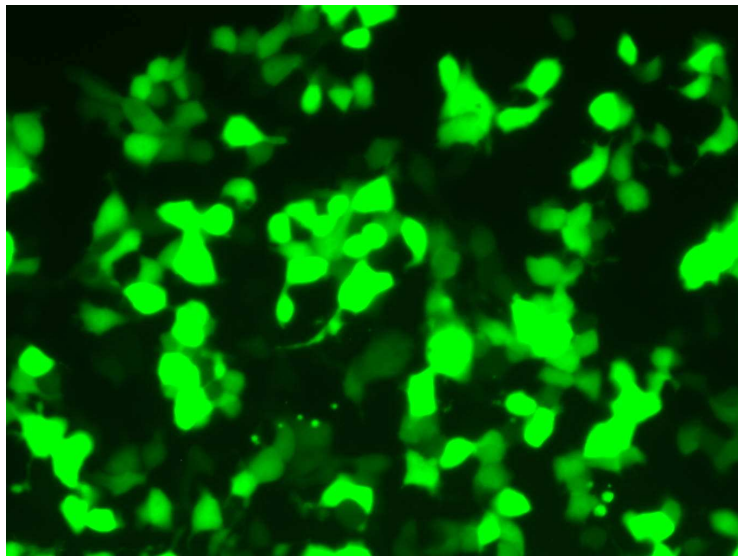


**Sobreexpressió
d'una proteïna
fluorescent
en cèl·lules humanes**



SUMARI

Dins de cada cèl·lula hi ha una molècula molt important encarregada d'emmagatzemar tota la informació genètica que dirigeix el funcionament dels éssers vius: el DNA (en alguns casos RNA). A partir d'aquestes molècules, es determinen les característiques físiques i es poden sintetitzar totes les proteïnes de cada individu, indispensables per les reaccions químiques dels éssers vius.

Fins al segle XIX, no s'havia ni imaginat la possibilitat de poder canviar la informació hereditària dels individus, però a partir del segle XX, des que es va començar a investigar sobre la genètica, s'han desenvolupat moltes tècniques per aconseguir modificar el DNA.

El concepte d'enginyeria genètica s'ha normalitzat en la nostra societat i actualment s'està utilitzant, entre d'altres coses, per trobar maneres per curar malalties tan comunes com la síndrome de Down, el càncer, o fins i tot la SIDA. Ara bé, aquesta eina tan potent cal regular-la perquè sempre s'apliqui fent el bé per a la humanitat.

ÍNDEX

Introducció.....	pàg. 1
Part conceptual.....	pàg. 3
1. La cèl·lula.....	pàg. 3
2. Els àcids nucleics.....	pàg. 9
3. Genètica molecular.....	pàg. 21
4. Les proteïnes.....	pàg. 34
5. Enginyeria genètica.....	pàg. 37
6. Part experimental.....	pàg. 55
7. Resultats.....	pàg. 82
Conclusions.....	pàg. 86
Bibliografia.....	pàg. 88

INTRODUCCIÓ

L'objectiu d'aquest treball de recerca és aprendre quins són els procediments que es segueixen per arribar a modificar la informació genètica de les cèl·lules, amb especial interès en les cèl·lules humanes, i poder-los aplicar. En el nostre cas, com més endavant veureu a la part experimental, hem comprovat aquests mecanismes aconseguint que un cultiu de cèl·lules humanes expressi unes proteïnes fluorescentes.

Degut a l'especificitat i l'extensió de l'àmbit del treball (la bioquímica i l'enginyeria genètica) ens hem vist obligats a simplificar el contingut teòric. Així, el treball l'hem dividit en dues parts: una d'explicativa i una de pràctica. La part teòrica l'hem fet el

màxim de divulgativa possible, dins les limitacions dels tecnicismes científics que requereix l'àmbit de la bioquímica, però no hem pogut evitar la seva gran extensió, ja que és necessari entendre bé la teoria per comprendre la part pràctica. Per tant, començarem amb una breu explicació de l'estructura del bacteri i de la cèl·lula humana que utilitzarem a la part pràctica, des de l'exterior fins arribar al nucli, on hi ha tota la informació genètica de la cèl·lula. A continuació, explicarem el funcionament d'aquesta informació genètica i els processos perquè els humans puguin manipular-la. Finalment, aplicarem els coneixements apresos amb la part experimental.

Les fonts d'informació principals a les quals hem recorregut són el llibre *Lehninger: Principis De Bioquímica*, de David L. Nelson i Michael M. Cox, i el llibre *Genètica: un enfocament conceptual*, de Benjamin A. Pierce. Altres fonts han estat les pàgines web de la *Universidad Complutense de Madrid* i la de la *Universidad de Salamanca*.

1. LA CÈL·LULA

El bacteri

Els bacteris són organismes unicel·lulars. Tot i que són de mides molt variables, oscil·len entre 0,5 i 5 µm. Són **cèl·lules procariotes** perquè no tenen membrana nuclear (per tant el seu material genètic està en contacte directe amb el citoplasma), estan recoberts per una paret cel·lular de peptidoglicà, no tenen ni mitocondris ni cloroplasts, solen contenir flagels o cilis, l'estructura dels seus cromosomes és senzilla, i perquè no duen a terme ni la meiosi ni la mitosi¹.

Estructura externa

La **paret cel·lular** és una capa rígida que envolta la membrana citoplasmàtica i actua com a esquelet extern. És un element obligat del bacteri i representa un dels elements més característics de les cèl·lules procariotes.

La **membrana citoplasmàtica** és una estructura que envolta el citoplasma i el separa de la paret cel·lular. Està composta principalment per fosfolípids i proteïnes, i representa un 25% del pes de la cèl·lula (aproximadament). També hi ha presència d'una gran quantitat de ribosomes que fabriquen els elements constituents de la paret.

La funció principal de la membrana és la protecció del nucli, orgànuls i estructures citoplasmàtiques: per un costat actua com a barrera osmòtica impedit que les substàncies es desplacin de dins a fora de la cèl·lula per equilibrar les concentracions del medi intern i l'extern, ja que això provocaria el col·lapse del bacteri, i d'altra banda actua com a barrera activa facilitant el transport de determinats elements que el bacteri ha

¹ Meiosi i mitosi: són dos mecanismes que algunes cèl·lules fan per dividir-se.

d'incorporar o eliminar. A la vegada, les proteïnes que hi ha a la membrana són molt importants pel reconeixement de les cèl·lules.

Estructura interna

L'estructura interna del bacteri es considera el medi que està limitat per la membrana citoplasmàtica, és a dir, el citoplasma, els orgànuls cel·lulars i el nuclèol.

El **citoplasma** és el medi intern de la cèl·lula. És una substància gelatinosa formada per aigua en un 85%, delimitada per la membrana cel·lular, que conté els orgànuls cel·lulars. Les principals estructures que hi ha al citoplasma bacterià són:

-ribosomes: són els orgànuls encarregats de traduir l'RNA bacterià a aminoàcids per fabricar proteïnes que el bacteri utilitzarà per fer el seu metabolisme. Estan formats per dues subunitats: una de gran i una de petita que només s'uniran durant la traducció. Estan compostos per RNA ribosòmic i proteïnes.

-inclusions citoplasmàtiques: són els vacúols, que emmagatzemen líquids o gasos i que es formen en més quantitat en els bacteris envellits, i unes granulacions sòlides que tenen funció de reserva energètica ja que emmagatzemen lípids, proteïnes, glúcids i fosfats.

El citoplasma bacterià, a diferència del de les cèl·lules eucariotes, no presenta ni mitocondris (orgànul cel·lular semiautònom que té la propietat de formar ATP, la molècula energètica), ni cloroplasts (orgànul cel·lular semiautònom, característic de les cèl·lules vegetals, ric en clorofil·la, que s'encarrega de produir la fotosíntesi).

El nucli conté el material genètic del bacteri. A diferència de les cèl·lules eucariotes, no té membrana. D'aquest tipus de nucli en diem **nucleoide**, i conté una gran molècula

circular de DNA que està en contacte directe amb el citoplasma. Aquest fet provoca que mentre s'estigui transcrivint el DNA a RNA, una part d'aquest RNA ja comenci traduir-se a proteïnes.

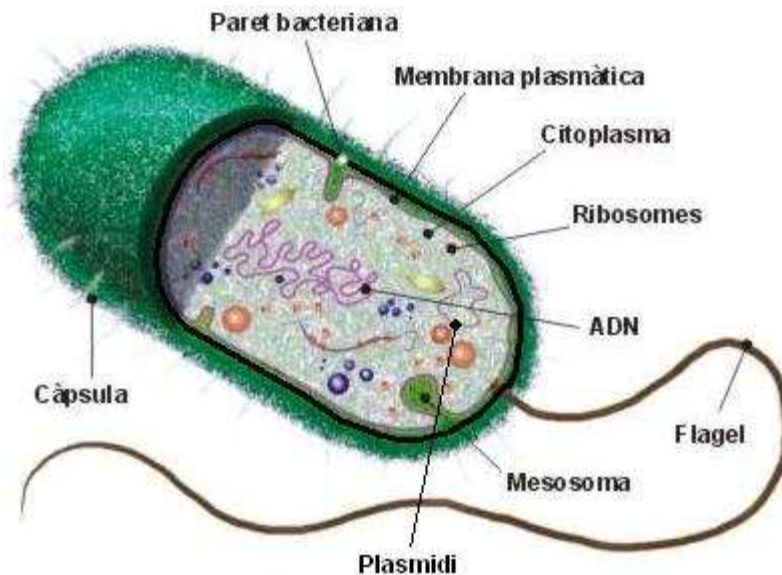


Fig. 1.1. Estructura d'un bacteri.

En moltes espècies de bacteris hi ha un nombre variable de molècules de DNA disperses pel citoplasma a més del cromosoma central. Aquestes són els **plasmidis**, que contenen informació no essencial de la cèl·lula, tot i que ajuda a la seva supervivència. Per exemple, hi ha plasmidis que porten la informació genètica per formar resistències a antibiòtics; n'hi ha d'altres que permeten la síntesi de substàncies letals per organismes estranys; o també n'hi ha que porten les ordres per crear substàncies perjudicials per als organismes als quals s'estableix el bacteri.

Els plasmidis tenen unes propietats molt peculiars, que influeixen molt en el genoma del bacteri. En primer lloc, igual que el DNA del nucleòide, el DNA plasmídic es pot replicar i trasmetre's a la descendència. En segon lloc, tenen la propietat de recombinar-

se (integrar-se o unir-se) amb el DNA nuclear dels bacteris i alterar-ne el genoma inicial. Finalment, es poden desplaçar mitjançant els pilis d'un bacteri i transferir-se a altres bacteris pel simple contacte de superfícies.

HEK 293T: cèl·lula eucariota

Les **cèl·lules eucariotes** es caracteritzen per tenir el material genètic tancat dins una doble membrana nuclear. A diferència de les cèl·lules procariotes, no tenen paret cel·lular, tenen mitocondris, tenen una molècula molt llarga de DNA, i es divideixen per mitosi i algunes per meiosi. Són més grosses que els bacteris i poden unir-se formant organismes pluricel·lulars molt més complexos.

Estructura externa

La capa més externa de la cèl·lula és la **membrana citoplasmàtica**, que delimita el seu medi intern, i està composta per fosfolípids, colesterol, glúcids i proteïnes. Els fosfolípids ocupen el percentatge en volum més gran de la membrana. Sobre aquesta o travessant-la, s'estableixen proteïnes i glúcids, que són un tret identitari de la cèl·lula per relacionar-se. Les proteïnes són d'especial importància, ja que algunes permeten l'entrada i sortida de determinades substàncies dins la cèl·lula. Un exemple, és la proteïna 4F2, que reconeix proteïnes de determinats antígens, i que utilitzarem a la part pràctica. L'estructura de la membrana és igual que la dels bacteris:

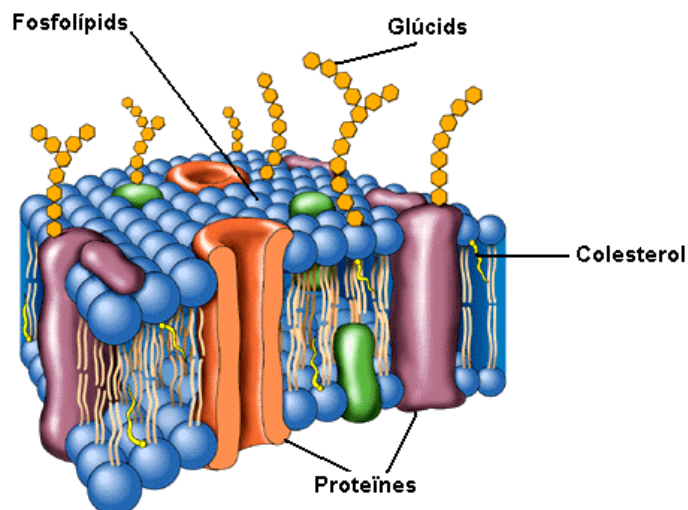


Fig. 1.2. Esquema bàsic de la membrana cel·lular.

Estructura interna

L'estructura interna està formada pel citoplasma, els orgànuls cel·lulars i el nucli de la cèl·lula.

El **citoplasma** és el medi intern de totes les cèl·lules. El citosol és la substància que forma el citoplasma i té textura gelatinosa. Els **orgànuls cel·lulars** són molt diversos en les eucariotes. Alguns dels més importants són els vacúols (emmagatzemen substàncies), el reticle endoplasmàtic (emmagatzemen proteïnes produïdes pels ribosomes i guarden lípids), l'aparell de Golgi (acaben la síntesi de glúcids i lípids del reticle endoplasmàtic), mitocondris (fan la respiració cel·lular i produeixen energia), lisosomes (digereixen de molècules), **ribosomes** (sintetitzen proteïnes), etc.

Al centre de la cèl·lula hi ha la **membrana nuclear**, que és una doble capa formada també per fosfolípids i uns porus, que són petites obertures a la membrana que permeten l'entrada i sortida de ribosomes i de RNA (un àcid nucleic).

Dins de la membrana nuclear hi ha una llarga molècula de DNA, que emmagatzema la informació genètica de cada cèl·lula. Com que no hi cabria sencera dins del nucli, la molècula la trobem enrotllada a unes proteïnes, de manera que ocupa menys espai. Aquest conjunt de DNA i proteïnes s'anomena cromatina, que es condensarà formant cromosomes.

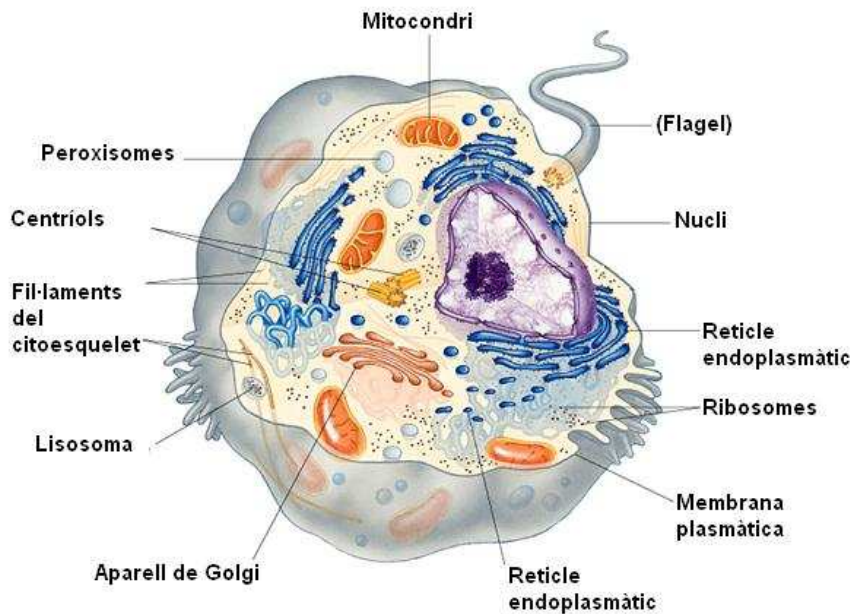


Fig. 1.3. Estructura de la cèl·lula eucariota

HEK 293T

HEK 293T (*Human Embryonic Kidney 293T*), són una línia de cèl·lules derivades de cèl·lules de ronyó d'embrió humà. Són molt utilitzades en investigació bioquímica i de biotecnologia perquè és fàcil de transfectar-les-hi DNA extern i creixen ràpidament. Nosaltres també treballarem amb aquestes cèl·lules aprofitant les seves propietats.

