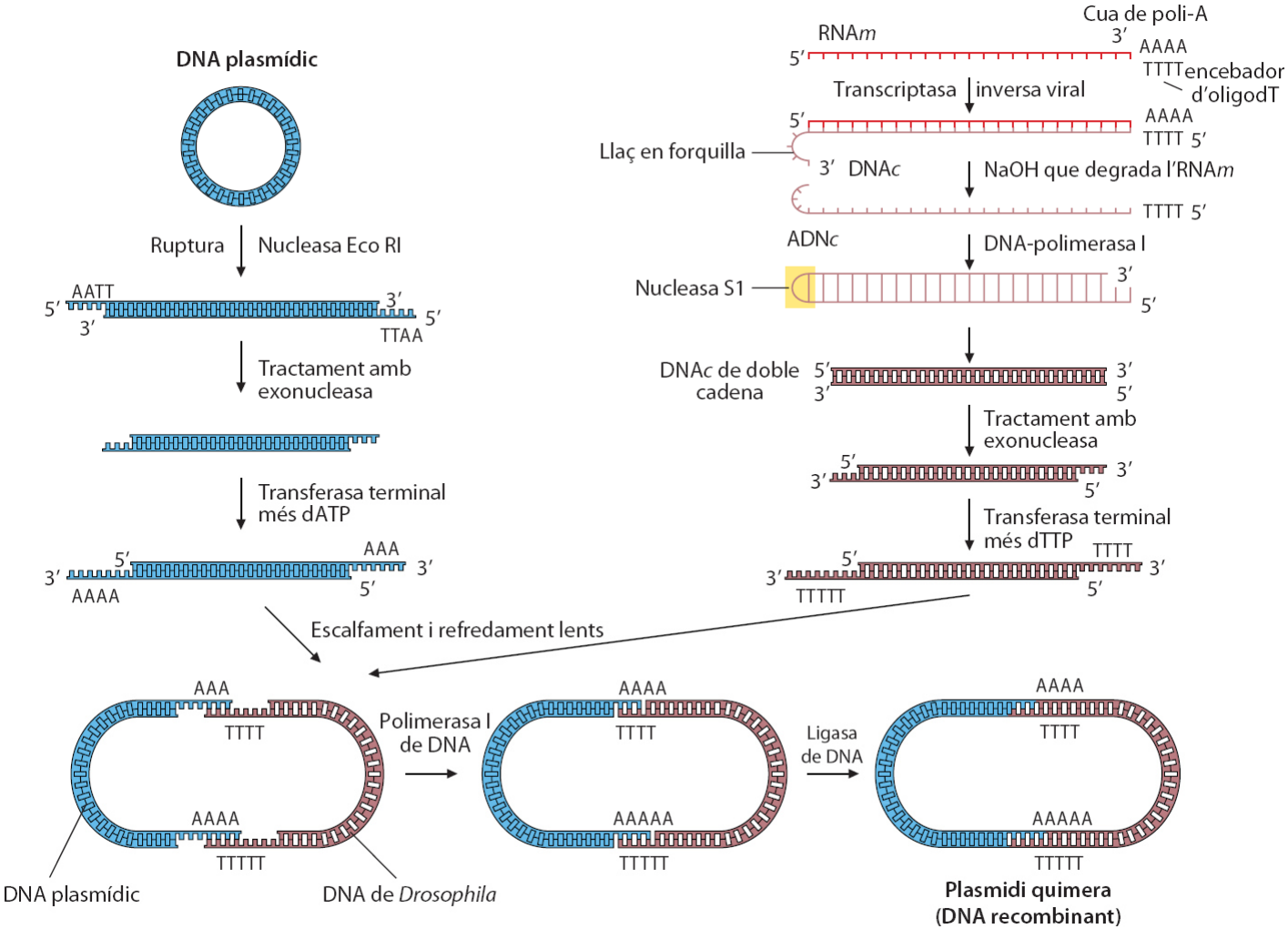
No necessita enzims, s'utilitza la topoisomerasa I del virus de la verola que interacciona amb la seq de DNA CCCTT

Enginyeria genètica: Formació d'un DNA recombinant

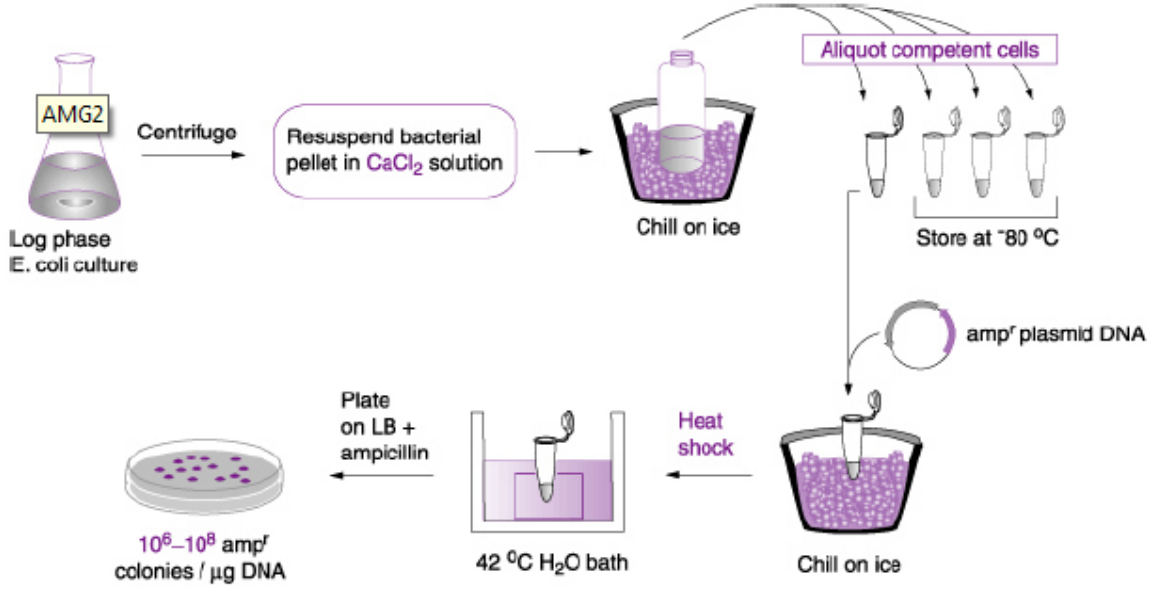


Les IS tenen unes dimensions entre 1 i 5 Kb i presenten en els extrems de la seqüència IRs (Inverted Repeats). En la part interna codifiquen per una transposase, l'enzim requerit pel procés de mobilització.

Enginyeria genètica: Síntesi d'un DNA complementari (DNAc) i inserció en un plasmidi



Transformació mitjançant $CaCl_2$

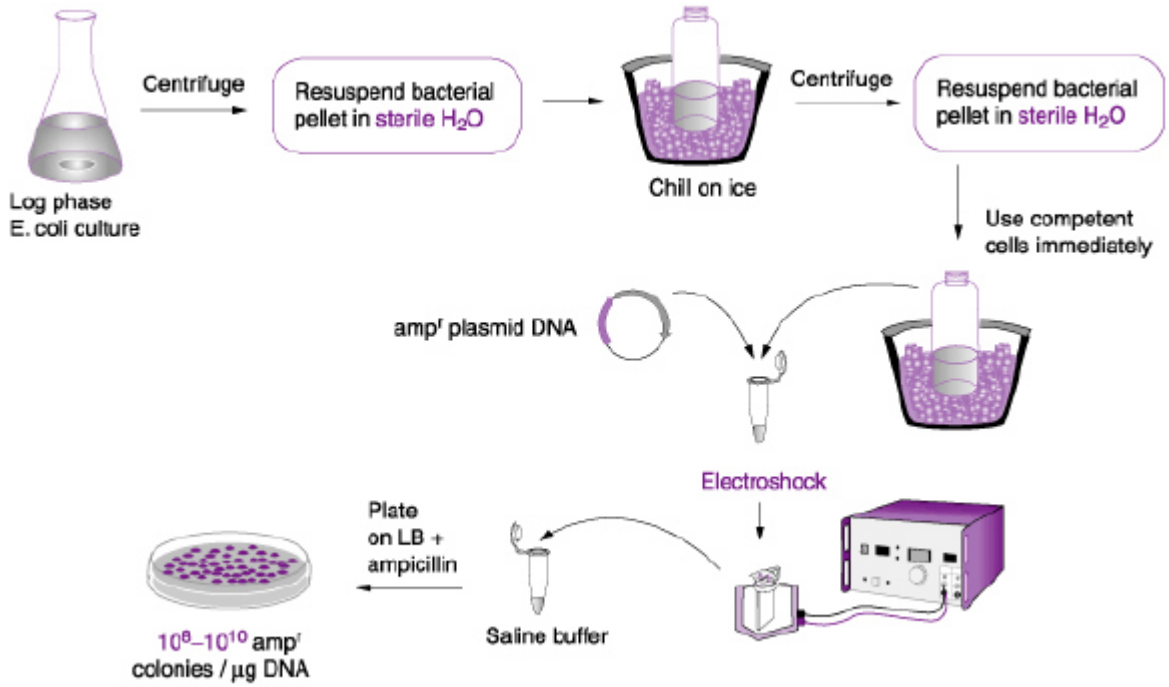


L'addició de clorur de calci (10-30 mM) i la incubació a 4ºC durant hores indueix un estat de competència a les cèl·lules de *E.coli. Aquest tractament provoca la mort d'un 50 al 80 % de les cèl·lules.*

El DNA lineal no es transforma eficientment degut a la presència de la exonucleasa recBC que el degrada. El DNA plasmídic té una elevada eficiència de transformació, ja que no té els extrems lliures i no és atacat per la nucleasa recBC.

Després del xoc tèrmic les cèl·lules s'han d'incubar durant aprox. 1 hora en absència de selecció per permetre la supervivència (temps d'expressió fenotípica).

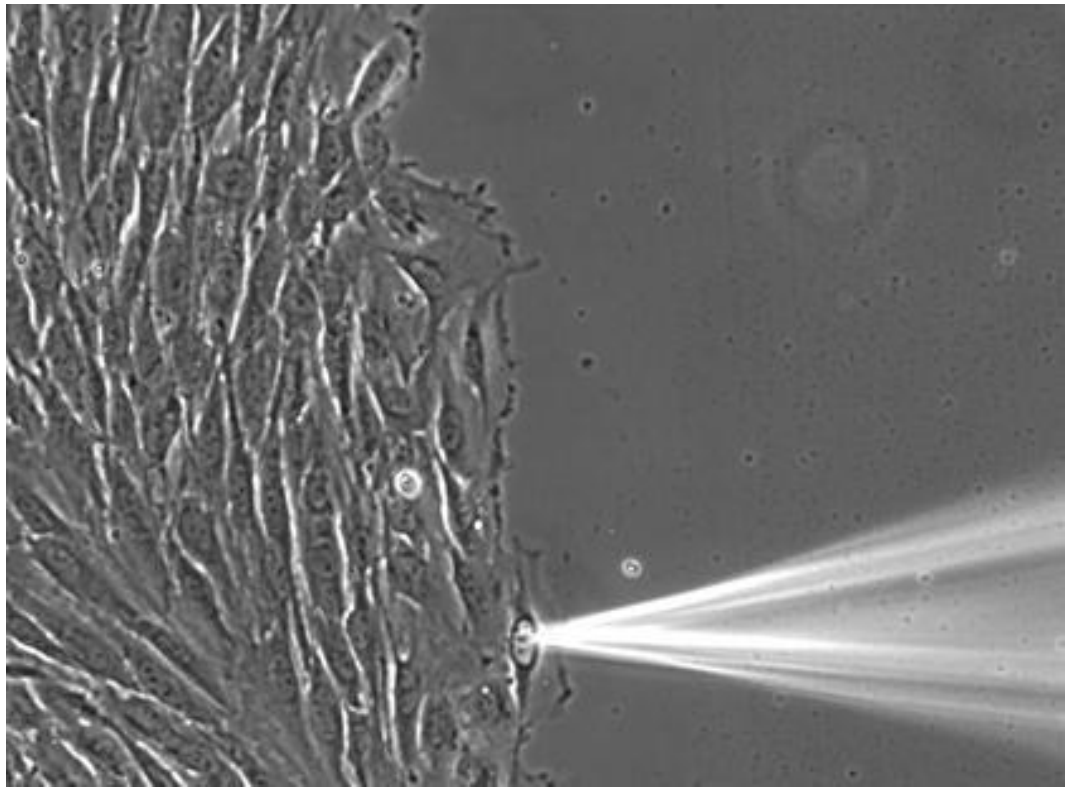
Electroporació



Introduïm les molècules de DNA dins la cèl·lula mitjançant un breu pols elèctric que causa la formació transitòria de porus en la membrana.

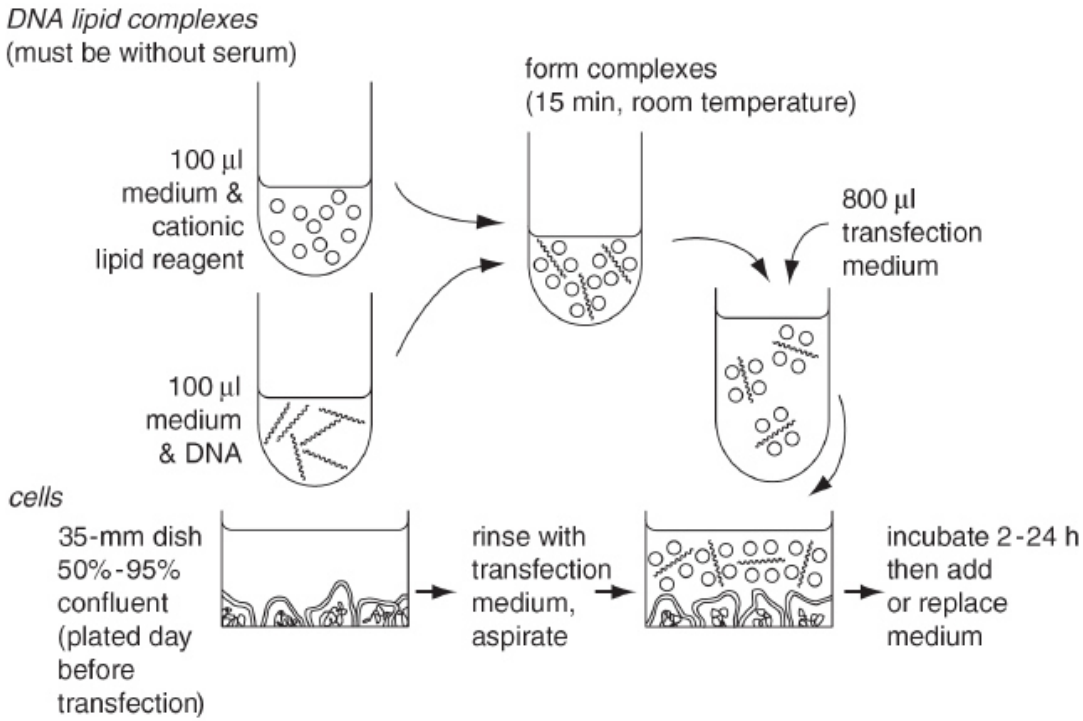
Elevada mortalitat

Micro-injection



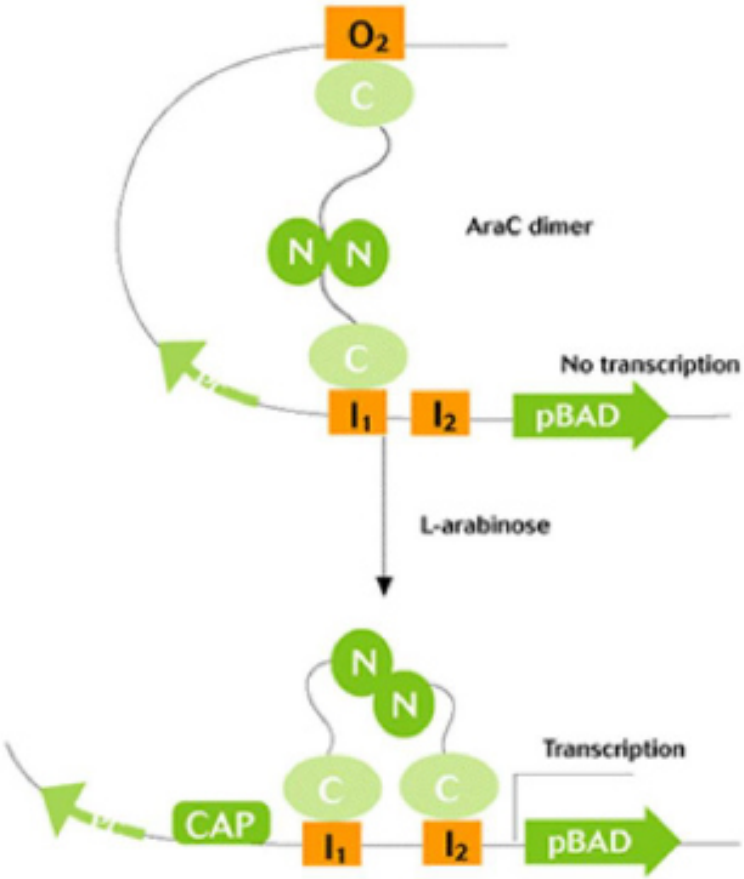
Elevada eficiència. La transfecció és de cèl·lula en cèl·lula. Útil per a crear transgènics.

Transfecció amb lipofectamida



Lípids catiònics que permeten condensar les molècules de DNA en una estructura lipídica compacta. La naturalesa lipofílica dels lípids catiònics permeten la formació d'agregats que interaccionen i travessen la membrana cel·lular.

Promotors induïbles



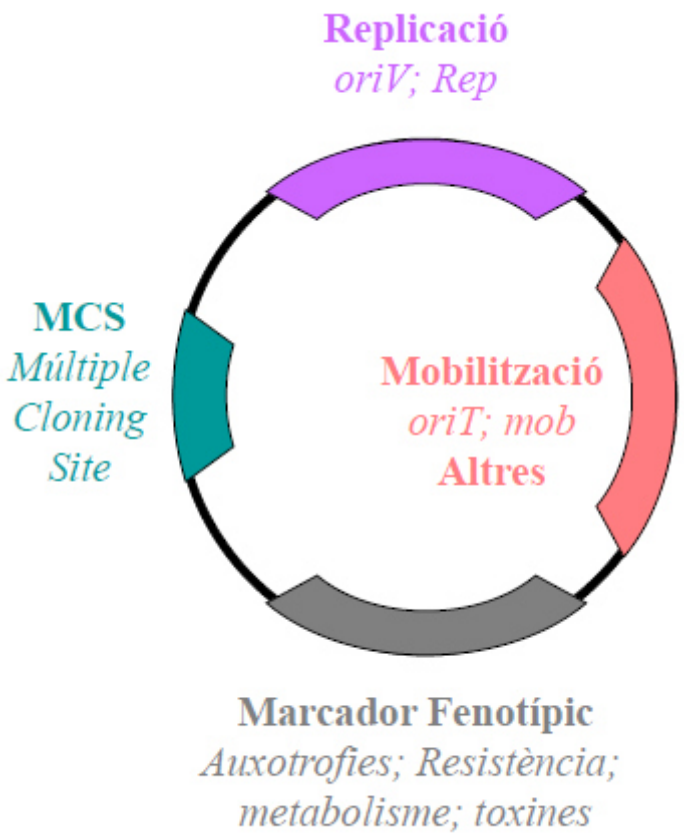
Quan un gen es clona sota el control del promotor d'arabinosa, la seva expressió està controlada per l'activador araC. L'expressió s'indueix fortament en presència d'arabinosa en el medi. El sistema està molt ben regulat, i en absència d'arabinosa i presència de glucosa el promotor està totalment reprimit.

+ Glucosa
- Arabinosa

-Glucosa
+ Arabinosa

- Promotor -> no transcripció

+ Promotor-> transcripció



Quan parlem de vectors de clonació cal tenir en compte:

-la seva capacitat replicativa en diferents hostes. "Broad hoste range", ampli espectre d'hoste.