2. ELS ÀCIDS NUCLEICS

Els àcids nucleics són les molècules encarregades d'emmagatzemar la informació genètica per tal de dirigir el funcionament cel·lular i el de l'organisme. Aquesta informació porta l'ordre per sintetitzar proteïnes i és transmesa a la descendència, dos requisits bàsics de la vida.

Podem distingir dos tipus d'àcids nucleics: el DNA i l'RNA. El DNA, com ja explicarem més endavant, es troba a el nucli de totes les cèl·lules (nucleoide en cas de procariotes) i la seva funció és emmagatzemar la informació genètica. Com que és la molècula més important de la cèl·lula, no pot marxar del nucli i no serveix mai com a motlle directe per fer les proteïnes. Per portar aquesta informació al citoplasma, es necessita l'RNA, que té la capacitat de sortir del nucli al citoplasma i és essencial durant el procés de fabricació de les proteïnes.

Tot aquest material genètic, està perfectament organitzat en gens, que són fragments de DNA i RNA que duen l'ordre per fabricar una proteïna o una part d'aquesta.

Químicament, podem dir que els àcids nucleics són macromolècules polimèriques lineals, és a dir, molècules molt grans formades per la repetició d'una estructura bàsica o monòmer, que en aquest cas s'anomena nucleòtid. La seqüència de nucleòtids que es forma quan aquests s'ajunten és aperiòdica, fet que implica l'existència de la informació.

Els nucleòtids

Els **nucleòtids** estan compostos de tres elements primordials:

-**Glúcid**: Són la base del nucleòtid. És una pentosa cíclica (molècula de 5 carbonis) en forma de pentàgon, que pot ser de ribosa (β -D-ribofuranosa) i formar RNA, o també pot ser de desoxiribosa (β -D-2-desoxiribofuranosa) i formar DNA. De fet, tal com diu el nom, la desoxiribosa és un derivat de la molècula de ribosa, la qual ha perdut un oxigen del grup hidroxil (-OH) enllaçat al carboni 2'. En els dos casos, són molècules beta, que vol dir que el grup hidroxil del carboni C1' el trobem cap amunt. Per numerar els àtoms de la pentosa, en sentit de les agulles del rellotge, els numerem C1', C2', C3', C4' i C5'. Aquest últim carboni no forma part directament del cicle. Els carbonis 3' i 5' són molt importants a l'hora de formar l'estructura del DNA.

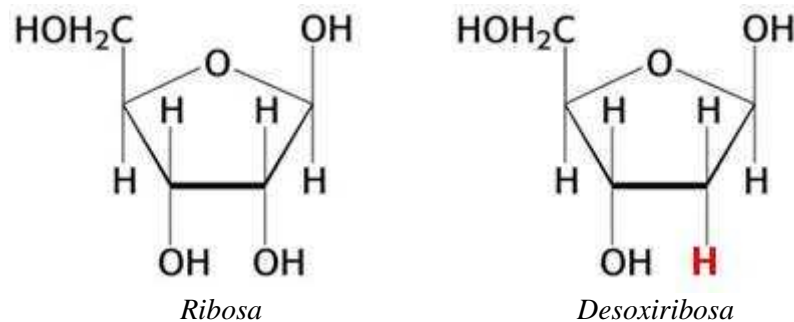


Fig. 2.1. La pentosa del nucleòsid.

-**Bases nitrogenades**: Són molècules orgàniques cícliques amb dos o més àtoms de nitrogen. Segons la forma que presenten les podem dividir en dos grups:

-**Púriques**: Són uns sistemes plans de nou àtoms principals, en forma d'hexàgon unit per un costat amb un pentàgon, dels quals cinc àtoms són de carboni i quatre són de nitrogen. El seu nom es deu a que són compostos derivats de la purina, que és un compost bicíclic (format per dos anells units entre sí). Ho són l'adenina (A) i la guanina

(G). Per anomenar els àtoms principals del cicle, escrivim el símbol de l'element i el número que li pertoca segons la numeració de la següent figura:

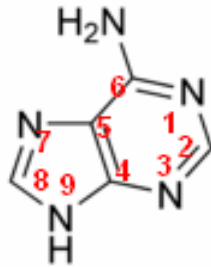


Fig. 2.2. Numeració dels àtoms de les bases púriques.

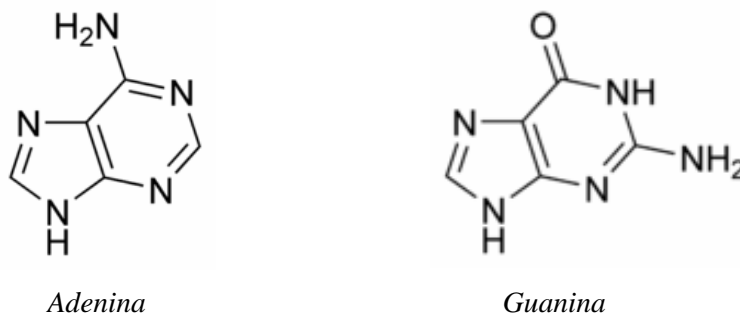


Fig. 2.3. Bases nitrogenades púriques.

-Pirimidíniques: Són un sistema pla de sis àtoms principals formant un hexàgon. El seu nom es deu a que deriven de la pirimidina, que és un compost orgànic semblant al benzè, però substituïnt el carboni 1 i 3 per àtoms de nitrogen. Ho són la citosina (C), la timina (T) i l'uracil (U). La timina només la trobem al DNA mentre que l'uracil només el trobem a l'RNA. Per anomenar els àtoms que formen l'anell, escriurem el símbol de l'element i el número segons el següent esquema:

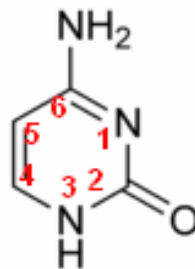
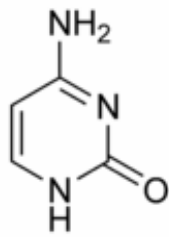
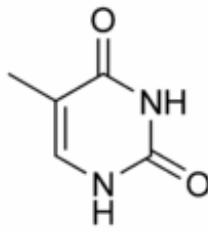


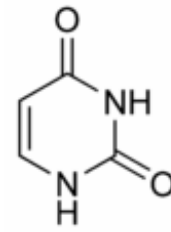
Fig. 2.4. Numeració dels àtoms de les bases pirimidíniques.



Citosina



Timina (DNA)



Uracil (RNA)

Fig. 2.5. Les bases pirimidíniques.

En el DNA, les bases adenina i timina són complementàries entre elles, i les bases guanina i citosina també ho són. En l'RNA, la complementarietat de bases es manté canviant la timina per l'uracil. Poden aparèixer bases nitrogenades secundàries, però no són tan presents en el DNA i el RNA. En el cas del DNA serveixen com a senyals per regular i protegir el missatge.

Les bases nitrogenades s'uneixen al carboni 1' del glúcid mitjançant un enllaç N- β -glucosídic formant una estructura anomenada nucleòsid. El grup hidroxil del carboni 1' reacciona amb l'hidrogen enllaçat al nitrogen 1 si es tracta d'una base nitrogenada pirimidínica, o amb l'hidrogen del nitrogen 9 si és una base púrica, i es forma l'enllaç, alliberant-se una molècula d'aigua.

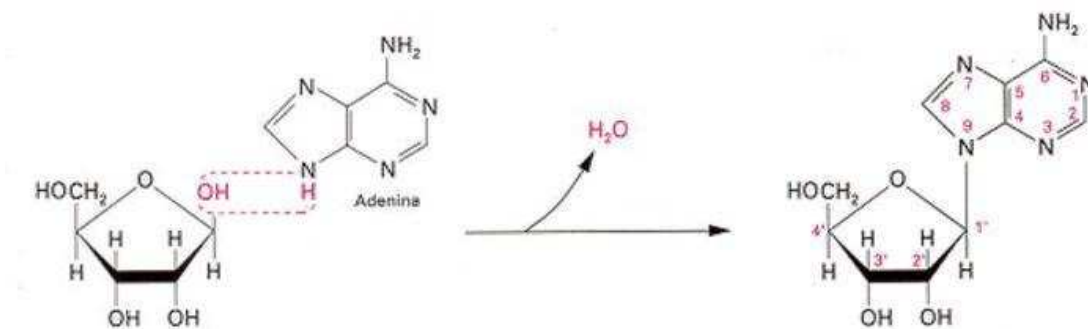


Fig. 2.6. Formació del nucleòsid d'adenina

-Àcid fosfòric: És una molècula d'àcid ortofosfòric, de fórmula química H_3PO_4 , que s'esterifica² a la pentosa amb carboni 5'. L'enllaç es forma per la reacció del grup -OH del carboni 5' del glúcid amb l'hidrogen d'un grup -OH de l'àcid fosfòric, ja que aquests són fàcilment ionitzables (perden hidrogens fàcilment i l'oxigen queda carregat negativament), i es perd una molècula d'aigua.

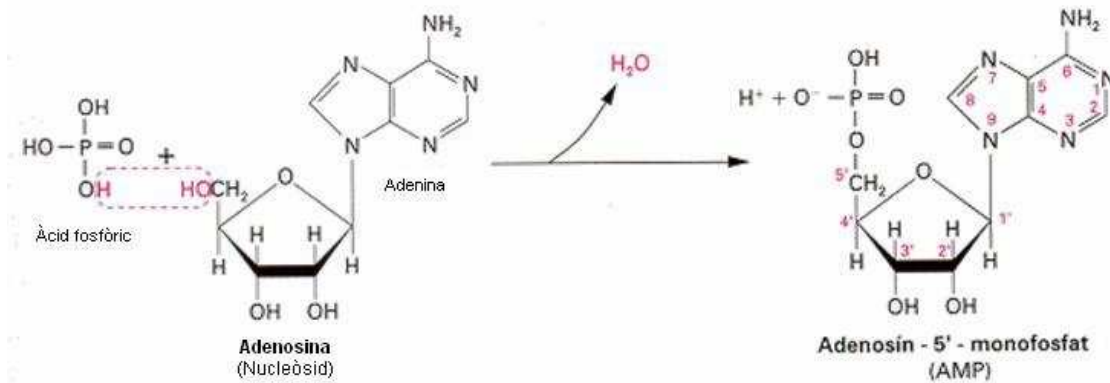


Fig. 2. 7. Enllaç éster entre el fosfat i el glúcid per formar un nucleòtid d'adenina.

Els nucleòtids, per formar els polímers d'àcids nucleics s'enllacen entre ells mitjançant els fosfats, que formaran enllaços fosfodiéster. Per una banda, com hem dit anteriorment, els fosfats s'esterifiquen al glúcid pel carboni 5', i d'altra banda, el mateix fosfat es pot unir al següent nucleòtid, però en aquest cas al carboni 3' del glúcid.

Aquesta successió d'unions de nucleòtids forma els polinucleòtids, que es caracteritzen per tenir un inici i un final. L'inici és l'últim carboni 5', el fosfat del qual no s'ha enllaçat amb cap altre nucleòtid, i el final el trobem a l'extrem oposat, en l'últim carboni 3' que tampoc s'ha esterificat amb el fosfat de cap nucleòtid.

² Esterificació: procés de formació d'un enllaç éster, en el qual reaccionen un grup alcohol amb un grup àcid, alliberant aigua.

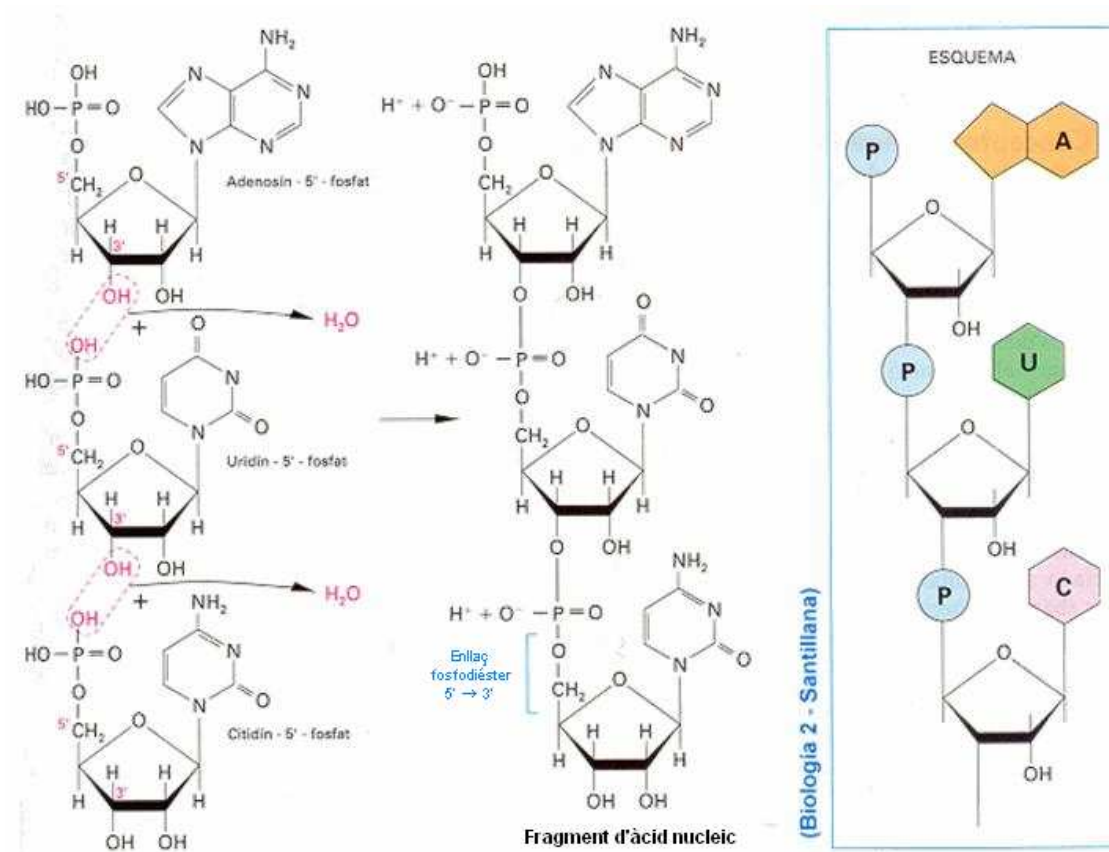


Fig. 2.8. Formació d'un fragment de RNA constituït per tres nucleòtids units en la seqüència A-U-C mitjançant enllaços fosfodièster

Els grups fosfats queden ionitzats en perdre els hidrògens i per quedar neutralitzats, ions positius de proteïnes o ions metàl·lics s'adhereixen a la molècula. A més l'estructura de DNA i RNA és hidrofílica³ perquè els grups hidroxils dels altres glúcids formen enllaços pont d'hidrogen amb l'aigua.

En l'exemple de la figura anterior, vèiem el trinucleòtid següent:



Els polinucleòtids polimeritzen molt, arribant a formar cadenes de centenars de milions de nucleòtids, com en el cas del DNA.

³ Hidrofílic: propietat física d'una molècula que té tendència a enllaçar-se amb l'aigua (H₂O) mitjançant l'enllaç d'hidrogen.

L'Àcid Desoxirribonucleic

El **DNA** (àcid desoxirribonucleic) és una macromolècula formada per la repetició de nucleòtids que contenen un glúcid de desoxiribosa, àcid fosfòric, i adenina, guanina, citosina o timina.

L'estructura més comuna del del DNA, va ser proposada per Watson i Crick en els estudis que van realitzar al 1953. Segons el seu model, el DNA es compon de dues cadenes (és bicatenari), que s'enrotllen sobre un eix imaginari formant una doble hèlix. Els fosfats i els glúcids queden a l'exterior, protegint les bases nitrogenades que queden a l'interior, en un pla quasibé perpendicular a l'eix. Aquesta disposició es deu a que les bases nitrogenades són hidrofòbiques mentre que la cadena de fosfats i glúcids és hidrofílica.

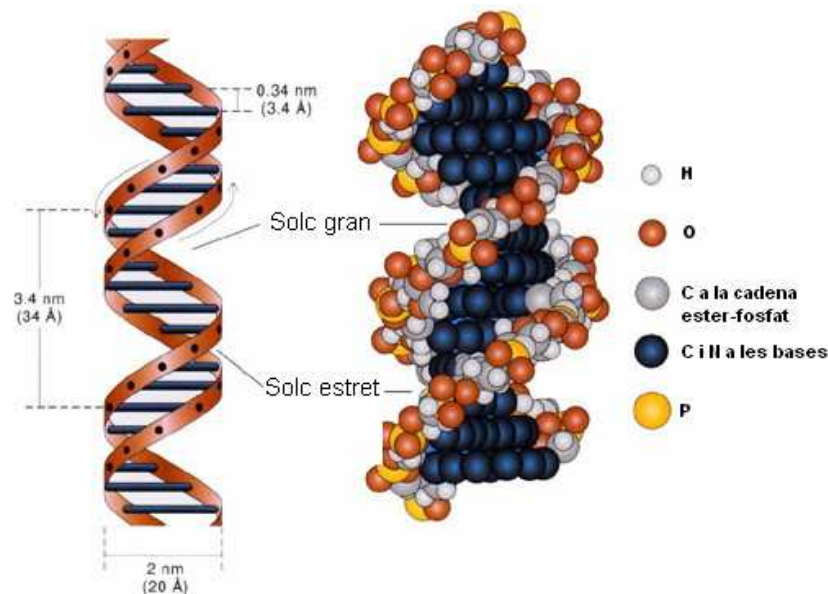


Fig. 2.9. Estructura del DNA.

Les dues cadenes són antiparal·leles (són paral·leles però tenen un sentit oposat) tot i que ambdues són dextrògires (giren cap a la dreta) i són plectonèmiques, que vol dir que per separar les cadenes, primer cal desenrotllar l'hèlix.

Com vèiem en la imatge anterior, el seu pas de rosca, que és la distància entre cada volta, és constant i mesura 34 Å (equivalent a deu bases nitrogenades). El diàmetre també és constant i mesura 20 Å. Entre les bases nitrogenades, hi ha una distància de 3,4 Å i s'apilen paral·lelament. Es distingeix clarament el solc estret del solc gruixut.

Les dues cadenes s'uneixen gràcies a enllaços pont d'hidrogen⁴ que s'estableixen entre les bases nitrogenades complementàries. Entre l'adenina i la timina s'estableixen dos enllaços pont d'hidrogen i entre la guanina i la citosina se n'estableixen tres. Això justifica la complementarietat de bases, descoberta al 1950 quan Chargaff, segons els estudis que va fer, va veure que la concentració d'adenina i timina era la mateixa, i la concentració de guanina i citosina també coincidia. Tot i que els pont d'hidrogen sols són molt febles, en trobar-se en gran quantitat donen molta estabilitat a la molècula. De fet, l'estructura es manté gràcies a ells.

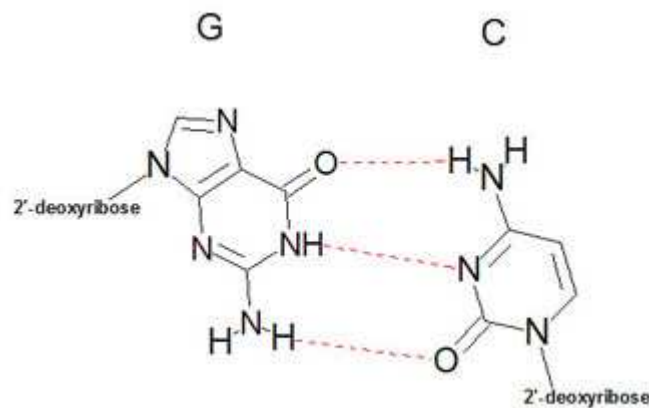


Fig. 2.10. Complementarietat entre la guanina i la citosina ($G \equiv C$).

⁴ Pont d'hidrogen: és una interacció atractiva entre molècules. És l'enllaç més important tot i que no és tan fort com l'enllaç covalent o l'iónic.

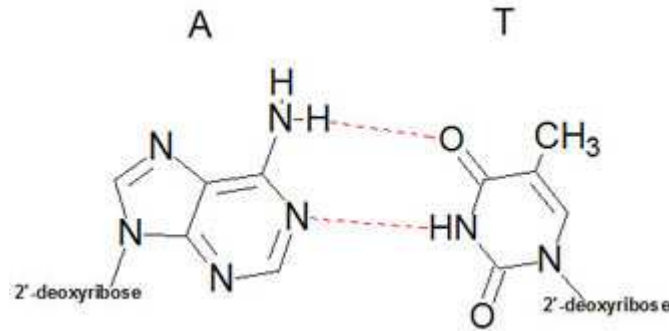


Fig. 2.11. Complementarietat entre l'adenina i la timina (A=T).

Els dos polinucleòtids, quan formen aquesta estructura, tenen polaritat oposada. Això és degut a que, tan el 5'-OH com el 3'-OH poden esterificar-se a un o varis ortofosfats, els quals donen polaritat a la molècula.

Posem pel cas que tenim el següent fragment de DNA:



Amb aquest exemple veiem la complementarietat de bases entre adenina i timina, i guanina i citosina. A més, veiem que les dues cadenes són antiparal·leles perquè l'extrem 5' de la cadena de dalt està al costat de l'extrem 3' de la seva complementària, i a l'altre extrem passa el contrari.

Watson i Crick, després de descobrir l'estructura del DNA, van veure que aquesta suggeria i justificava propietats molt importants del material hereditari com la capacitat de replicar-se, la variabilitat genètica (ja que no hi ha cap restricció en l'ordre de les bases nitrogenades), les mutacions, i l'existència d'un codi genètic que pogués relacionar els nucleòtids amb els aminoàcids. En el DNA, però, de vegades es poden apreciar variacions al model de Watson i Crick depenent de les condicions fisiològiques en les

que es troba la molècula. Aquestes desviacions, es creu que serveixen per regular l'expressió d'alguns gens o per la seva recombinació.

El DNA, durant la interfase⁵, es troba únicament al nucli o nuclèol de la cèl·lula en un estat de descondensació, tot i que està enrotllat en unes estructures proteiques, formant el que s'anomena cromatina. Aquestes estructures s'anomenen octàmers d'histones i, tal com diu el nom, estan formades de vuit histones unides formant unes estructures cúbiques.

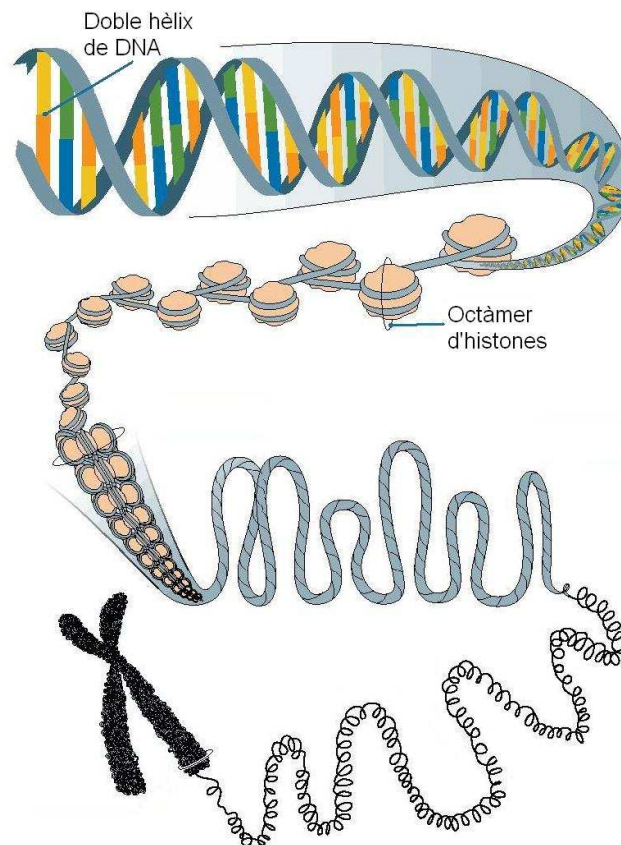


Fig. 2.12. Condensació del DNA per formar els cromosomes.

Durant la divisió cel·lular, la cromatina es comença a condensar enrotllant-se entre si mateixa formant unes estructures molt compactes anomenades cromosomes.

⁵Interfase: període de vida de la cèl·lula en el qual encara no s'ha de dividir.

L'Àcid Ribonucleic

L'**RNA** és una macromolècula formada per la repetició de ribonucleòtids, és a dir, nucleòtids formats per ribosa, àcid fosfòric, i adenina, guanina, citosina o uracil. En el seu cas, és de cadena simple (monocatenària) i en un primer moment també adopta una conformació helicoidal dextrògira deguda a les interaccions en l'apilament de les bases.

La funció principal de l'RNA és desxifrar i transmetre la informació del DNA als ribosomes perquè es fabriquin proteïnes, les quals són una part essencial dels organismes perquè participen en el seu metabolisme. Segons la seva funció específica, distingim tres tipus principals de RNA.

-RNA missatger (RNAm): Representa entre el 3 i el 5% de l'RNA total de la cèl·lula. És una cadena relativament curta perquè té entre 5.000 i 10.000 nucleòtids. Això és degut a que cada cadena sol representar només un gen. La seva funció específica és portar el missatge genètic al citoplasma a través de porus nuclears perquè el ribosoma fabriqui les proteïnes. El missatge pot consistir en un sol gen, llavors la cadena és monocistrònica, o en varis gens, fet no tan usual, i la cadena és policistrònica. Aquest RNA, a part dels gens, porta seqüències que ajuden a regular la síntesi de proteïnes.

-RNA ribosòmic (RNAr): És el més abundant perquè representa un 80 ó 90% del RNA total de la cèl·lula. La seva funció és, juntament amb proteïnes ribosòmiques que entren al nucli pels porus nuclears, formar les dues subunitats dels ribosomes. Al nucli, es forma una molècula molt gran de RNA que es divideix en fragments curts que formen ribosomes.

-RNA de transferència (RNAt): Representa entre un 5 i un 15% de l'RNA de la cèl·lula. Presenta bases modificades a part d'adenina, guanina, citosina i uracil. En madurar, apareixen zones de doble cadena i bucles. La seva funció és transferir els

aminoàcids en un ordre determinat, d'acord amb l'RNA missatger, per tal de formar les cadenes polipeptídiques, que acabaran configurant-se com a proteïnes.

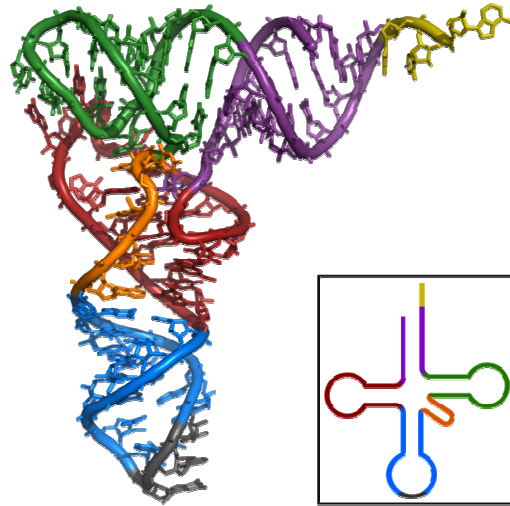


Fig. 2.13. Estructura tridimensional (esquerra) i bidimensional (dreta) de l'RNA de transferència.

Cada tipus de RNA agafa una configuració determinada en l'espai anomenada maduració (ja l'explicarem més endavant) que serà fonamental per dur a terme l'expressió gènica.

3. GENÈTICA MOLECULAR

L'estructura del DNA que varen proposar Watson i Crick l'any 1958 va permetre deduir com podria ser el metabolisme dels àcids nucleics. El metabolisme comprèn la replicació del DNA, i tots els processos per arribar a fabricar proteïnes a partir d'aquest.

Com que en les cèl·lules eucariotes el DNA es troba al nucli, però el material genètic s'expressa al citoplasma en forma de proteïnes, es va suposar que hi hauria una molècula intermediària que pogués portar la informació del nucli al citoplasma. Així, l'any 1961 es va descobrir l'RNA (el missatger en un principi i els altres dos tipus més tard).

Watson i Crick, basant-se en les seves deduccions a partir de l'estructura del DNA i també en el descobriment de l'RNA, van elaborar un sistema fonamental de manteniment i circulació del DNA dins les cèl·lules, que van anomenar "Dogma Central de la Biologia Molecular".

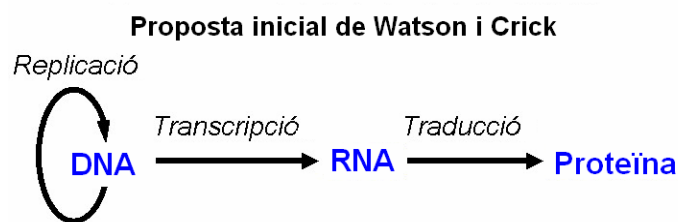


Fig. 3.1. Primera proposta del Dogma Central de la Biologia Molecular.

En aquest sistema, el DNA tenia capacitat de replicar-se per mantenir-se igual en totes les cèl·lules, i transcriure's en RNA per a poder sortir al citoplasma. L'RNA es traduïa al codi de les proteïnes. Era fonamental, doncs, l'existència d'un codi que relacionés el llenguatge dels nucleòtids amb el dels aminoàcids.

Al cap de poc temps, però, Temin va descobrir que alguns retrovirus que tenien l'RNA com a material hereditari, replicaven l'RNA per conservar la informació. També va descobrir que alguns virus podien fer la transcripció inversa, és a dir, sintetitzar DNA a partir de RNA. Per tant, es va haver de modificar el Dogma.

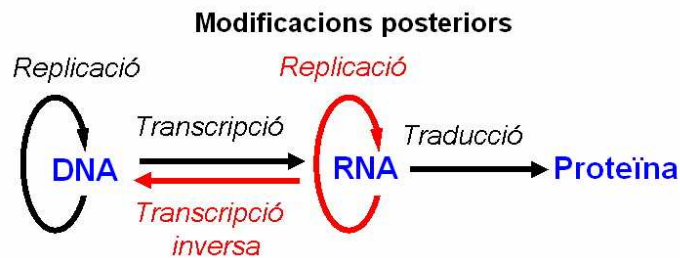


Fig. 3.2. Proposta actual del Dogma Central de la Biologia Molecular.

A continuació explicarem el metabolisme bàsic dels àcids nucleics.

Replicació del DNA

La replicació és un procés que té per objectiu duplicar la informació genètica d'una cèl·lula perquè, en dividir-se, les dues cèl·lules resultants tinguin exactament els mateixos gens.

Els primers estudis que es van fer sobre la replicació del DNA van ajudar a establir les seves propietats bàsiques, que són idèntiques en tots els organismes.

En primer lloc, la replicació és semiconservadora. Això vol dir que, si partim d'una molècula de DNA, en replicar-se, les dues cadenes es separen i serveixen de motlle per crear-ne una de complementària. De manera que tindrem dues molècules amb una cadena vella i una de nova cadascuna. Aquesta característica la va descobrir Watson i Crick, i la va demostrar Meselson i Stahl al 1957 mitjançant un conegut experiment.

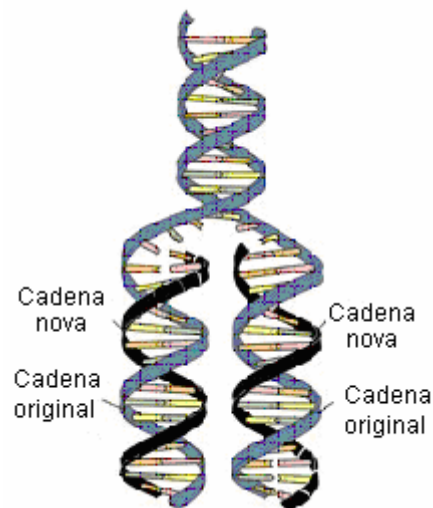


Fig. 3.3. Teoria semiconservativa.