-L'estabilitat dels vectors dins la cèl·lula en absència de selecció. Pressió selectiva.

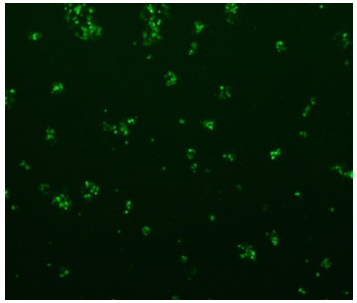
Plàsmids: pcDNA-GFP-MMP7
i pcDNA3.1-MMP9-Myc

Comprovació plàsmids

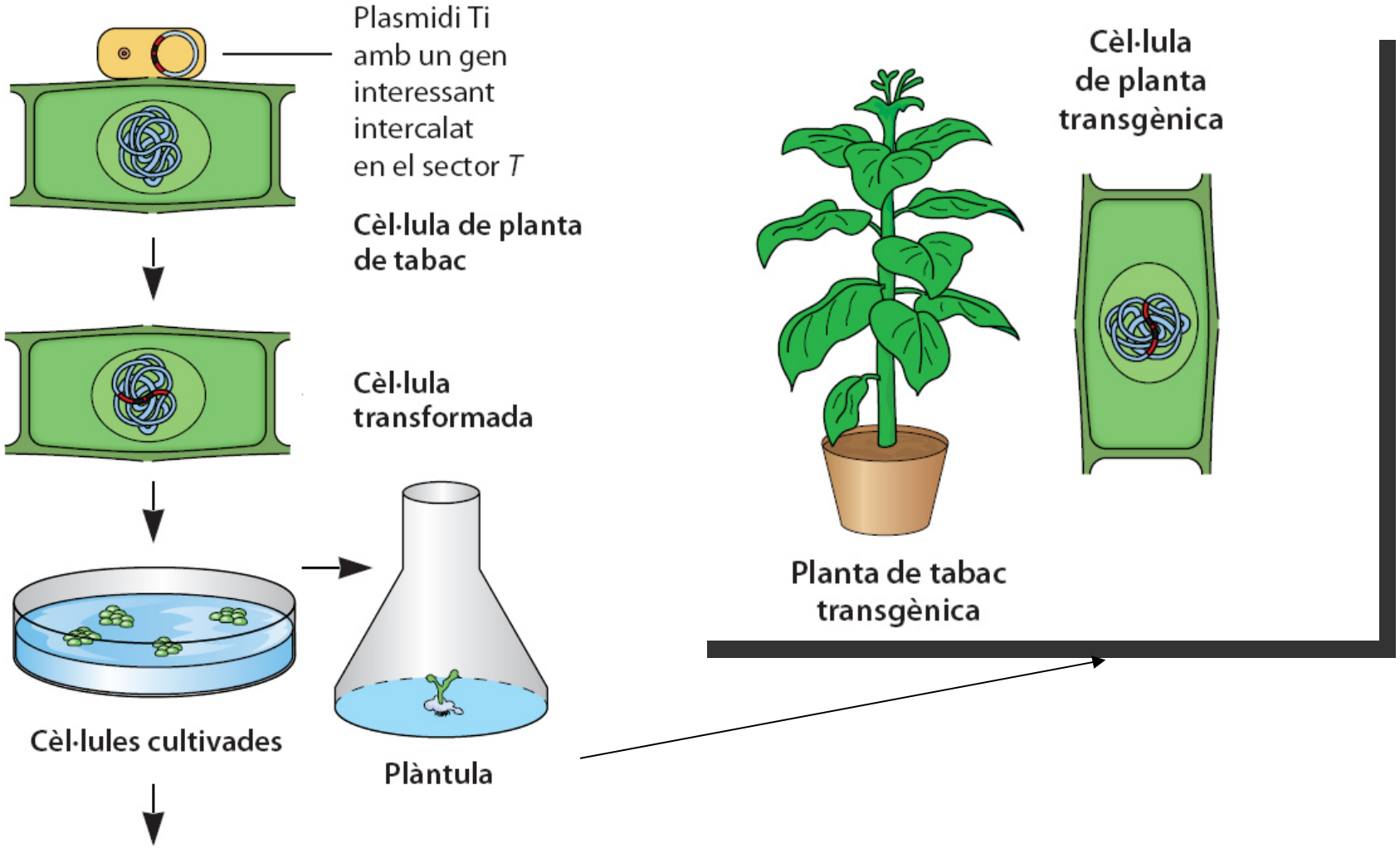
Transformació en *E.coli*

Transfecció en eucariotes (HCT-116.Fluc.C2)

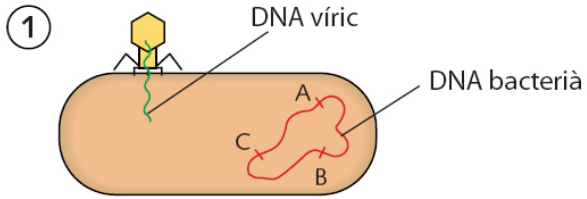
Comprovació de la transfecció en 293FT

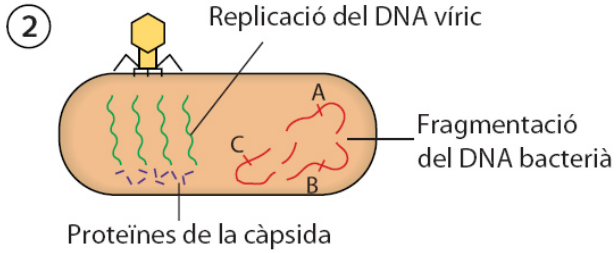


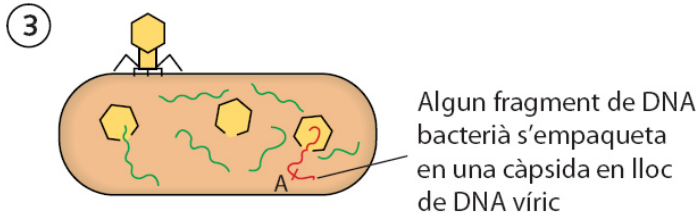
Utilització del plasmidi Ti com a vector de gens en plantes