En segon lloc, la replicació comença en un punt d'origen i normalment es fa bidireccionalment, és a dir, en els dos sentits partint del mateix punt d'origen. Aquesta propietat la va descobrir John Cairns al 1963 mitjançant l'autoradiografia amb DNA d'*Escherichia coli*.

Finalment, la síntesi de DNA es fa en direcció $5' \rightarrow 3'$ i és semidiscontínua. Com que la cadena que es sintetitza és complementària a la cadena vella, la lectura de la cadena vella es fa de $3'$ a $5'$ sempre. Però des del punt de replicació al lloc on s'estan separant les dues cadenes velles, hi ha una cadena que va de $3'$ a $5'$ i una altra que va de $5'$ a $3'$. Això el que provoca és que una cadena es sintetitza de forma contínua sense cap inconvenient, i que l'altra, la que va de $5'$ a $3'$, es sintetitza no des del punt de replicació sinó des del lloc on s'estan obrint les cadenes.

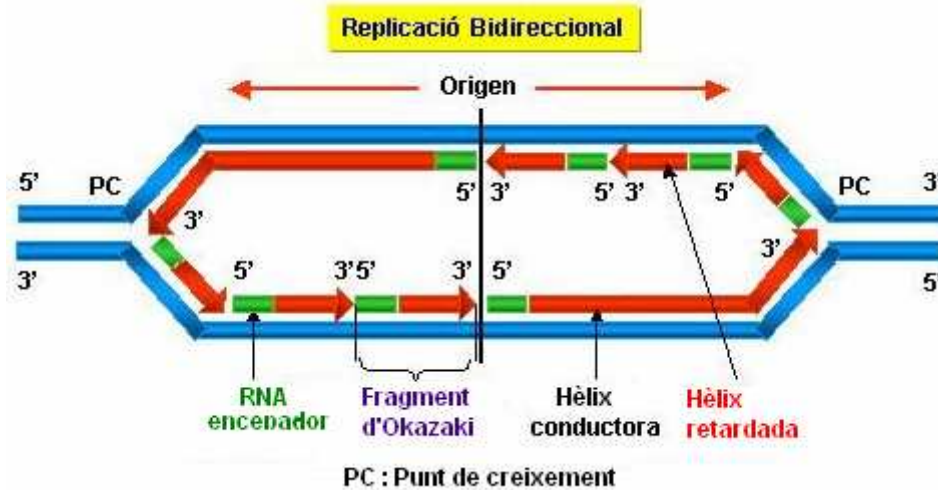


Fig. 3.4. Funcionament de la replicació.

Si les dues cadenes es sintetitzessin contínuament, una de les dues cadenes s'hauria de sintetitzar de 3' a 5' i s'hauria de llegir de 5' a 3'. Reiji Okazaki, a la dècada del 1960 va descobrir que una de les dues cadenes noves de DNA (la que es sintetitza des del lloc on s'estan obrint les cadenes fins l'origen de replicació) es sintetitza en forma de trossos curts anomenats fragments d'Okazaki que es van formant cada vegada que s'obre més la cadena. Amb aquest estudi es va arribar a la conclusió de que hi ha una cadena contínuua o conductora, que és aquella que es produeix en la mateixa direcció que el moviment de l'obertura de les dues cadenes, mentre que l'altra cadena descontínua o retardada es fa en sentit oposat al moviment de la bifurcació.

Al 1955 Artur Kornberg va descobrir que l'enzim que s'encarrega de fer la replicació és la DNA polimerasa. Aquest enzim treballa afegint nucleòtids complementaris respecte la cadena original, que serveix de motlle, mitjançant una reacció química. Es col·loca a l'origen de replicació (o al lloc d'obertura de les cadenes en el cas de la cadena retardada) i comença a polimeritzar la cadena complementària. Aquesta proteïna, però, té un problema perquè no pot començar a polimeritzar sense que ja hi hagi un fragment de

cadena preexistent. Per això, la RNA polimerasa, que sí que pot començar a polimeritzar sola, fabrica una seqüència curta de RNA complementària a la cadena original anomenada encebador.

La replicació comença quan les helicasses, uns enzims, es van desplaçant al llarg del DNA tot separant les dues cadenes usant l'energia de molècules d'ATP. En conseqüència, la resta de molècula que encara no s'ha separat es va enrotllant cada vegada més, però aquesta tensió es relaxa per l'acció de les topoisomerasas⁶. Les cadenes separades són protegides per proteïnes estabilitzadores que s'uneixen al DNA. A continuació, com hem dit abans, la RNA polimerasa comença a polimeritzar l'RNA encebador i, al cap de pocs nucleòtids, la DNA polimerasa ja pot acabar de polimeritzar les cadenes complementàries.

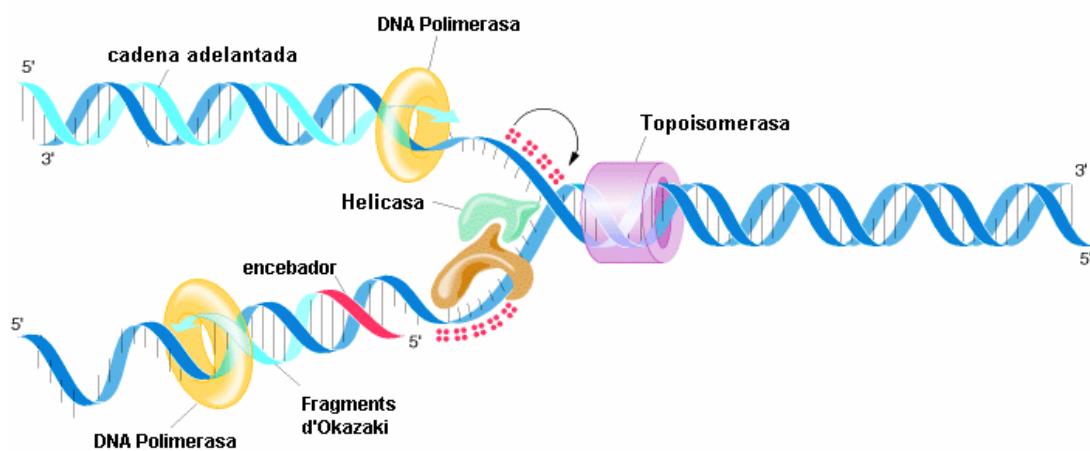


Fig. 3.5. La replicació del DNA.

Un cop acabada la polimerització, els fragments de RNA encebador són substituïts per DNA per la DNA polimerasa. Aquest DNA queda separat de la resta de DNA perquè l'enllaç fosfodiéster que uneix els sucres i els fosfats queda trencat. Per això, un altre enzim anomenat DNA ligasa uneix els extrems que trenquen la cadena. Així obtenim les

⁶ Topoisomerasas: proteïna redreça la molècula de DNA evitant el superenrotllament.

dues cadenes senceres i contínues, complementàries cada una a una de les cadenes velles.

Expressió gènica

L'expressió gènica és el conjunt de mecanismes que té la cèl·lula per, a partir del DNA, expressar les diverses proteïnes.

Transcripció

Les molècules de RNA de la majoria d'espècies es formen a partir de la informació emmagatzemada al DNA. Durant la transcripció, una sèrie d'enzims fabrica una cadena de RNA a partir d'una de les dues cadenes del DNA, amb la seqüència de bases complementària a aquesta cadena. El mecanisme químic de la transcripció és semblant al de la replicació del DNA, ja que el DNA també serveix com a motlle per fabricar la cadena de RNA. Ara bé, no es necessita l'encebador i en cada transcripció només es transcriuen petits segments d'una de les dues cadenes de DNA. La transcripció la dividim en tres fases: inici, allargament i finalització.

En el cas de la fabricació de RNA, l'enzim necessari és la RNA polimerasa. Aquest conjunt de proteïnes és similar a l'homòleg del DNA: necessita un motlle de DNA per polimeritzar, necessita Mg^{2+} i sintetitza de 5' a 3'. Una diferència important és que en llegir la base nitrogenada adenina, polimeritza afegint-ne una d'uracil. La reacció química que produeix és la mateixa que la DNA polimerasa, canviant els desoxinucleòtids per ribonucleòtids. És important saber que aquest enzim no té capacitat correctora.

A les cèl·lules eucariotes, existeixen tres tipus de RNA polimerasa, que s'especifiquen en un tipus diferent de RNA. Així doncs, la RNA pol I és responsable de la síntesi de RNAr, la RNA pol II s'encarrega de fabricar RNAm, i la RNA pol III té la funció de fabricar RNAt.

El procés comença quan la RNA polimerasa s'uneix a unes seqüències específiques del DNA anomenades **promotores**, que són senyals d'inici rics en A i T, que dirigeixen tota la transcripció. L'enzim envolta el promotor i forma una cambra amb cavitats interiors per poder desenrollar el DNA i fer sortir l'RNA. El DNA només queda desenrotllat pocs parells de bases formant així un ull de transcripció. Per separar les cadenes s'han de desenrotllar i per ajuntar-les s'han d'enrotllar. Com que el DNA està envoltat de proteïnes d'unió i altres barreres, es formen unes voltes de DNA molt enrotllat creant així una superhèlix al principi i una al final, que es redueixen amb les topoisomerasas.

Durant l'allargament, la RNA polimerasa comença a afegir ribonucleòtids complementaris a una de les cadenes del DNA formant així una estructura bicatenària híbrida de RNA i DNA. Al cap d'uns quants nucleòtids, la cadena es desenganxa del promotor i comença l'allargament de la cadena de RNA.

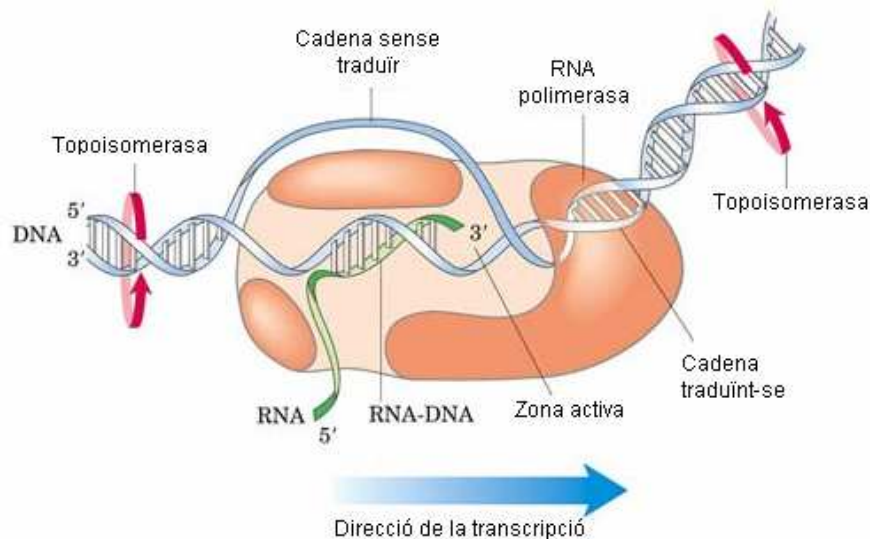


Fig. 3.6. Allargament de la cadena de RNA durant la transcripció.

Aquest mecanisme es durà a terme fins arribar a unes seqüències que indiquin que la traducció s'ha acabat. Llavors, l'RNA es desenganxa del tot de la cadena de DNA que està transcrivint i ja estarà preparada per sortir de la membrana nuclear.

Totes les molècules de RNA, en acabar-se de sintetitzar, experimenten una modificació de la seva estructura que s'anomena maduració. En les cèl·lules procariotes, com que no tenen membrana nuclear, mentre s'està fent la transcripció, a l'extrem de l'RNA formant-se, es comença la traducció directament. Per tant, l'RNAm no madura però l'RNAt i l'RNAr sí que ho fan.

La modificació més extensiva dels transcrits primaris té lloc a l'RNAm de les cèl·lules eucariotes, i a l'RNAt de les eucariotes i bacteris. Els transcrits primaris de RNAm eucariòtics, estan formats per seqüències que codifiquen el gen (exons), però també té seqüències que no el codifiquen (introns), però que serveixen per reduir el nombre de mutacions del gen. En un procés anomenat *splicing*, els introns són eliminats i els exons s'uneixen per formar una seqüència contínua a punt per ser traduïda. Un cop

feta aquesta operació, a l'extrem 5' de la cadena s'afegeix un cap i a l'extrem 3' una cua de residus d'adenina anomenada poli-A. La funció d'aquests cap i cua no s'ha acabat de determinar encara. A l'RNAt també s'eliminen introns i alguns altres fragments de seqüència.

Els transcrits primaris de RNAr (pre-RNAr) també pateixen una maduració postranscripcional: en acabar la síntesi de la cadena de RNA, aquesta es trenca en fragments més petits que formaran les subunitats ribosòmiques.

Finalment, la maduració més espectacular és la que pateix el transcrit primari de l'RNAt. Aquest, agafa una configuració en l'espai en forma de trèvol: apareixen fragments que s'aparellen entre ells formant una doble cadena de RNA, i també apareixen tres zones que no es poden aparellar i formen bucles. A continuació, un enzim talla part d'RNA de l'extrem 5'. A l'extrem 3' també es talla una curta seqüència de RNA, i a canvi s'afegeix un trinucleòtid terminal CCA-3', al qual, durant la traducció s'afegirà un aminoàcid.

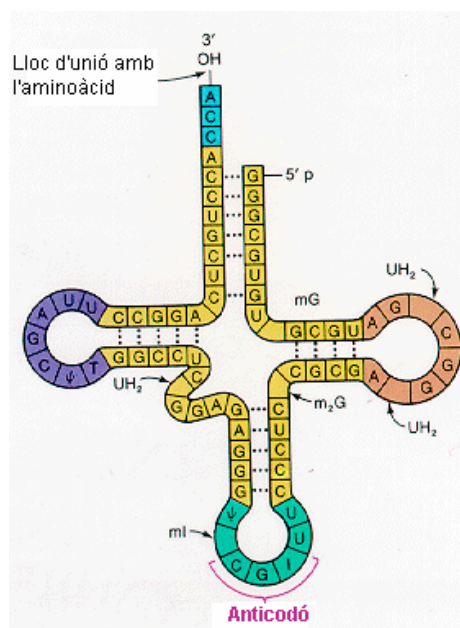


Fig. 3.7. RNAt madurat formant l'estructura en forma de trèvol.

Algunes bases nitrogenades del transcrit primari es modifiquen. Al bucle inferior, hi ha una seqüència de tres bases nitrogenades anomenada anticodó, que és molt important durant la traducció ja que és complementària als codons (fragments de tres bases nitrogenades) de l'RNAm, i, per tant, relaciona el missatge del DNA (transcrit a RNA) amb els aminoàcids, que formen les proteïnes.

Traducció

La traducció és el pas de la informació transportada per l'RNAm a proteïna. És un procés complex que es produeix a continuació de la transcripció al citoplasma, ja que s'uneixen els tres tipus de RNA i interactuen juntament amb molts enzims per formar la cadena peptídica. Té una despesa energètica molt alta i es gasten diverses molècules de GTP.

El missatge que porta l'RNAm és llegit dins l'estructura del ribosoma pel RNAt, el qual posarà l'aminoàcid específic per a cada codó (seqüència de tres bases nitrogenades). L'RNAt és, doncs, específic per a cada codó i per a cada aminoàcid. Per això cal un codi que relacioni els codons amb els aminoàcids. Aquest codi, que s'anomena codi genètic, és universal per tota la matèria viva i degenerat, que vol dir que a cada codó no li correspon un aminoàcid diferent, sinó que un sol aminoàcid pot codificar varis codons diferents segons la següent taula:

		Segona lletra				
		U	C	A	G	
Primera lletra	U	UUU } Phe UUC } UUA } Leu UUG }	UCU } UCC } Ser UCA } UCG }	UAU } Tyr UAC } UAA Stop UAG Stop	UGU } Cys UGC } UGA Stop UGG Trp	U C A G
	C	CUU } CUC } Leu CUA } CUG }	CCU } CCC } Pro CCA } CCG }	CAU } His CAC } CAA } Gln CAG }	CGU } CGC } Arg CGA } CGG }	U C A G
	A	AUU } AUC } Ile AUA } AUG Met	ACU } ACC } Thr ACA } ACG }	AAU } Asn AAC } AAA } Lys AAG }	AGU } Ser AGC } AGA } Arg AGG }	U C A G
	G	GUU } GUC } Val GUA } GUG }	GCU } GCC } Ala GCA } GCG }	GAU } Asp GAC } GAA } Glu GAG }	GGU } GGC } Gly GGA } GGG }	U C A G

Fig. 3.8. El codi genètic.

El pas previ per començar la traducció és l'**activació d'aminoàcids**. Durant aquesta fase, un enzim anomenat aminoacil-ARN-t sintetasa s'encarrega d'unir cada aminoàcid del medi amb el seu RNAt específic pel seu extrem 3' (braç acceptor). Així es forma el complex de transferència.

Un cop formats els complexos, comença la traducció. En la **iniciació**, l'RNAm s'uneix a la subunitat petita d'un ribosoma, i un RNAt que porta metionina s'enganxa al codó AUG més proper a l'extrem 5'. A continuació, la subunitat gran del ribosoma s'uneix a la subunitat petita tancant l'RNAt dins d'una cavitat anomenada P.

Tot seguit s'inicia l'**allargament** de la cadena polipeptídica. A la cavitat A del ribosoma, s'hi afegeix un RNAt (d'anticodó complementari al codó de l'RNAm) amb el seu corresponent aminoàcid. Entre l'aminoàcid de l'RNAt de la cavitat P i l'aminoàcid de l'RNAt que s'acaba d'afegir a la subunitat A, es forma un enllaç peptídic, i el primer RNAt transfereix la cadena peptídica a l'RNA que acaba d'arribar. A continuació, el

ribosoma es desplaça una distància d'un codó en direcció 5' → 3', i el segon RNAt queda col·locat a la cavitat P deixant l'espai A lliure.

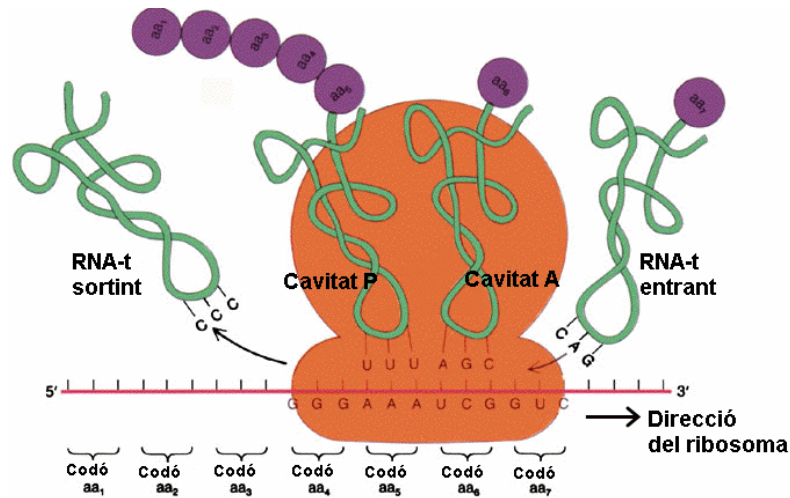


Fig. 3.9. Allargament de la cadena peptídica.

Aquest procés es repeteix fins que el ribosoma troba un codó de STOP, que, tal com vèiem a la taula del codi degenerat, són UGA, UAA i UAG. Al lloc d'aquest codó s'hi ha posat un factor de finalització i, en desplaçar-se el ribosoma, s'allibera la cadena peptídica. Finalment, les dues subunitats del ribosoma es separen.

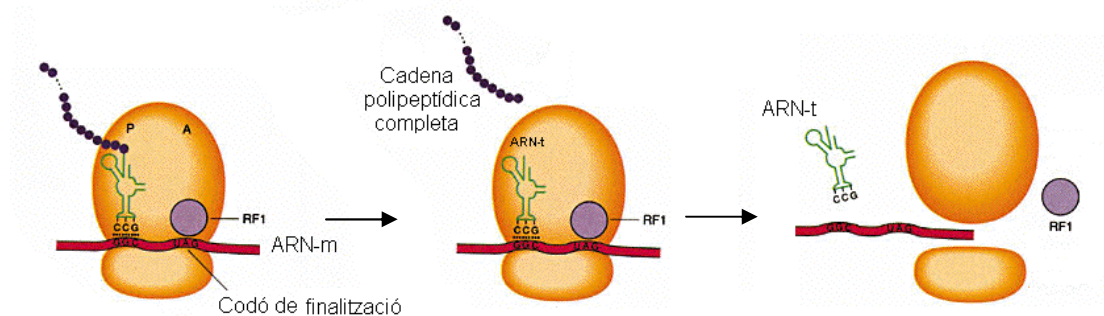


Fig. 3.10. Finalització de la traducció. El ribosoma ha trobat el factor de terminació i s'allibera la cadena peptídica.

Normalment, en una mateixa cadena de RNA missatger hi ha varis ribosomes traduïnt alhora. A més, en bacteris, com que no hi ha membrana nuclear, mentre s'està acabant de transcriure l'RNAm, per l'extrem 5' ja s'ha començat a traduir.

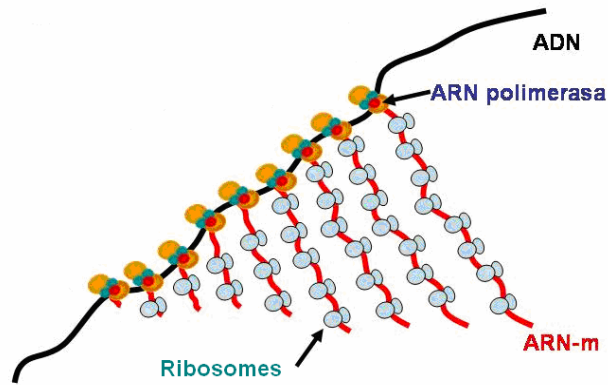


Fig. 3.11. Traducció simultània d'una mateixa cadena de RNAm.

4. LES PROTEÏNES

Les proteïnes són les macromolècules biològiques més abundants i estan presents en totes les cèl·lules. Presenten gran diversitat de formes i mides. Són essencials per determinar les característiques d'un individu ja que són la maquinària enzimàtica per fer la **síntesi de DNA i RNA**, per dur a terme les **activitats metabòliques i energètiques** de la cèl·lula, i per regular-les.

Les proteïnes consisteixen en una o més cadenes polipeptídiques, que són polímers formats per la unió d'aminoàcids. Existeixen 20 aminoàcids que es troben en totes les proteïnes dels éssers vius. Aquests tenen una part comuna i una part que és diferent per cada un, que es sol indicar amb la lletra R:

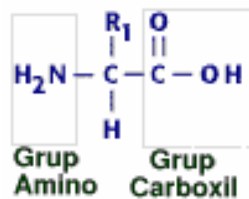


Fig. 4.1. Estructura d'un aminoàcid.

Dues molècules d'aminoàcids es poden unir. Entre el grup carboxil d'un aminoàcid i el grup amino d'un altre es forma l'enllaç peptídic:

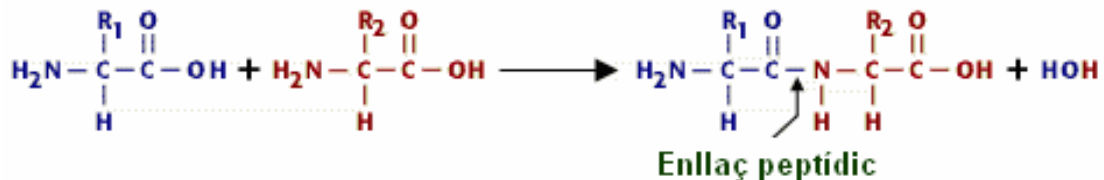


Fig. 4.2. Formació d'un enllaç peptídic.

L'aminoàcid que queda amb un grup amino lliure s'anomena amino-terminal, i serà el primer de la cadena peptídica, i el que tingui un grup carboxil lliure s'anomena carboxilo-terminal i serà l'últim. Els grups terminals de tota la cadena queden ionitzats.

La unió consecutiva d'aquests aminoàcids va formant les cadenes polipeptídiques. Cada cadena té una combinació d'aminoàcids única que s'anomena estructura primària, que s'anirà plegant degut a les rotacions que poden fer els enllaços i a les interaccions dèbils entre la mateixa molècula. També es formen enllaços dèbils, que són principalment enllaços pont d'hidrogen, ponts disulfur, forces de Van der Waal, etc. L'estructura tridimensional que adquireix s'anomena estructura nativa.

Algunes proteïnes poden adoptar formes repetitives, que s'anomenen estructures secundàries. Les més típiques són la hèlix α , que té forma helicoidal degut a la formació d'enllaços pont d'hidrogen molt regulars, i la làmina β (o làmina plegada), que es forma pel plec en zig-zag de la cadena polipeptídica per l'aparició d'enllaços pont d'hidrogen entre aminoàcids molt allunyats entre si.

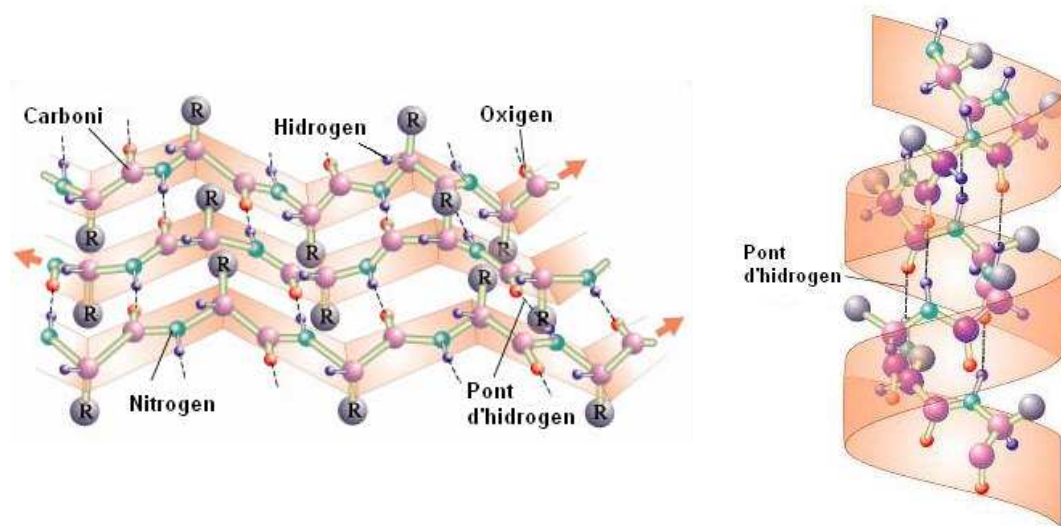


Fig. 4.3. A l'esquerra, estructura en forma de làmina β (o làmina plegada), i a la dreta, estructura en forma d'hèlix α .

El més habitual, però, és trobar proteïnes que adoptin estructures que combinin les estructures secundàries anteriors i altres. Així, les proteïnes prenen forma esfèrica o globular, que és la que els dona les propietats específiques a cada una. Entre estructures

secundàries es formen els β turns, que són girs provocats per determinats aminoàcids que no poden formar estructures secundàries.

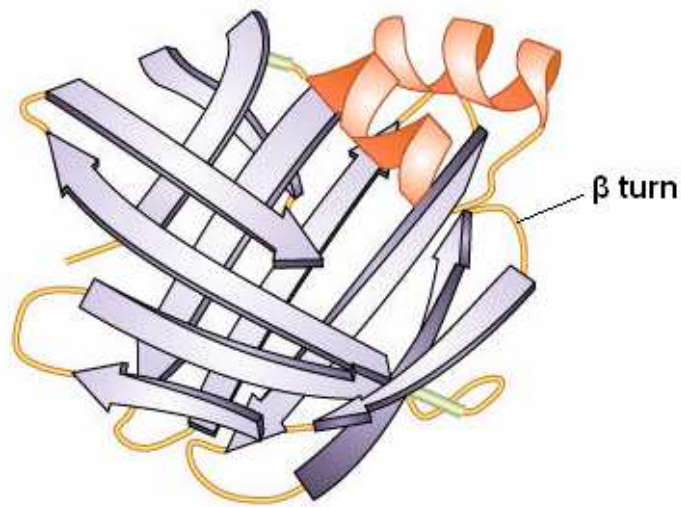


Fig. 4.4. Exemple de proteïna formant una estructura terciària en la qual es poden apreciar fragments en forma d'hèlix α (de color vermell) i en forma de làmina β (de color lila), i els β turns, de color groc.

Finalment, les proteïnes poden formar estructures quaternàries en unir diverses cadenes polipeptídiques en forma d'estructures terciàries.

Les proteïnes poden patir un procés de desnaturalització, que vol dir que perd la seva estructura. Les causes d'aquest fenomen són qualsevol alteració del medi en el qual estan dissoltes, com per exemple l'augment de la temperatura, el canvi del pH, la polaritat del dissolvent, etc. Normalment la desnaturalització pot ser reversible, però de vegades és impossible que la proteïna torni a la seva forma original.

5. ENGINYERIA GENÈTICA

L'enginyeria genètica, també anomenada **tecnologia del DNA recombinant**, és un conjunt de tècniques moleculars per localitzar, aïllar, alterar i estudiar segments de DNA. La paraula *recombinant* s'utilitza perquè sovint l'objectiu és combinar DNA de fonts diferents. El descobriment de la capacitat de manipular els gens, ha proporcionat informació nova sobre l'estructura i la funció dels gens, i per tant s'han modificat conceptes fonamentals de la genètica.

La primera vegada que es van produir microorganismes amb molècules de DNA recombinant va ser al 1973, per un grup de científics entre els quals hi havia Stanley Cohen i Herbert Boyer.

A part de la utilitat que té per a la genètica, les tècniques també s'utilitzen en altres camps com la bioquímica, la microbiologia, la biologia del desenvolupament, la neurobiologia, l'evolució, l'ecologia i la medicina. A més, han aparegut noves indústries com la biotecnologia.

La tecnologia del DNA recombinant requereix mètodes molt especials, ja que els gens són extremadament minúsculs, i no es poden observar. Aquest és segurament el problema més gran que ha hagut d'afrontar l'enginyeria genètica.

Tècniques de DNA recombinant

Les tècniques que s'utilitzen en aquest àmbit, algunes de les quals explicarem més endavant, són les següents:

- Localització de seqüències específiques de DNA
- Tècniques per a tallar i enganxar DNA en llocs precisos.
- Procediments per amplificar seqüències de DNA milions de vegades, per produir còpies suficients per poder treballar.
- Mètodes per transferir seqüències de DNA a cèl·lules receptores.

Tall i unió de fragments de DNA

A finals de la dècada del 1960 es van descobrir uns enzims que serien clau pel desenvolupament de l'enginyeria genètica: els **enzims de restricció** o **endonucleasas de restricció**, que reconeixen i estableixen talls a l'esquelet de sucres i fosfats de les molècules de DNA en seqüències de nucleòtids específiques. Aquests enzims són produïts de forma natural pels bacteris, els quals els utilitzen per defensar-se contra els virus, ja que les endonucleasas tallen el DNA viral. Actualment, a partir de bacteris s'han aïllat més de 800 enzims de restricció diferents.

Els podem dividir en tres grans grups segons el tipus de tall que fan i els extrems que deixen:

- Tipus I: reconeixen seqüències específiques, però tallen el DNA en llocs allunyats de la seqüència.
- Tipus III: reconeixen seqüències específiques i tallen el DNA en llocs propers.

-Tipus II: reconeixen seqüències específiques i tallen el DNA dins la seqüència de reconeixement. Són les més utilitzades per fer els treballs d'enginyeria genètica. A diferència dels altres dos grups, no requereixen ATP.

La major part de seqüències de reconeixement tenen entre 4 i 8 parells de bases i són palindròmiques, és a dir, es llegeixen igual en direcció contrària, com la paraula "madam". Si mirem la figura inferior, podem observar que, de les dues cadenes que tenen, la seqüència de la cadena d'abaix és la mateixa que la de dalt però invertida. Tots els enzims de restricció del tipus II reconeixen seqüències palindròmiques.