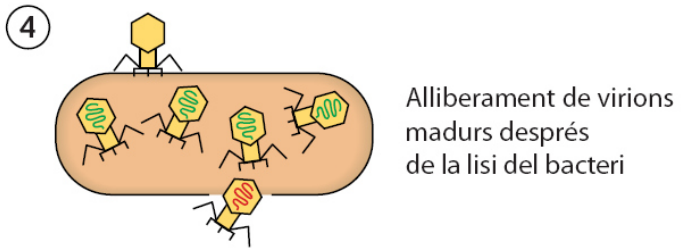


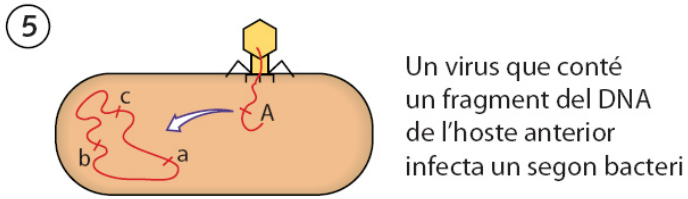
Transducció

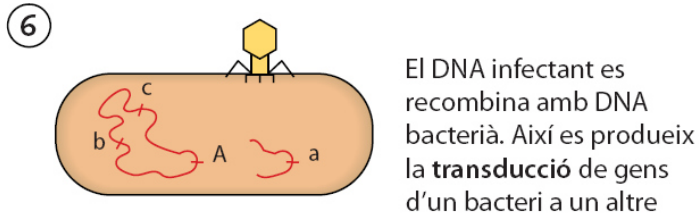










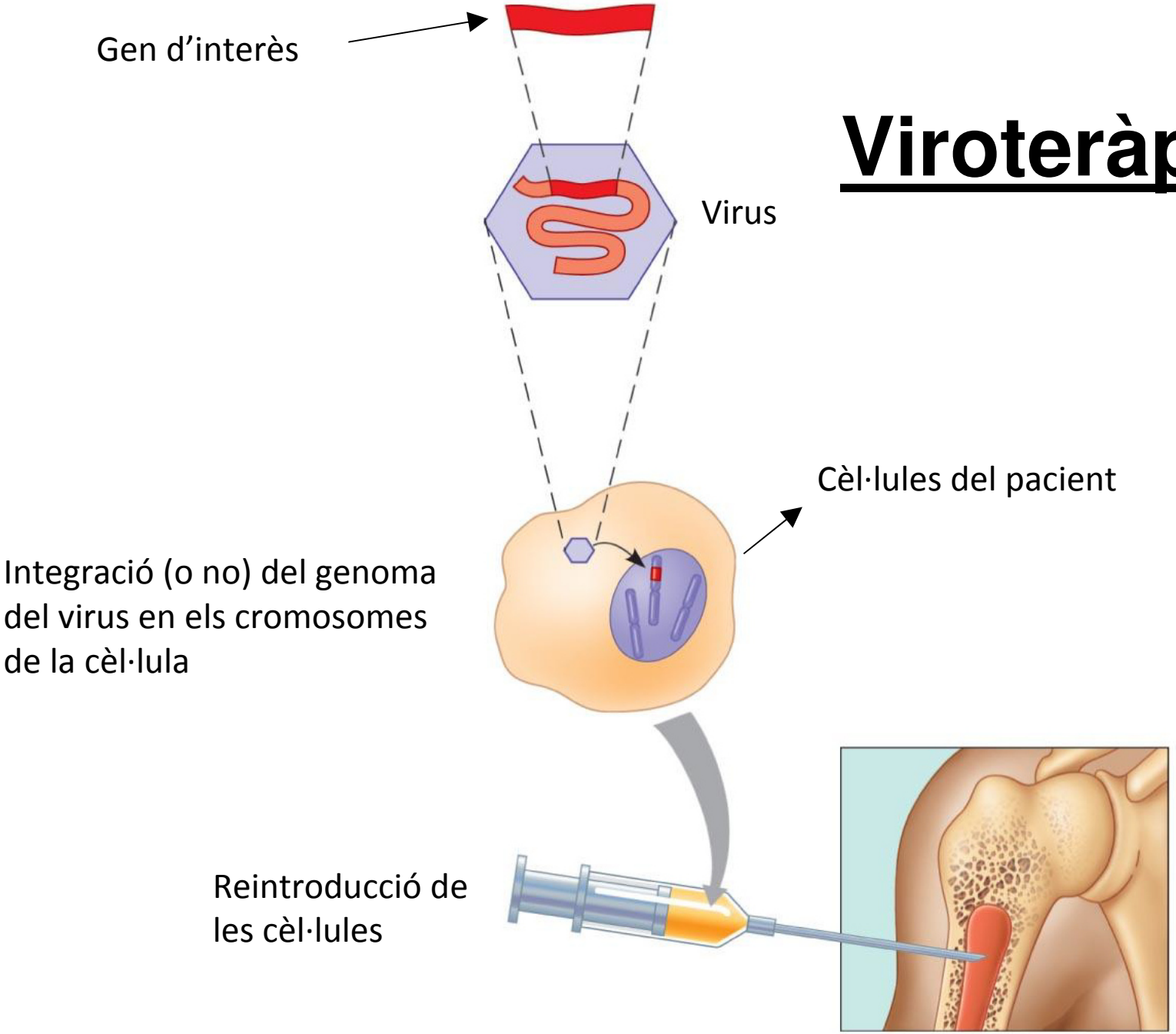


Teràpia gènica: inserció de còpies funcionals de gens defectuosos o absents en el genoma d'un individu.

2 Tipus
- TG somàtica
- TG germinal

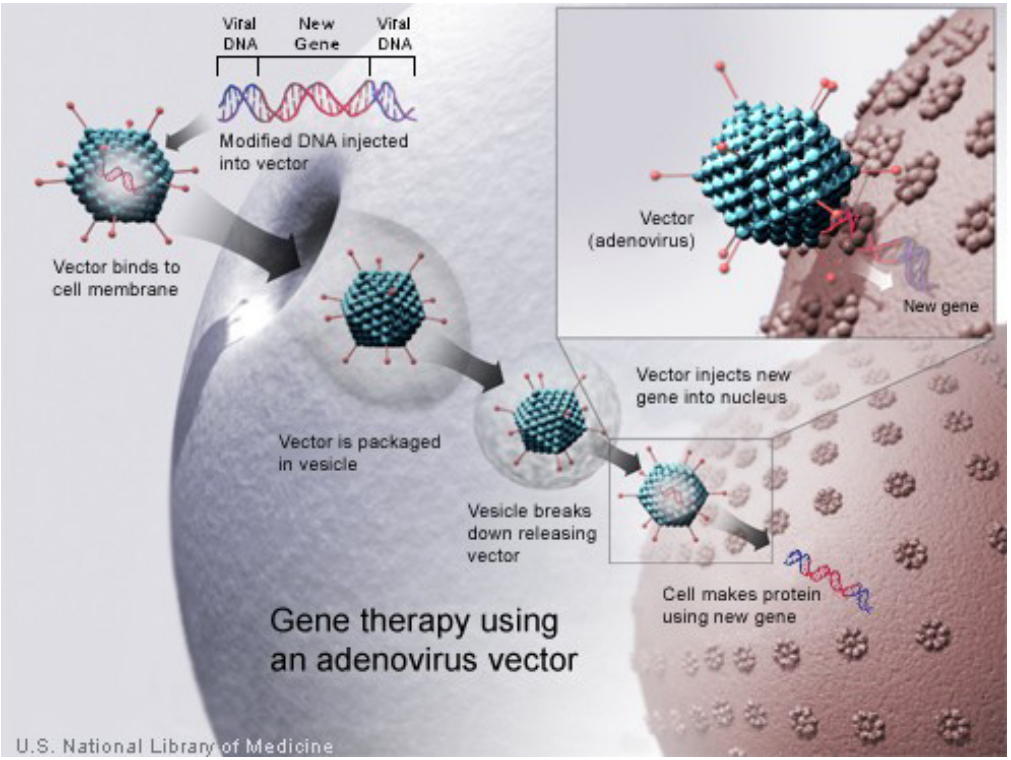
Teràpia gènica amb virus s'anomena **viroteràpia**
- Adenovirus
- Retrovirus

Viroteràpia



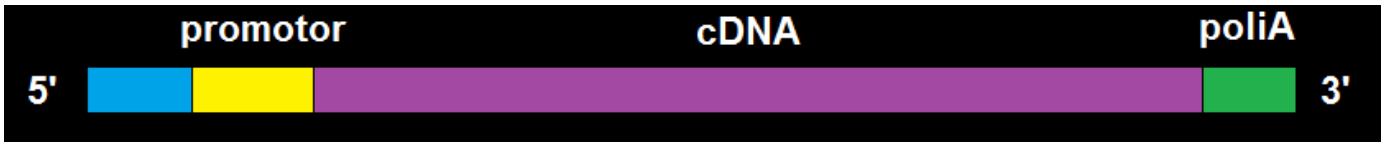
- DNA víric epicromosòmic

NO risc de mutagènesi insercional

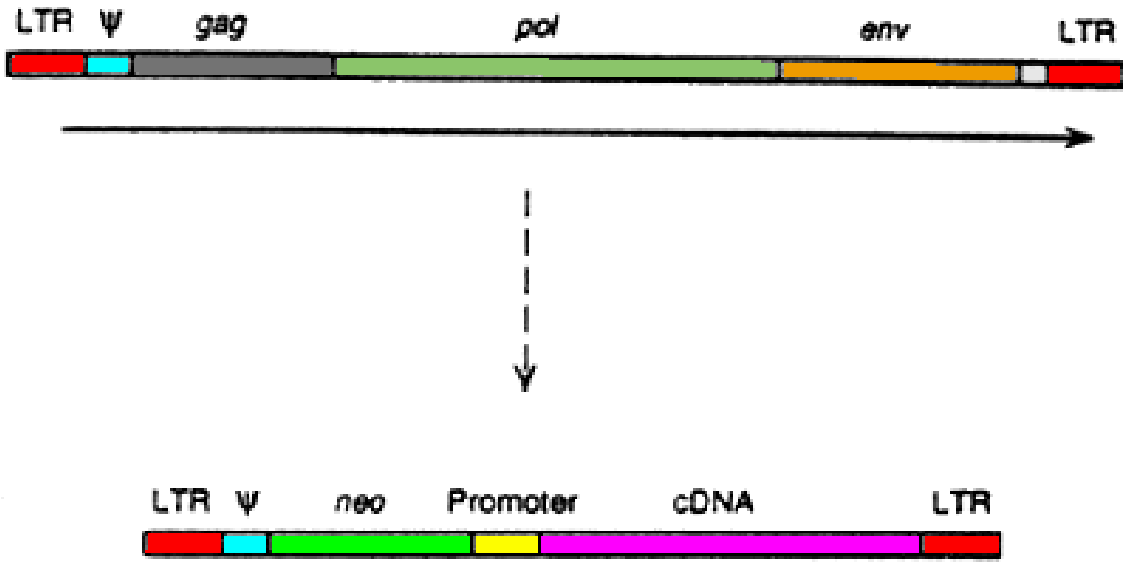


Vectors adenovirals

- Gen d'interès de fins a 30kB



- Virus ARN cadena senzilla
- Integració en el genoma de la cèl·lula
- Regions gag, pol i env
- Perill d'integració inespecífica



Avantatges

- ✓ Curar o tractar patologies com el càncer, malalties neurodegeneratives etc.
- ✓ Medicina personalitzada

Inconvenients

- ✘ Immunogènesi
- ✘ Mutagènesi insercional
- ✘ Transferència gènica pobra

- Virus capaços d'eliminar tumors. **IN VIVO**

<u>Objectius</u>

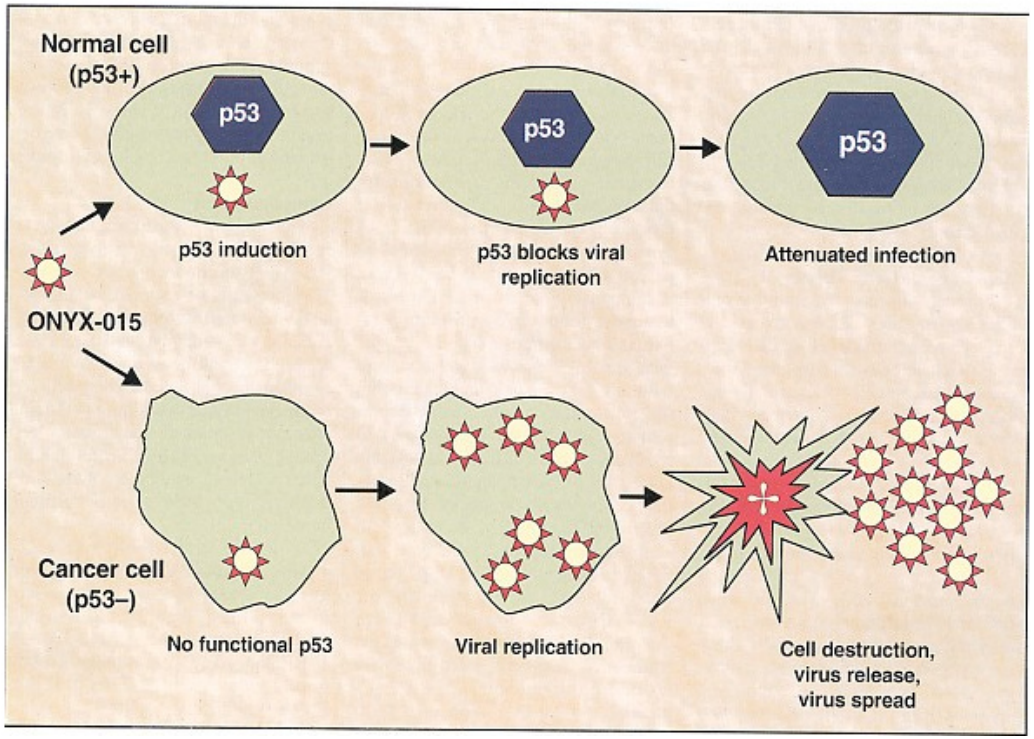
Replicació virus en

- cèl·lules amb ausència de gens supressors de tumors (ex: p53)
- cèl·lules amb característiques específiques de tumors (ex: expressió d'alfa proteïna)