Enzim	Microorganisme a partir del qual s'aïlla l'enzim	Seqüència de reconeixement	Tipus de fragment final produït
<i>Bam</i> HI	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	$\begin{array}{c} \downarrow \\ 5'-GGATCC-3' \\ 3'-CCTAGG-3' \\ \uparrow \end{array}$	Cohesiu
<i>Cof</i> I	<i>Clostridium formicoaceticum</i>	$\begin{array}{c} \downarrow \\ 5'-GCCG-3' \\ 3'-CGCG-5' \\ \uparrow \end{array}$	Cohesiu
<i>Dra</i> I	<i>Deinococcus radiophilus</i>	$\begin{array}{c} \downarrow \\ 5'-TTTAAA-3' \\ 3'-AAATTT-5' \\ \uparrow \end{array}$	Rom
<i>Eco</i> RI	<i>Escherichia coli</i>	$\begin{array}{c} \downarrow \\ 5'-GAATTC-3' \\ 3'-CTTAAG-5' \\ \uparrow \end{array}$	Cohesiu
<i>Eco</i> RII	<i>Escherichia coli</i>	$\begin{array}{c} \downarrow \\ 5'-CCAGG-3' \\ 3'-GGTCC-5' \\ \uparrow \end{array}$	Cohesiu
<i>Hae</i> III	<i>Haemophilus aegyptius</i>	$\begin{array}{c} \downarrow \\ 5'-GGCC-3' \\ 3'-CCGG-5' \\ \uparrow \end{array}$	Rom
<i>Hind</i> III	<i>Haemophilus influenzae</i>	$\begin{array}{c} \downarrow \\ 5'-AAGCTT-3' \\ 3'-TTCGAA-5' \\ \uparrow \end{array}$	Cohesiu

Fig. 5.1. Característiques d'alguns enzims de restricció usats amb freqüència en l'enginyeria genètica.

Alguns d'aquests enzims tallen el DNA de forma alternada, com per exemple *HindIII*, i generen fragments amb extrems monocatenaris que sobresurten:

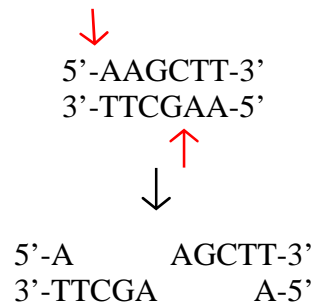


Fig. 5.2. Tall que genera l'enzim *HindIII* a la seva seqüència de reconeixement. Les fletxes de color vermell representen el lloc per on tallen els enzims.

Aquest tipus d'extrems s'anomenen **extrems cohesius** (*sticky ends*), perquè són complementaris a la perfecció i per tant tenen tendència a ajuntar-se fàcilment. Per tant, dos fragments de DNA tallats per el mateix enzim, tindran extrems complementaris i s'aparellaran. Després, un enzim anomenat **ligasa** podrà unir de forma permanent els fragments mitjançant els sucres i fosfats.

No tots els enzims de restricció formen els extrems cohesius. Per exemple, *PvuII* talla pel mig la seqüència de reconeixement. Aquests extrems s'anomenen extrems roms, i s'uneixen de forma diferents que els extrems cohesius:

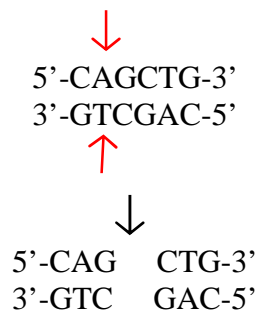


Fig. 5.3. Tall que genera l'enzim *PvuII* a la seva seqüència de reconeixement. Les fletxes de color vermell representen el lloc per on tallen els enzims.

Per dur a terme la reacció de restricció, cal preparar en un tub petit una solució concentrada de DNA purificat amb una solució *buffer*⁷ i una quantitat proporcional de l'enzim de restricció que s'utilitzarà. La reacció s'escalfa a una temperatura òptima (37°C) per a l'enzim.

Visualització dels fragments de DNA

Per comprovar si la reacció de restricció ha funcionat, el que cal és obtenir el DNA del vector i el DNA de l'inserit clarament separats per poder distingir-lo. La única manera de fer-ho és mitjançant l'electroforesi.

L'electroforesi és una tècnica bioquímica que permet separar molècules en funció de la seva mida i la càrrega elèctrica. Per separar les molècules de DNA s'utilitza l'**electroforesi en gel**. Per això, en primer lloc cal preparar un gel porós. Aquest gel sovint està fet d'agarosa⁸, la qual es fon en una dissolució *buffer* i s'aboca en un motlle. Quan es refreda, l'agarosa solidifica adquirint una textura semblant a una gelatina força rígida.

Un cop tenim el gel, el submergim en un *buffer*, i en un dels extrems li fem uns foradets rectangulars amb un motlle dentat. En aquests forats hi haurem de posar les solucions de DNA que volem mesurar, i en un d'ells hi haurem de posar una solució amb fragments de DNA dels quals es coneix la seva longitud (ladder), que servirà per comparar la mida del DNA que estem estudiant amb el DNA model. A continuació, sotmetem el gel a un corrent elèctric, que crearà un pol positiu i un de negatiu. Com que

⁷ *Buffer*: també que s'utilitza per mantenir les condicions de pH estables (en una dissolució, per exemple).

⁸ Agarosa: polisacàrid (glúcid polimèric) que s'extreu de les algues marines.

el fosfat de cada nucleòtid té càrrega negativa, els fragments de DNA migraran cap al pol positiu. Durant aquesta migració, els fragments més grans de DNA s'aniran encallant entre la xarxa d'agar que forma el gel i els trossos més petits es desplaçaran més fàcilment. Així s'aniran separant els trossos de DNA segons la seva longitud.

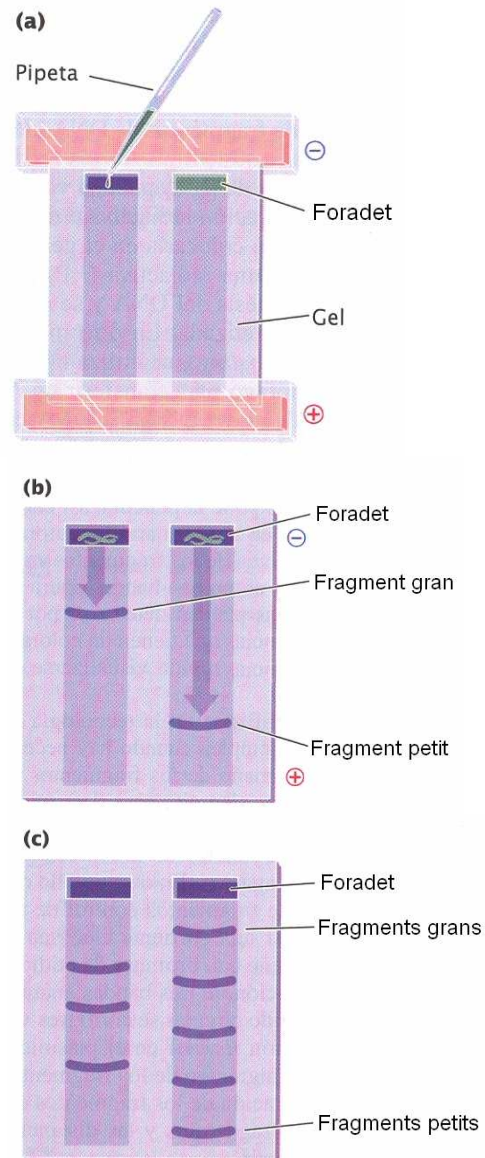


Fig. 5.4. Electroforesi. A la imatge (a) veiem com es carreguen les mostres al foradets i com passa una corrent pel conjunt. A la imatge (b) veiem com els fragments de DNA migren cap al pol positiu i els fragments petits migren més ràpidament. A la última imatge (c) veiem el resultat de l'electroforesi.

Ara bé, un cop hem fet la pràctica, hem de buscar una manera per veure el que hem fet, ja que el DNA és massa petit per veure's a ull nu o al microscopi òptic. El procediment més senzill que es fa per solucionar-ho és la tinció del gel amb un colorant anomenat bromur d'etidi, que té la capacitat d'intercalar-se fortament als nucleòtids. En exposar-se el gel tenyit a llum UV, el bromur d'etidi emet una llum fluorescent ataronjada, que permet veure on hi ha el DNA.

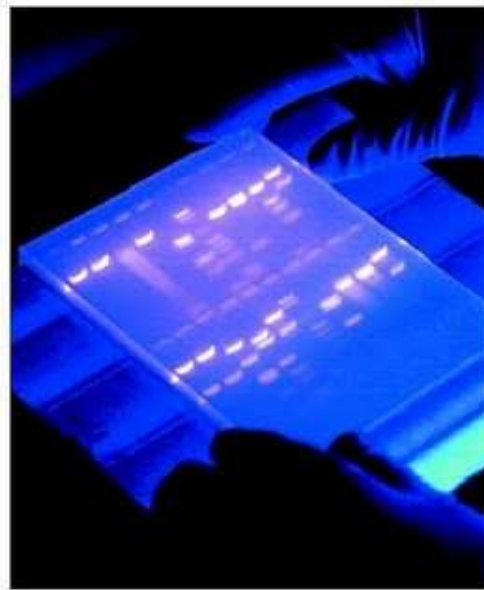


Fig. 5.5. Fluorescència emesa pel bromur d'etidi en exposar-se a llum UV, que permet identificar perfectament on hi ha DNA.

Clonació gènica

Els mètodes de recombinació del DNA requereixen moltes còpies del DNA específic sobre el qual volem treballar. Una manera de fer-ho és introduir el fragment a un bacteri perquè aquest repliqui el DNA, obtenint còpies idèntiques a la original.

Per fer la clonació, és imprescindible un **vector de clonació**, que consisteix en una molècula de DNA amb capacitat de reproduir-se, a la qual se li pugui afegir el fragment

de DNA que es vol clonar. Aquest vector, s'introduirà a una cèl·lula perquè el multipliqui.

Els vectors de clonació tenen tres característiques importants:

- Un origen de replicació.

- Marcadors sel·leccionables que permetin identificar les cèl·lules amb vector (com resistències, per exemple).

- Punts de restricció únics en els que es pugui insertar un fragment de DNA.

Els tipus de vectors de clonació més utilitzats, i que tot seguit explicarem breument, són els vectors plasmidis i els bacteriòfags.

Els **vectors plasmidis**, com ja hem explicat anteriorment, són molècules circulars de DNA que existeixen de forma natural als bacteris. Els que s'utilitzen en la genètica molecular, es preparen a partir dels plasmidis naturals més grans. Tenen totes les característiques que tenen els altres vectors de clonació, i en especial, se solen escollir resistències a antibiòtics com a marcadors, de manera que si cultivem tots els bacteris amb els que hem treballat en un medi que contingui un antibiòtic, només sobreviuran els que hagin absorbit el plasmidi amb resistència a aquest mateix antibiòtic.

Hi ha diverses maneres de fer la clonació utilitzant plasmidis. Per exemple, la clonació de restricció funciona digerint un plasmidi i un fragment de DNA mitjançant el mateix enzim, de manera que es formaran extrems cohesius i alguns dels fragments de DNA s'uniran al plasmidi. Aquest sistema porta desavantatges, ja que el plasmidi es pot

tornar a enganxar pel mateix lloc on s'ha separat, i el DNA pot unir els seus propis extrems formant minúscules seqüències circulars amb un sol gen.

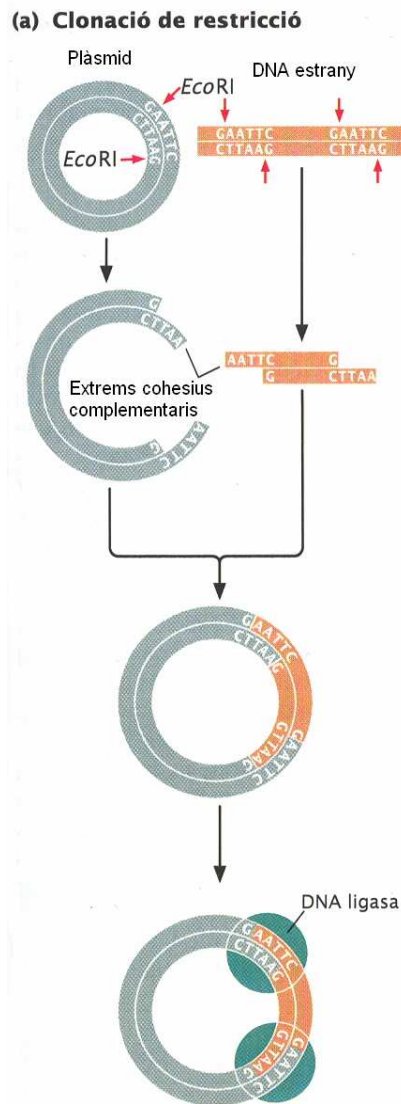


Fig. 5.6. Clonació gènica d'un fragment de DNA mitjançant vectors plasmidi i la clonació de restricció.

Un altre sistema de clonació amb vectors plasmidi, és mitjançant una cua homopolimèrica (també anomenada *tailing*). Consisteix en crear extrems cohesius sobre peces de DNA amb extrems roms. Primer es digereix el DNA que es vol insertar i el DNA del plasmidi de manera que quedin extrems roms. A continuació, un enzim transferasa uneix una seqüència monocatenària, que sovint sol ser d'adenines al plasmidi

i timines (complementàries a l'adenina) a l'insert, a els extrems roms. Finalment, la DNA polimerasa acaba de sintetitzar els nucleòtids complementaris que faltin, i ja es podrà produir la unió.

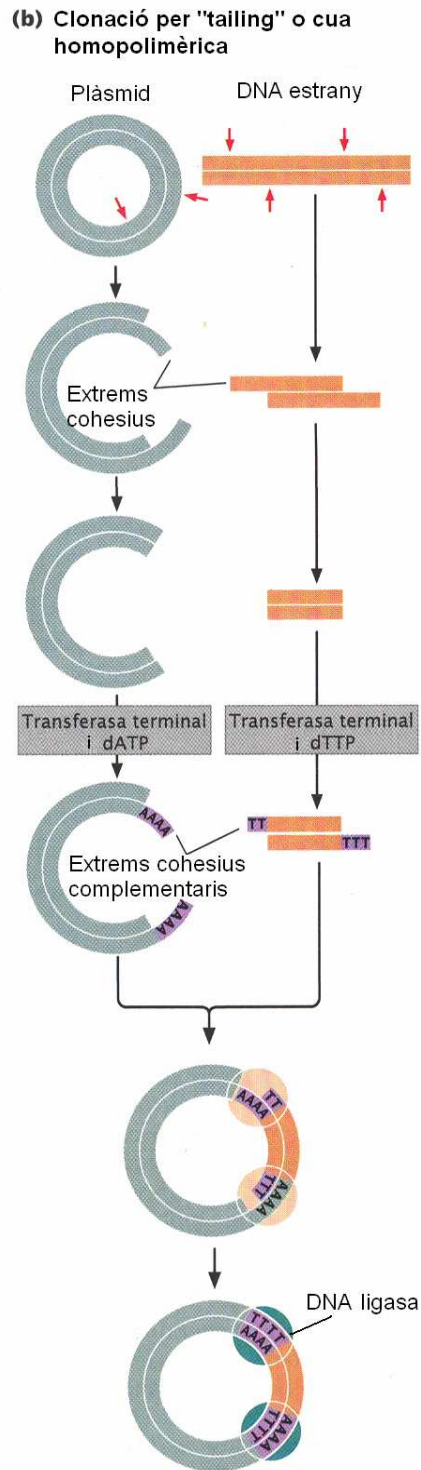


Fig. 5.7. Clonació gènica d'un fragment de DNA mitjançant vectors plasmidi i la clonació mitjançant una cua homopolimèrica.

Un cop col·locat el gen dins d'un vector plasmidi, cal transformar-lo a bacteris. La **transformació** és la capacitat dels bacteris de captar DNA de l'ambient extern. Aquest procés el poden fer de forma natural, però de vegades cal tractar els bacteris de forma química i física.

Els **vectors bacteriòfags**, són un tipus de virus que tenen la capacitat d'injectar el seu DNA a bacteris. La transferència del DNA és molt eficaç, i a més, es poden reemplaçar fragments curts de DNA del bacteriòfag que no són utilitzats, pels fragments de DNA que volem multiplicar.

Quan l'objectiu de la clonació gènica no solament és replicar el gen, sinó que també és produir la proteïna que codifica, utilitzem **vectors d'expressió**. Hi ha un problema, però, i és que la transcripció i la traducció són diferents en bacteris i en cèl·lules eucariotes. Per tant, els vectors d'expressió, a part de portar incorporats un origen de replicació, els llocs de restricció i els marcadors seleccionables, contenen seqüències necessàries per a la transcripció i la traducció:

-Un **promotor** bacterià. És una seqüència de DNA a la qual s'uneix la RNA polimerasa per a iniciar la transcripció. Marca la direcció de la transcripció, quina de les dues cadenes de DNA serà utilitzada com a motlle, i el seu punt d'iniciació. S'activa en presència de substàncies específiques en el medi.

-Una seqüència de DNA que en transcriure's a RNA produeix un lloc de fixació al ribosoma bacterià.

-Seqüències d'iniciació i terminació de la transcripció bacteriana.

-Gens reguladors i operadors.

El promotor bacterià i el lloc de fixació del ribosoma solen estar col·locats cap a l'extrem 5' del lloc de restricció. Quan el plasmidi es col·loca al bacteri, la RNA polimerasa s'uneix al promotor i transcriu el DNA inserit al plasmidi. Els ribosomes s'uniran al lloc de fixació de l'RNA i traduiran la seqüència per a formar proteïnes.

Reacció en cadena de la polimerasa

Com que els gens són fragments molt petits i únics del DNA de la cèl·lua, abans de treballar-hi cal aïllar-los i amplificar-los. Fins al 1980, la única manera d'amplificar el gen era clonar-lo, transferir-lo en un bacteri i deixar que aquest el repliqués.

Al 1983, Kary Mullis, de Cetus Corporation, va inventar una manera per amplificar els gens en poques hores i dins d'un tub d'assaig: la reacció en cadena de la polimerasa (PCR). A partir de molt poques molècules de DNA (fins i tot una) es podia aconseguir milions d'aquest.

La PCR es basa en el sistema de replicació del DNA: a partir d'una molècula de DNA, s'utilitza cada una de les dues cadenes per sintetitzar-ne una de complementària, de manera que obtenim una molècula de dues cadenes idèntica a l'original. Per això, es necessita el tros de DNA inicial que es vol amplificar i un encebador que s'enganxi a la cadenes i incorpori nucleòtids.

L'encebador és molt important, perquè depenent de quin s'utilitzi, el punt de partida de la replicació serà diferent. Aquests són fragments curts de 17 a 25 nucleòtids de longitud complementaris a les seqüències conegudes del motlle. Cada cadena necessita

un encebador diferent, i com que la replicació és bidireccional, un encebador anirà cap a una direcció (*forward primer*) i l'altre anirà en direcció contrària (*reverse primer*).

Per preparar la PCR, es comença amb una solució del DNA que es vol replicar, la DNA polimerasa, els encebadors complementaris a trossos del fragment de DNA, els quatre tipus de desoxirribonucleòsids trifosfats (dNTP), i ions de magnesi i altres sals perquè es produeixi la reacció. La solució es posa a una màquina anomenada ciclador tèrmic dins la qual es poden aconseguir temperatures altíssimes durant el temps desitjat.



Fig. 5.9. Màquina de la PCR.

La reacció es divideix en tres fases:

-Fase 1: la solució es calenta a entre 90°C i 100°C durant pocs minuts, perquè els enllaços que uneixen les cadenes es desfacin i les cadenes de DNA es separin.

-Fase 2: el DNA es refreda ràpidament a 30-65°C durant un minut per permetre que els encebadors s'enganxin a la cadena per la qual són complementàries.

-Fase 3: la solució s'escalfa a 60-70°C perquè la DNA polimerasa pugui sintetitzar cadenes de DNA complementàries al motlle. Al cap d'un temps es formen dues molècules noves de DNA per cada molècula de DNA original.

En repetir aquest cicle de tres fases es va duplicant la quantitat de DNA. Es poden fer fins a 30 cicles, i obtenir, doncs, 1.073.741.824 còpies del DNA original.

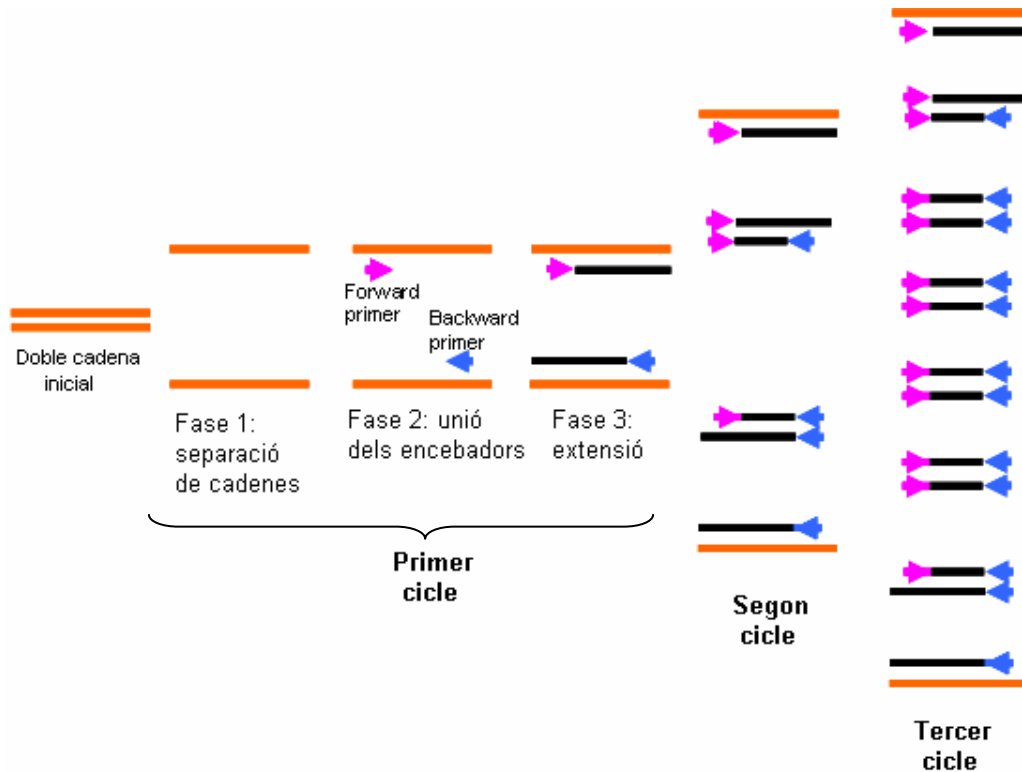


Fig. 5.10. Funcionament de la PCR.

La DNA polimerasa que s'utilitzava al començament era la del bacteri *Escherichia coli*, però en arribar als 90°C, l'enzim es desnaturalitzava. Per tant, es va buscar un enzim que resistís aquestes temperatures. La DNA polimerasa que duu a terme aquesta replicació artificial és un enzim molt especial que s'anomena Taq polimerasa. El nom Taq ve de *Thermus aquaticus*, que és el bacteri que el sintetitza. Aquest bacteri és molt especial perquè viu als manants d'aigua calenta del Parc Nacional de Yellowstone, i per tant els seus enzims estan acostumats a treballar en temperatures molt elevades i no es desnaturalitzen a 90°C.

Aplicacions de l'enginyeria genètica

Algunes de les aplicacions més importants de la tecnologia del DNA recombinant són l'elaboració de productes farmacèutics a partir de gens humans, la creació d'aliments transgènics i la teràpia gènica.

Productes farmacèutics

L'enginyeria genètica va revolucionar el camp de la farmàcia, ja que per primera vegada, es podien insertar gens humans a bacteris, que després sintetitzarien la proteïna que el pacient no podia fabricar. Utilitzant aquest sistema, s'ha elaborat productes com la insulina, la hormona del creixement humà, factors de coagulació (necessaris pels hemofílics), etc.

Productes per a l'agricultura

L'agricultura també s'ha vist modificada per l'enginyeria genètica. Per exemple, es pot insertar resistències contra virus a les plantes perquè no es puguin infectar per aquests. Per eliminar les plagues sense l'ús de plaguicides químics, es pot afegir a les cèl·lules vegetals gens que fabriquin toxines, de manera que quan els organismes perjudicials vulguin menjar-se les plantes, es morin. També és possible incorporar gens que donin resistència a la planta vers herbicides emprats per eliminar maleses que competeixin amb la planta (per buscar aigua, llum, nutrients, etc.).

D'altra banda també s'utilitzen aquestes tècniques per millorar el rendiments dels animals. Per exemple, es va aïllar el gen de la hormona del creixement boví i es va clonar en *Escherichia coli*, que té gran capacitat de produir proteïnes, per subministrar-la a vaques i augmentar la producció de llet. Fins i tot, s'ha pogut modificar les proteïnes de

la llet d'alguns animals (com per exemple, afegint el gen de la coagulació de la sang en humans) per tractar a pacients amb hemofília i altres malalties.

Aquestes modificacions, però afecten greument a l'equilibri ecològic dels ecosistemes. A més, poden sorgir efectes secundaris, com la transferència dels gens inserits en les plantes tractades, cap als organismes perjudicials per a la planta. Llavors, tan els organismes perjudicials com les plantes en qüestió tornarien a estar en la mateixa situació que a l'inici.

Teràpia gènica

La teràpia gènica és la transferència directa de gens als éssers humans per tractar malalties genètiques. Per dur-la a terme, cal localitzar i clonar els gens causants de la malaltia determinada, i crear un vector especial que pugui proveir de manera eficaç els gens a les cèl·lules humanes. Els vectors utilitzats són virus com els retrovirus, adenovirus, etc.

La primera vegada que es va tractar a un pacient amb la teràpia gènica va ser al 1990 i ho va fer W. French Anderson. Ell i el seu equip van aconseguir transferir un gen determinat a una jove amb immunodeficiència combinada greu. Actualment, s'utilitza per a tractar malalties genètiques diverses, càncer, malalties cardíques, i fins i tot algunes malalties infeccioses com la SIDA.

El mètode emprat consisteix en extreure cèl·lules del pacient, cultivar-les amb els vectors recombinants i finalment introduir altre vegada les cèl·lules al pacient. Alguns cops es pot injectar directament el vector al cos del pacient.

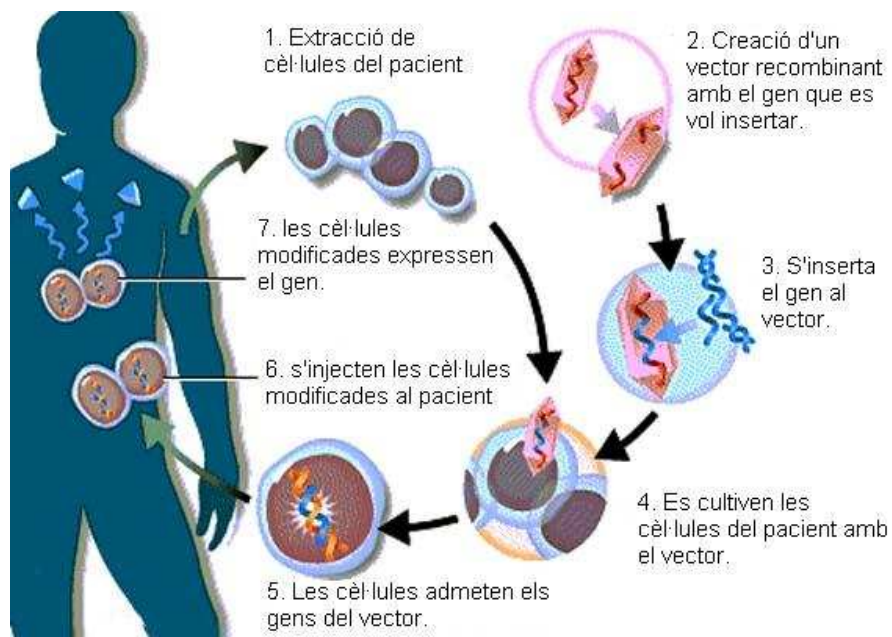


Fig. 5.11. Esquema de la teràpia gènica.

Tot i que teòricament és molt efectiu, a la pràctica no sempre funciona, ja que hi poden haver respostes immunitàries inesperades, la transferència és difícil que surti correcta, i s'ha qüestionat la seguretat de la pràctica degut a la mort de pocs pacients i a l'aparició d'efectes secundaris (leucèmies, per exemple).

Fins l'actualitat, la teràpia gènica només es practica en cèl·lules somàtiques, que són aquelles que no estan implicades en la reproducció de l'individu, i que per tant no afecten a la descendència. Tot i que també és possible aplicar-ho en cèl·lules sexuals, hi ha un impediment ètic, ja que s'altera el material genètic de la descendència.

6. PART EXPERIMENTAL

L'objectiu principal de la part experimental del treball és aconseguir que un cultiu de cèl·lules humanes puguin sintetitzar una proteïna de membrana (anomenada 4F2), unida a una altra proteïna, no propia de cèl·lules eucariotes, que li dóna fluorescència (s'anomena GFP), la qual cosa ens permetrà veure que el gen que codifica la proteïna s'ha incorporat a la cèl·lula eficaçment.

Per fer aquestes pràctiques, ha estat fonamental l'accés al Parc Científic de Barcelona degut a l'exigència d'aparells i màquines molt específiques (com la màquina de la PCR o l'espectrofotòmetre), i de substàncies de molt difícil accés (per exemple, les solucions amb DNA).

Bàsicament, el procediment que hem seguit és el següent:

- 1. Identificar el caràcter:** en el nostre cas, hem identificat el gen que codifica la proteïna GFP i els plasmidis de bacteris que contenen el gen de la proteïna 4F2.
- 2. Amplificar el gen mitjançant la PCR:** aïllar i clonar el gen que hem identificat per tenir diverses còpies.
- 3. Digestió enzimàtica:** tallar el plasmidi i el gen per uns punts determinats perquè encaixin.
- 4. Lligació del plasmidi per obtenir el vector:** unir el gen amb el plasmidi per formar el plasmidi recobinant, que serà un mitjà per transferir el gen que volem.
- 5. Transformació de bacteris amb el vector i reproducció:** Transferim els plasmidis vectors als bacteris. Cultivem els bacteris perquè es reproduïxin i a la vegada multipliquin el plasmidi.

6. Transfecció a cèl·lules eucariotes: treiem els vectors dels bacteris i els transferim a cèl·lules eucariotes (Human Embryonic Kidney 293T, en el nostre cas).

7. Microscopia: Observem al microscopi com aquestes cèl·lules HEK 293T expressen el gen de la fluorescència (GFP) unit a proteïnes de la membrana (4F2).

La proteïna amb la que treballarem s'anomena 4F2 i és una proteïna transmembrana, el gen de la qual mesura 2100 parells de bases.

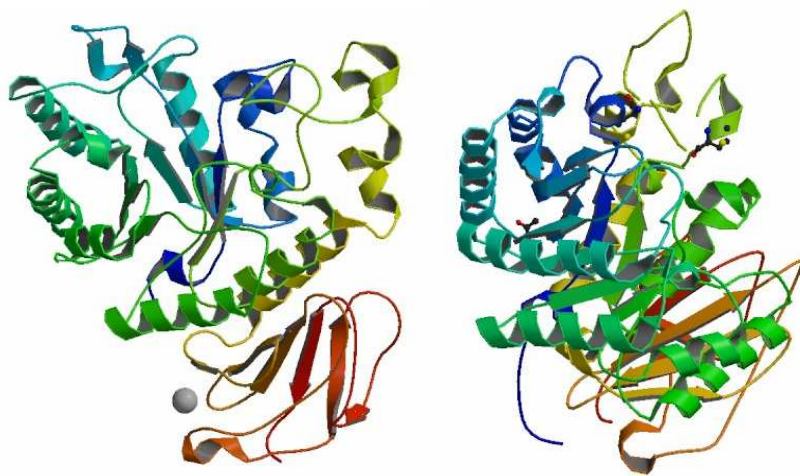


Fig. 6.1. Representació tridimensional de la proteïna 4F2.

El gen de la fluorescència (GFP) medeix 690 parells de bases. Aquest gen codifica a una proteïna que volem que s'expressi unida a la proteïna 4F2.