Exemple: ONYX-015

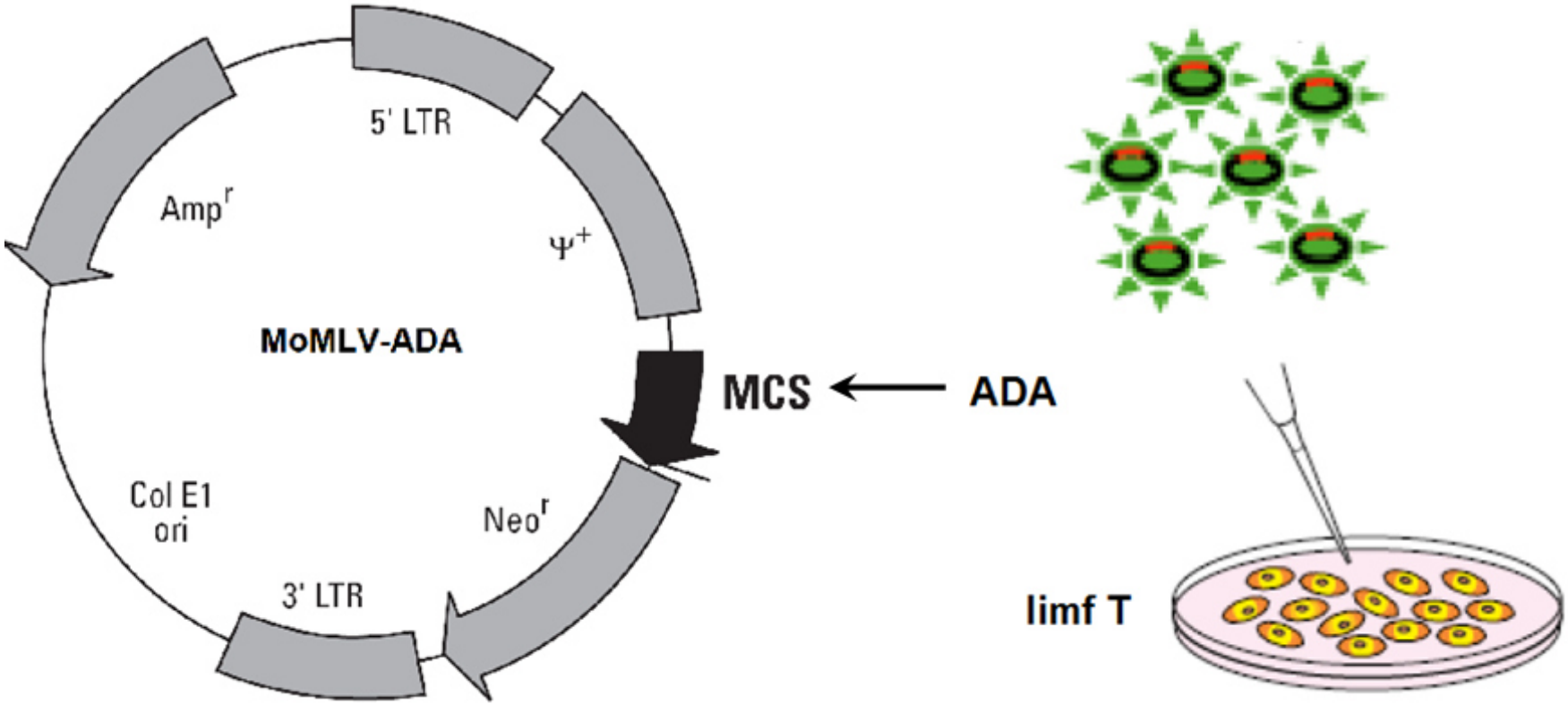
ONYX-015

- Adenovirus amb deleció del gen E1B
- Sol es replicarà en cèl·lules que tinguin dèficits de p53 (cèl·lules tumorals)



SCID. Viroteràpia

- A pacients amb SCID-ADA

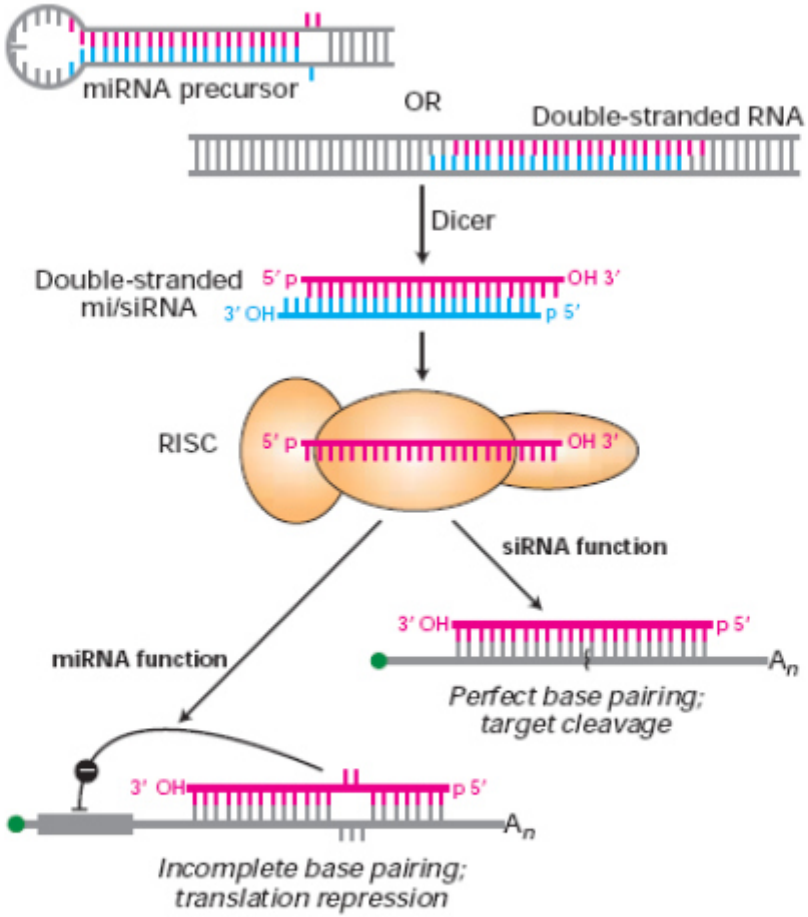


Inactivació gènica

-Phenocopia: sense afectar el genotip, només canvia el fenotip. Principalment s'utilitza la interferència de RNA (RNAi)
-Knock out: inactivació insercional del gen o eliminació d'un exò
-Knock in: canvi d'una seqüència o exò per un altre de modificada.

Transgènic: inserció d'un gen heteròleg

RNAi

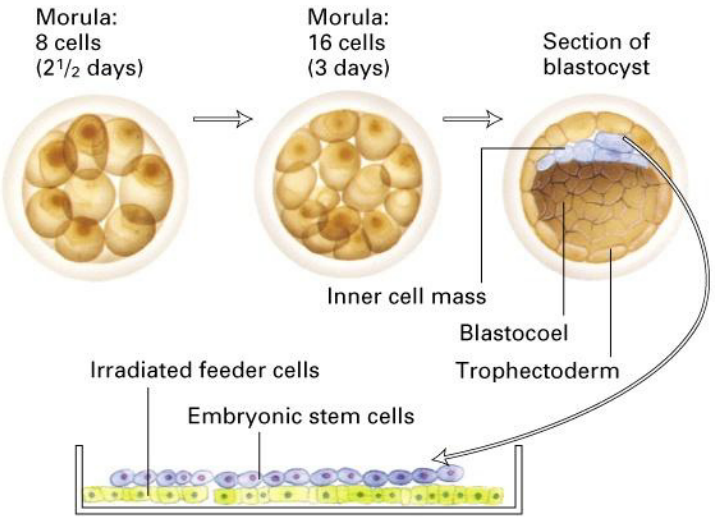


RECONEIXEMENT INCOMPLET DEL RNA DEL mRNA DIANA

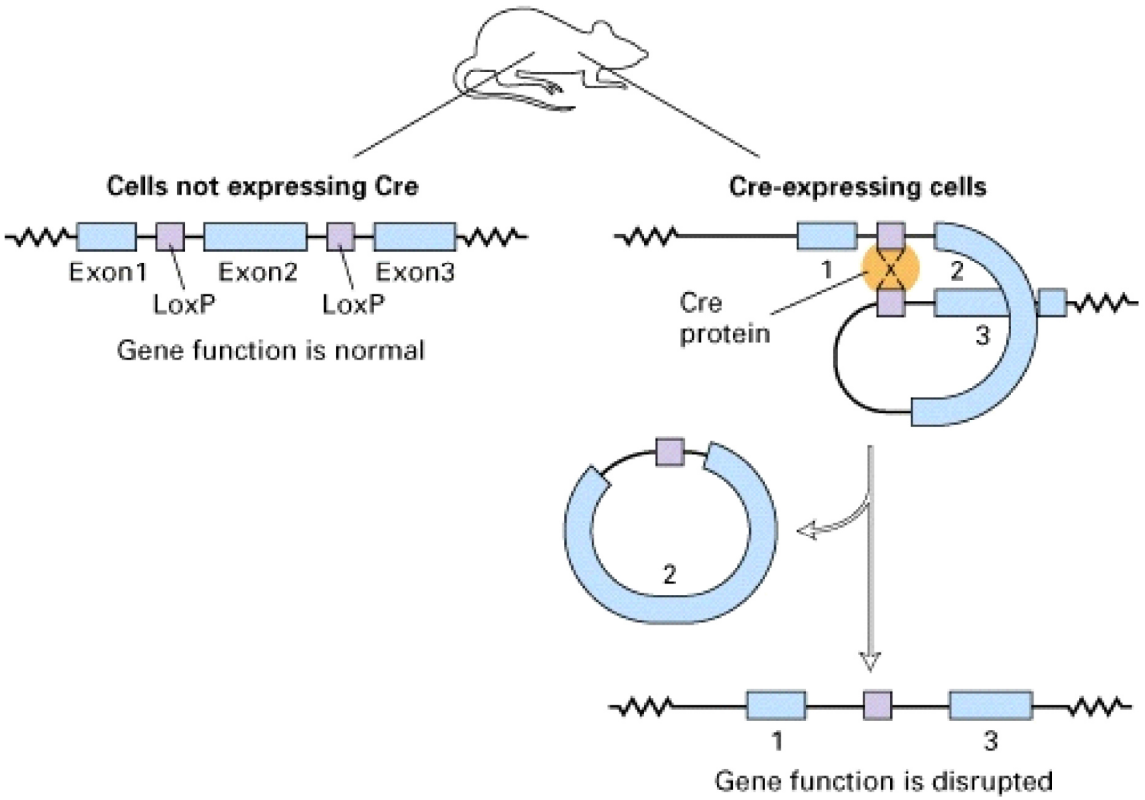
100% RECONEIXEMENT RNA DEL mRNA DIANA

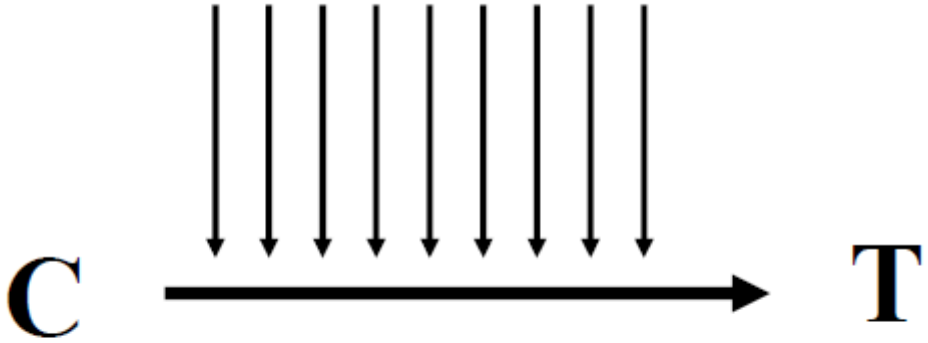
Enginyeria genètica: Manipulació genètica

KO



KO condicional




C
T

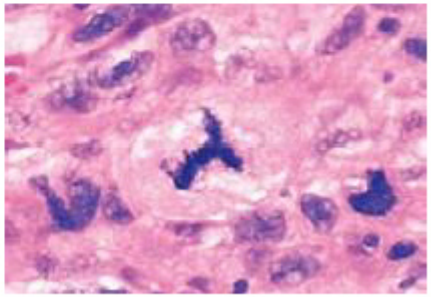
Tots els tumors (benignes i malignes) tenen 2 components:

1. Parènquima tumoral: cèl·lules tumorals
2. Estroma reactiu: teixit conectiu, vasos, cel·lules inflamatories i del sistema immunitari (MACRÒFAGS i LINFÒCITS)

- Característiques del tumor
  - Diferenciació i anaplàsia

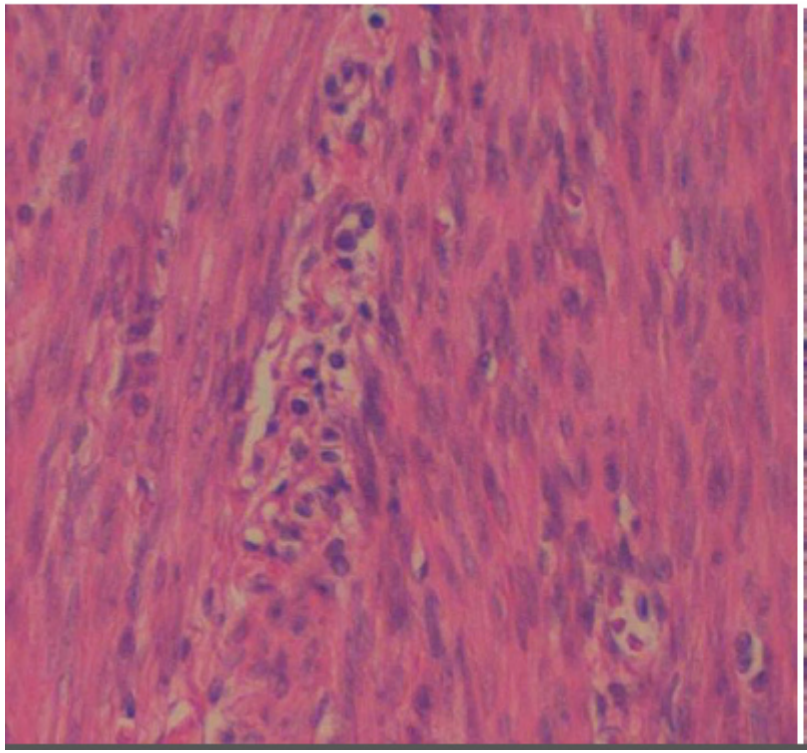
El càncer: una malaltia genètica

- **Pleiomorfisme cel·lular**: heterogeneitat en mida i forma de les cel·lules (tant en citoplasma com en nucli).
- **Atípia nuclear**:
  - nuclis hipercromàtics.
  - nuclis desproporcionadament grans (ratio nucli:citoplasma 1:1 enlloc de 1:4 o 1:6 de cèl·lules normals).
  - Forma irregular
  - Cromatina marginada (s'acumula per sota de la membrana nuclear)
  - Nucleols prominents
- **Mitosis:**
  - Nombre anormal de mitosis
  - Mitosis aberrant (triolars, quadripolars)

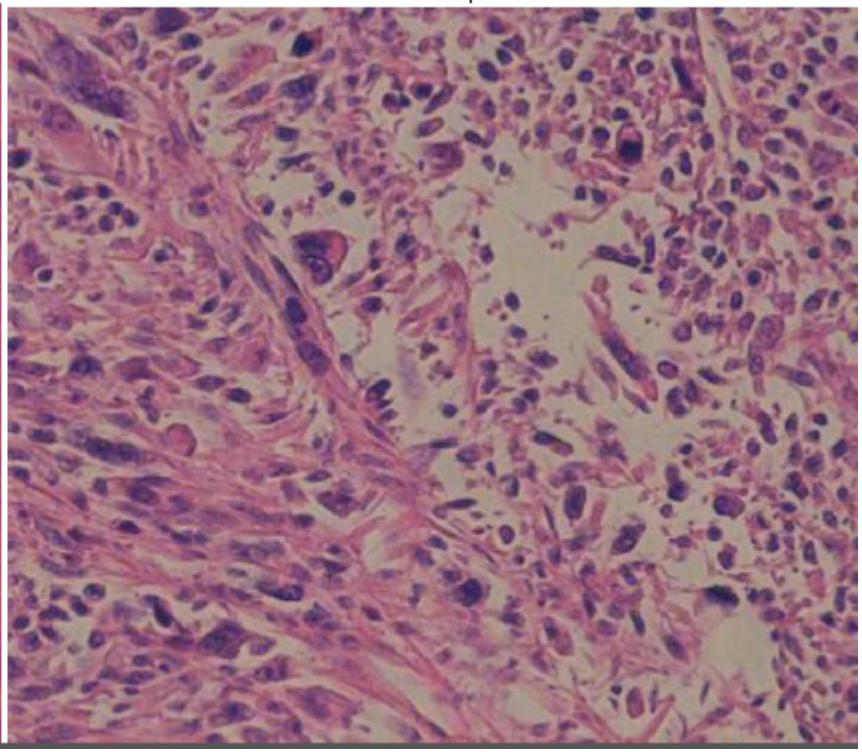


- **Pèrdua de polaritat:** desorganització del les cèl·lules en un teixit

LEIOMIOMA



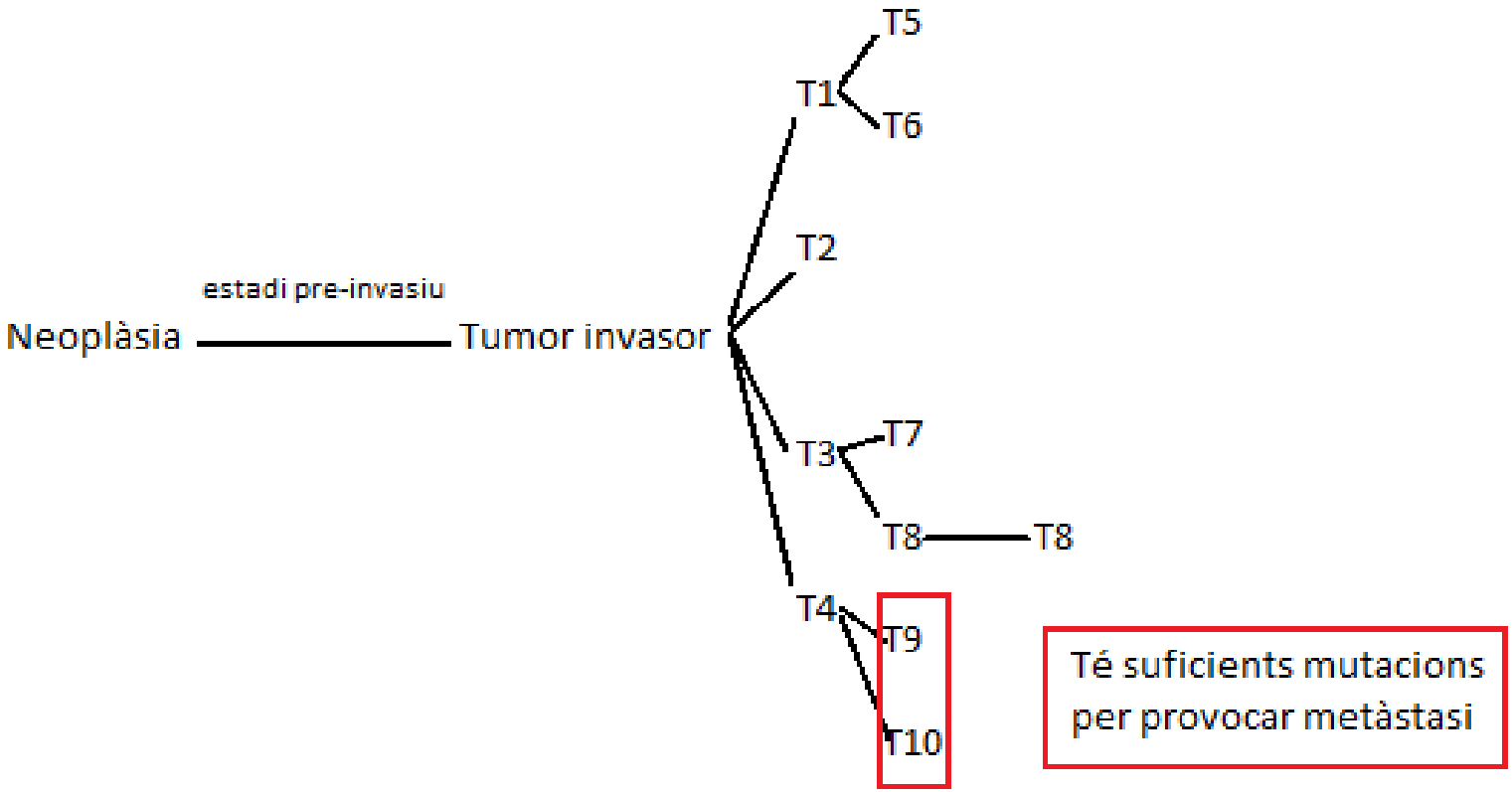
LEIOMIOSARCOMA



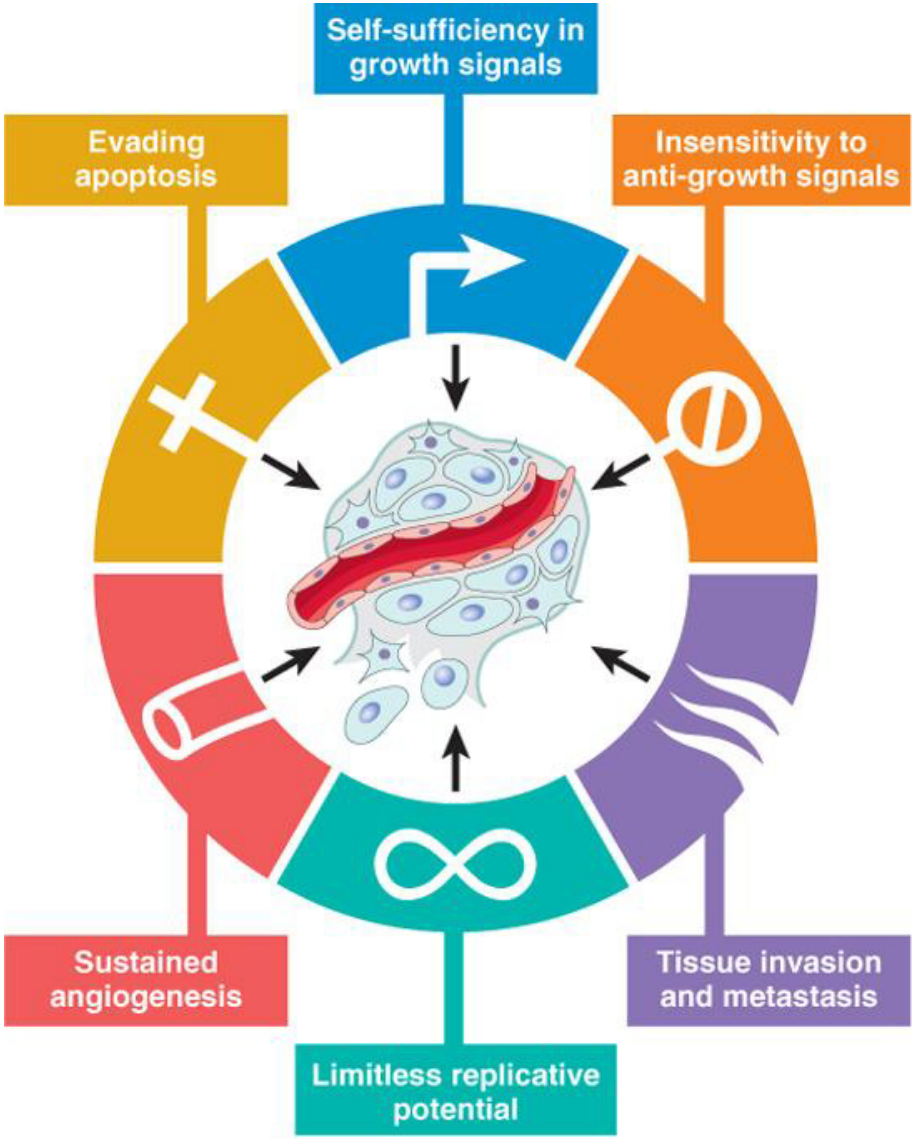
Teratoma

- Tumor desdiferenciat, les cèl·lules es diferencien fins al punt que adquireixen capacitats de cèl·lules mare embrionaries, és a dir, poden formar qualsevol tipus de teixit (ossos, dents, músculs, pèls, etc)

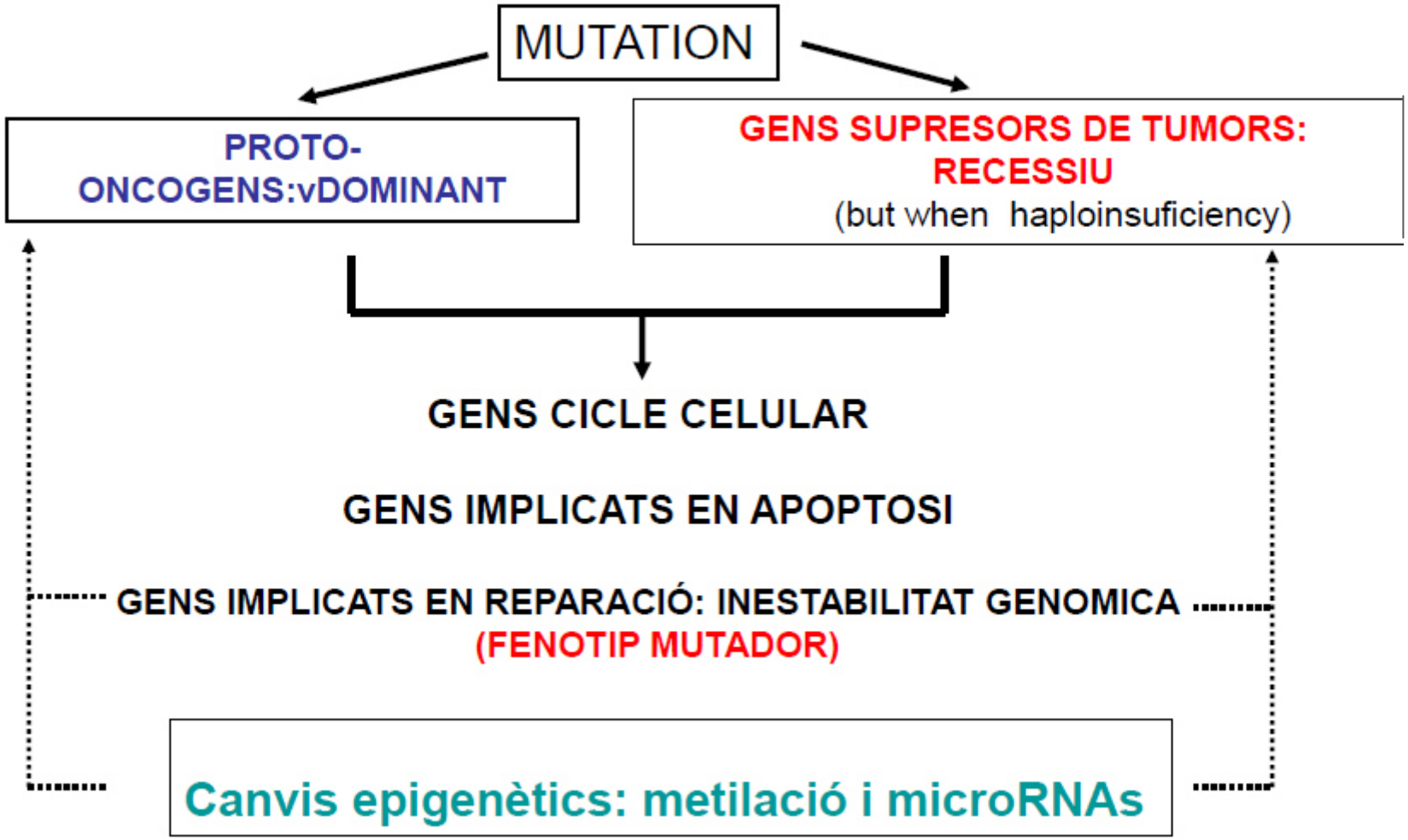
El càncer: una malaltia genètica



El càncer: una malaltia genètica

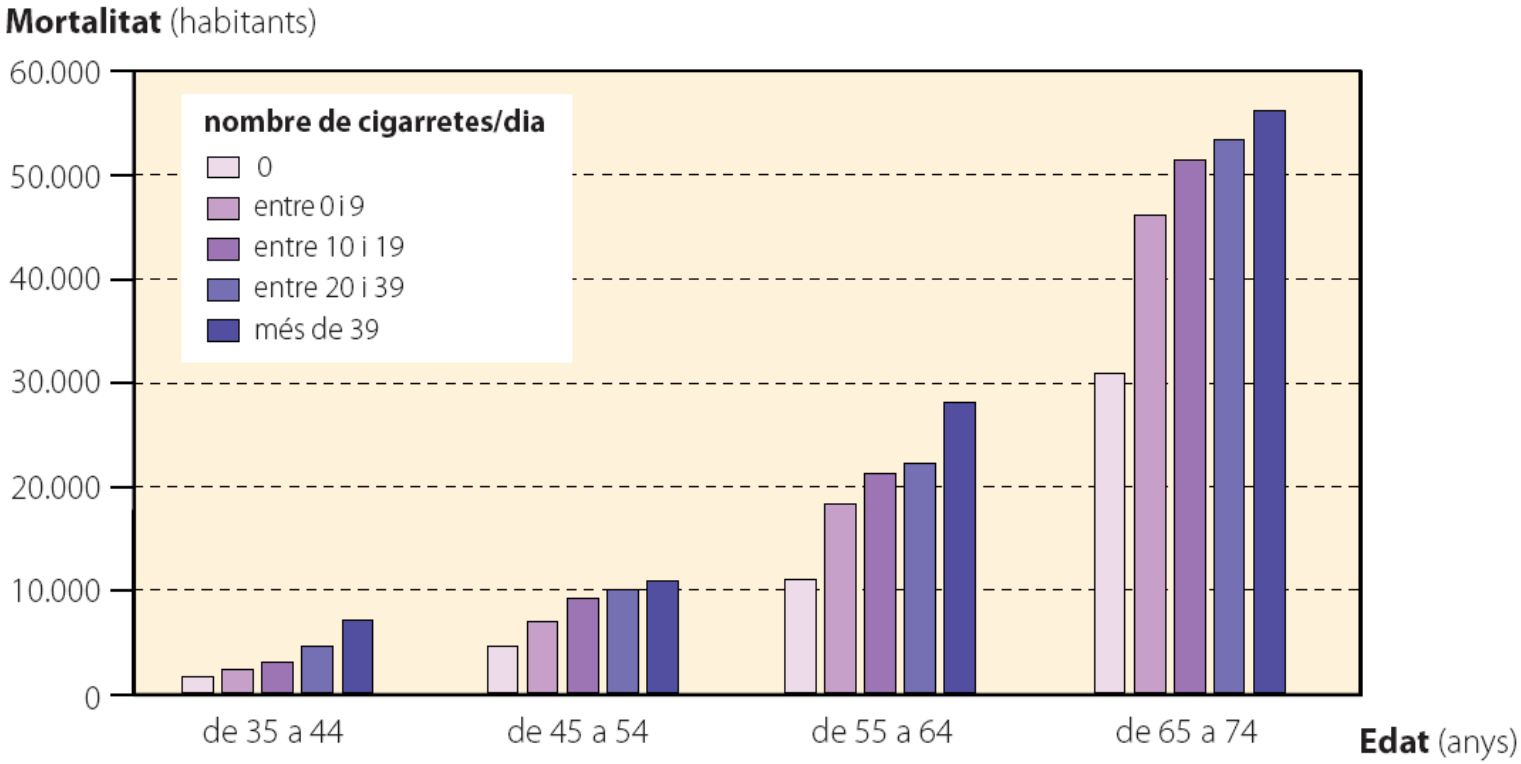


© Elsevier. Kumar et al: Robbins Basic Pathology 8e - www.studentconsult.com


MUTATION
PROTO-ONCOGENS:vDOMINANT
GENS SUPRESORS DE TUMORS: RECESSIU
(but when haploinsuficiency)
GENS CICLE CELULAR
GENS IMPLICATS EN APOPTOSI
GENS IMPLICATS EN REPARACIÓ: INESTABILITAT GENOMICA
(FENOTIP MUTADOR)
Canvis epigenètics: metilació i microRNAs

El càncer: una malaltia genètica. Agents cancerígens

CARCINOGEN: Qualsevol substància que incrementa la probabilitat de desenvolupar càncer. Les radiacions de longitud d'ona curta (rajos UV, X, ...), les radiacions nuclears, el quitrà, els fumats, el pa torrat cremat, l'amiant, el clorur de vinil, les anilines, alguns conservants i edulcorants artificials, les begudes alcohòliques d'alta graduació i el tabac en són un exemple.

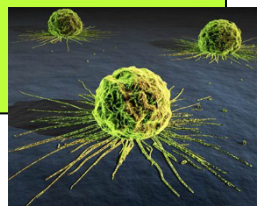


El càncer: una malaltia genètica. Teràpies

Agent cancerígen + procés promotor = càncer

Recombinació que col·loca l'oncogèn sota un potent promotor

Alteració del sistema immunitari: Limfòcits T citotòxics o interferó

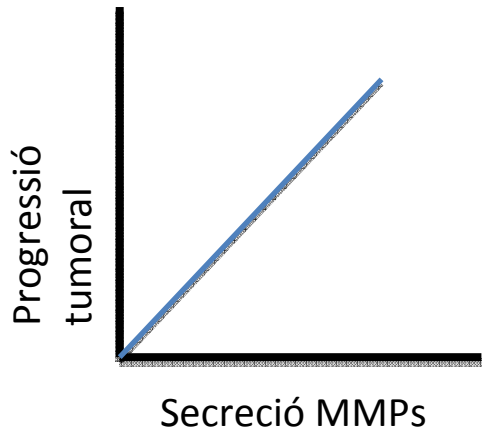


Les cèl·lules cancerígenes tenen proteïnes diferents en la membrana que actuen com antígens → Són atacades pel sistema immuntari ANTICOSSOS (si funciona correctament).

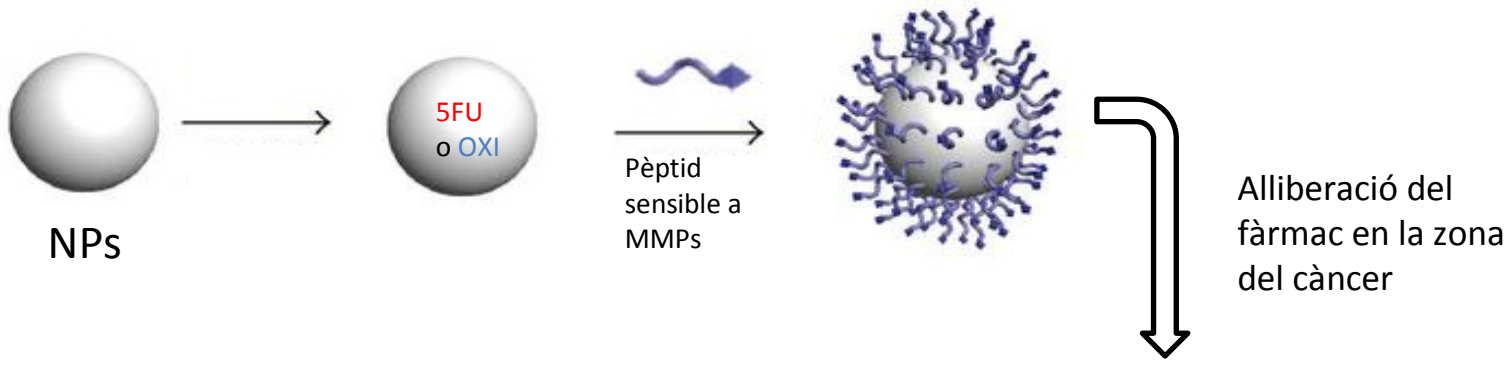
Teràpies:

- **Fabricar anticossos i inocular-los al pacient**. Per exemple: barrejant limfòcits amb cèl·lules d'un mieloma (tumor del sistema immunitari). Bons resultats en leucèmies i limfomes però no en tumors sòlids.
- S'han unit als **anticossos substàncies radiactives, citotòxiques o antineoplàstiques** que actuen així només sobre la cèl·lula que conté l'antígen (cèl·lula diana). Èxit de 30% de reducció en tumors sòlids de càncer de còlon.
- Estimular **l'autoimmunitat activa** inoculant cèl·lules canceroses atenuades, és a dir vacunant.
- **Substàncies anticancerígenes** que actuen en els sistemes de reparació del ADN o evitant els processos promotors. Es troben a la fruita, verdura, oli d'oliva, peix blau.

- Les MMPs són:
  - Endopeptidasses zinc-dependents
  - Importants en la degradació de la MEC
  - En càncer coloretal → ↑ MMP-1,-2,-3,-7,-9 i -13



- Les nanopartícules:
  - PGLA (poly lactic-co-glycolic acid) → Polímer sintètic biodegradable, biocompatible



-5FU: ⊣ processament RNA
- OXI: Ponts intracatenaris i trencaments de cadena

El projecte Genoma Humà

- Es va iniciar el 1990 i va acabar l'any 2003, abans del que s'esperava.
- Es va treballar amb ARNm **i només el 3% del genoma** són gens que codifiquen proteïnes.
- **Només tenim 25000 gens!**
- Es creu que la nostra **complexitat** deriva de les diferents maneres d'interactuar entre ells i per tant **de les múltiples formes d'expressió dels gens.**
- Actualment coneixem totes les seqüències de nucleòtids i estem estudiant les seves formes d'expressió.

On està l'errada?

SEGÜENT

Biotecnologia: Riscos i implicacions ètiques

- Anys 60: comença la tècnica del DNA recombinant.
- 1974, onze biòlegs van demanar l'establiment de normes per regular els possibles perills
- **Primer es van centrar en la seguretat i l'eficacia dels processos i productes**. Per ex: el virus SV40 de simis causa càncer, si s'introdueix en *Escherichia coli* que viu en el nostre tracte digestiu que pot passar si s'escapa accidentalment del laboratori?
- En **segon lloc** la discussió es centre en **qüestions étiques** i la relació amb els **processos legislatius.**
- 1993 **Comité Internacional de Bioètica de la Unesco.** Objectiu: evitar aspectes del progrès que atentin contra la dignitat humana.

Declaració universal sobre bioètica i drets humans UNESCO

Criteris bàcics:

✓ Límits per motius ecològics i de sanitat --- Transgènics

✓ Límits per motius ètics i morals --- Investigació amb cèl.lules mare

✓ Límits per motius socials --- Sondeig gènic per aconseguir un lloc de treball una assegurança, ..

✓ Límits per motius polítics --- Dret de tots als avenços: llavors transgèniques

Sobre les patents de seqüències d'ADN HUGO defensa que tan sols es puguin patentar les seqüències de les quals se sàpiga la funció, coma ara els marcadors, llocs d'actuació dels medicaments o gens amb funció coneguda.