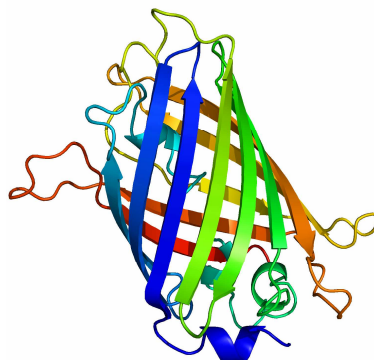


Fig. 6.2. Representació tridimensional de la proteïna GFP.

El plasmidi que utilitzarem (pTrcHis) és un plasmidi per expressar la proteïna. Si n'haguéssim utilitzat un altre que tingués un promotor eucariota i que no fos inductible⁹ (que fos constitutiu¹⁰), s'hagués expressat millor en les cèl·lules humanes en transfectar-lo. En el seu moment no disposàvem d'ell. Aquest plasmidi, que conté el gen per expressar la proteïna 4F2, medeix 3000 parells de bases, conté resistència a l'ampicil·lina, i el promotor porta IPTG, que és un anàleg a la lactosa. El *primer* (encebador) s'enganxa quan hi ha IPTG al medi.

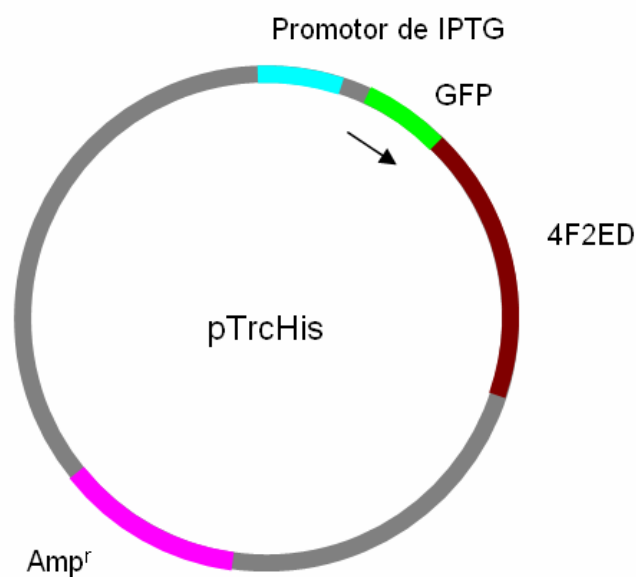


Fig. 6.3. Esquema del plasmidi amb el gen de GFP inserit, és a dir: esquema del vector.

Els bacteris als quals insertarem el plasmidi amb el gen de GFP lligat són *Escherichia coli*, i les cèl·lules eucariotes a les que finalment transferirem el plasmidi s'anomenen HEK 293T (Human Embryonic Kidney 293T).

⁹ Plasmidi inductible: plasmidi que només expressa els seus gens en condicions del medi determinades. En el nostre cas, els gens només s'expressen quan hi ha IPTG en el medi.

¹⁰ Plasmidi constitutiu: plasmidi que expressa sempre els seus gens independent del medi en el qual es troben.

Primera sessió

Amplificació del gen mitjançant la PCR: *Polymerase Chain Reaction* (Reacció en Cadena de la Polimerasa). L'objectiu d'aquesta reacció és copiar un fragment de DNA (gen) desitjat milions de vegades a partir d'una quantitat mínima. En el nostre cas volem amplificar el gen de GFP. La tècnica de PCR que nosaltres hem utilitzat s'anomena PCR bàsica.

1. En un tub eppendorf afegim:

-0,5 µl de DNA de plasmidi de bacteri

-0,33 µl de *Forward primer*

-0,33 µl de *Reverse primer*

-1 µl de dNTPs (desoxinucleòtids trifosfat)

-Enzim *Taq* polimerasa (0,5 µl)

-15,3 µl d'H₂O (fins a 20 µl)

2. Agitem la mescla.

3. Posem a la màquina de PCR els tubs eppendorf. Com més llarga és la cadena que volem, necessitem més temperatura. Com més guanina i citosina hi ha, com que els enllaços entre elles són més forts, també necessitem més temperatura. A menys temperatura, més risc hi ha de que els *primers* hibridin en llocs incorrectes.

a. 94°C, 15 segons

- b. 64°C, 30 segons
 - c. 72°C, 2 minuts
 - d. 94°C, 15 segons
 - e. 64°C, 30 segons
 - f. 72°C, 2 minuts
 - g. 72°C, 7 minuts
- } x 20, afegint 5 segons a cada cicle.

Ara tenim una solució de DNA de plasmidi, enzims, H₂O i gens de GFP.

Electroforesi: L'objectiu de l'electroforesi és separar tots els tipus de molècula que hi hagi en els tubs eppendorf de la PCR, per veure si el gen GFP, que és el que hem amplificat, és el que més abunda i que així el puguem aïllar. És una prova per comprovar que la PCR ha funcionat correctament.

1. Gel agarosa 1%: 0,5 g de la pols es dissol en 50 ml de TAE (Tris acetat EDTA), que és un tampó que manté el pH. També es pot utilitzar TBE (Tris Borat EDTA). Fem la dissolució en un erlenmeyer.
2. Afegir 5 µl de bromur d'etidi (BrEt), que és un agent que s'intercala fortament al DNA i el marca. Com que s'hi uneix tan fortament, és cancerigen i per tant és molt perillós. Per això, nosaltres utilitzem SYBR® safe DNA, que té la mateixa funció però no és tan mutagènic.
3. Escalfar el medi de l'erlenmeyer una mica al microones perquè es dissolgui bé el medi.

4. Aboquem el líquid en un motlle que li dóna forma rectangular i amb un altre motlle fem uns forats a l'extrem negatiu, on afegirem el DNA.
5. Submergim el gel en un medi líquid de TAE (*buffer*).
6. Amb una micropipeta, afegim al primer forat un Ladder, que és una solució de DNA de diferents mides que servirà com a referència per calcular la mida del DNA que volem.

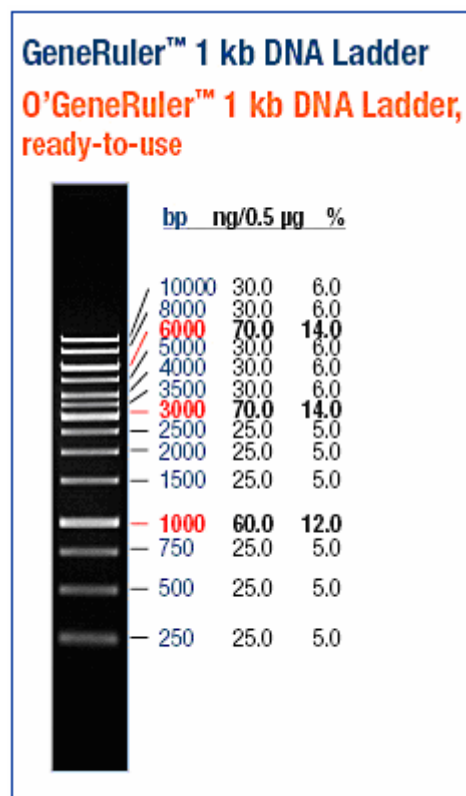


Fig. 6.4. Imatge del Ladder que nosaltres hem utilitzat.

7. Fer una marca al DNA que volem mesurar posant un 10% de blau de bromofenol.
8. Amb una micropipeta, posem el DNA que volem mesurar al forat del costat del Ladder.

9. Creem dos pols de corrent elèctrica, un a cada costat del recipient connectant dos cables a un generador.

10. Com que el DNA té càrrega negativa, les molècules es desplaçaran horitzontalment cap al pol positiu reptant pel gel. El gel és una xarxa de polisacàrid, i per tant a les molècules més petites els costarà menys reptar. En canvi, les molècules més grans faran un recorregut més curt. Així, el DNA es va classificant segons la seva mida.

11. Comprovem que l'experiment hagi anat bé: *mapping*. Tanquem la mostra en un contenidor amb llum ultraviolada i fotografiem la mostra.

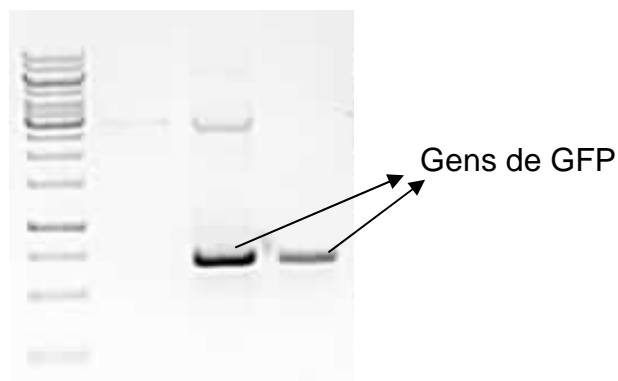


Fig. 6.5. Ha sortit el resultat que esperàvem. Veiem dues bandes ben marcades de gens de GFP.

Purificació de les bandes: Aquesta prova serveix per aconseguir tenir els gens de GFP sol en un tub eppendorf sense estar barrejats amb altres molècules (purificar el gen). Les bandes són les franges que queden al gel de l'electroforesi que indiquen els diferents tipus de molècula que hi havia en el tub de la PCR.

1. Tallar les bandes del gen que nosaltres volem amb un bisturí sobre una taula que emet llum ultraviolada que dóna color.

2. Pesem els DNA en gel amb una balança electrònica, restant el pes del recipient buit (0,891 g) al pes del recipient amb DNA.

$$\text{Pes del PCR } 1,091 \text{ g} - 0,891 \text{ g} = 200 \text{ mg}$$

3. Afegir 1 μl de *buffer* per cada 1 mg de DNA. Aquest *buffer* és un indicador de pH i una mescla òptima perquè el DNA s'enganxi al filtre. A més, permet mantenir el gel en un estat líquid tot i que es refredi.

4. Posar la mescla a 60°C perquè el gel es dissolgui. En dissoldre's bé, trèiem el tub. El *buffer* funciona i per tant, el gel no es torna a solidificar.

5. Centrifuguem perquè el líquid que hi pugui haver als costats del tub baixi a la part inferior del recipient.

6. En uns altres tubs, posem un filtre anomenat columna, que no deixa passar el DNA, però en canvi sí que deixa passar els *buffers* i altres líquids. Aboquem el contingut del tub anterior a dins la columna.

7. Centrifuguem durant 30 segons a 13,4 rpm perquè el *buffer* travessi el filtre i el DNA es quedi atrapat. Llencem el *buffer* del tub i guardem el DNA de la columna.

8. Tornem a posar la columna al tub buit i afegim 500 μl d'etanol al recipient. L'efecte de l'etanol és de *buffer* que serveix per rentar sals, proteïnes, etc. que hagin quedat al filtre amb el DNA.

9. Posem el tub a la centrifugadora durant 30 segons a 13,4 rpm perquè es filtri la solució i es separi el líquid del DNA. Buidem el tub ple d'etanol filtrat i tornem a centrifugar per netejar i assecar bé el DNA.

10. Posem les columnes en tubs nets per diluir el DNA.

11. Afegim 50 µl d'un tampó (*buffer*) per mantenir un pH 8, ideal perquè es pugui fer la dissolució. És important que la punta de la micropipeta no toqui la membrana del filtre per no contaminar la dissolució.

12. Centrifuguem durant un minut a 13,4 rpm perquè es dissolgui el DNA i travessi el filtre. Llencem la columna.

Espectrofotòmetre: En questa pràctica utilitzarem una màquina anomenada *nanodrop* per mesurar la concentració de DNA que hi ha en una gota de dissolució dels nostres gens GFP. Mesurarem la concentració mitjançant la llei de Beer-Lambert:

$$A = \Sigma \cdot I \cdot c$$

En què A és l'absorbància, Σ és el coeficient d'extinció molar (depèn de cada substància), I és la longitud de la cubeta, i c és la concentració.

1. Posem una gota del DNA dissolt i mesurem.
2. Posem una gota de *buffer*.
3. La màquina descompta la diferència i conta el DNA sol.
4. Mirem els resultats i veiem que la concentració de DNA és de 2,8 ng/µl. Això vol dir que la concentració és molt baixa i és degut a que hem posat massa etanol i ens hem quedat amb poca quantitat de DNA.

Digestió enzimàtica: Aquesta és una part molt important de l'experiment. El seu objectiu és tallar el plasmidi al qual volem inserir el gen (és el plasmidi que conté el gen de la proteïna 4F2) per uns punts determinats, i també tallar el gen per uns altres punts determinats de manera que, plasmidi i gen encaixin per aquests punts. L'acció de "tallar" les seqüències de nucleòtids s'anomena digestió.

Per fer la digestió utilitzarem dos enzims: BamHI i HindIII. Cada un fa un tall en un punt diferent del plasmidi i del gen, de manera que aquests encaixaran pels punts que hagi fet el mateix enzim.

A la web www.reb.com mirem la compatibilitat dels dos enzims i veiem que, en el *buffer 2*, són un 100% compatibles¹¹.

1. En un tub eppendorf mesquem:
 - a. 5 µl del DNA.
 - b. 0,5 µl d'enzim BamHI i 0,5 µl d'enzim HindIII.
 - c. 2 µl de *buffer 2* (manté el pH).
 - d. 13 µl d'H₂Osi (fins a 20 µl).
 - e. Afegim 0,2 µl de BSA, que és una proteïna que s'afegeix perquè la reacció rendeixi més.
2. Centrifuguem el contingut durant uns 30 segons a 12,1 rpm.
3. Deixem que es dugui a terme la digestió a 37°C unes 2 hores.

¹¹ Enzims compatibles: Enzims que quan participen junts en una mateixa reacció en un *buffer* determinat, són actius un 100%.

Electroforesi: Aquest cop, volem aconseguir que en el gel es diferenciï una franja ampla en la que hi hauran tots els vectors acumulats i una altra on hi hauran els inserits (gens de GFP amb els extrems digerits que volem insertar al vector), per així poder retallar aquestes bandes i tenir els vectors i els inserits separats.

1. Posem en el tub de les digestions enzimàtiques 3 µl de blau de bromofenol.
2. Electroforesi com l'anterior.

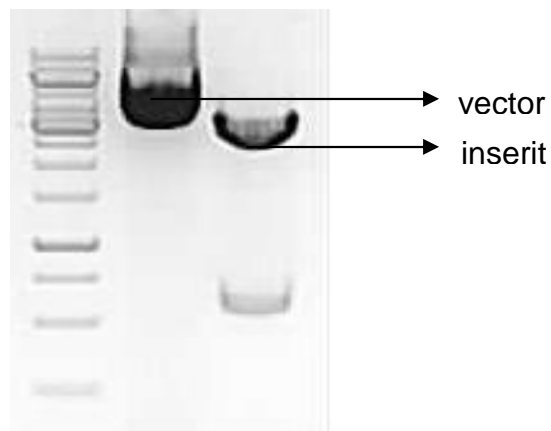


Fig. 6.6. A l'esquerra veiem el ladder que serveix de referència, i a la dreta veiem dues franges: la superior són els vectors (són més grans i no s'han pogut desplaçar gaire) i la inferior són els inserits (són més curts i s'han desplaçat més).

Purificació de les bandes: Aquest procediment es fa per obtenir els vectors i els inserits aïllats en tubs d'ependorf. Es fa mitjançant *kits* preparats.

1. Tallar les bandes amb un bisturí sobre la llum ultraviolada que dóna color (vector digerit i l'insert).
2. Pesem els DNA en gel (digestions enzimàtiques), restant al pes del recipient amb DNA, el pes del recipient buit (0,891 g):

- a. Pes del vector en el gel: $1,072 \text{ g} - 0,891 \text{ g} = 181 \text{ mg}$

b. Pes de l'inserit en el gel: $1,0567\text{g} - 0,891\text{ g} = 156\text{ mg}$

3. Afegir $1\ \mu\text{l}$ de *buffer* per cada 1 mg de DNA. Aquest *buffer* és un indicador de pH i una mescla òptima perquè el DNA s'enganxi al filtre. A més, permet mantenir el gel en un estat líquid tot i que es refredi.

4. Posar la mescla a 60°C perquè el gel es dissolgui. En dissoldre's bé, treiem el tub. El *buffer* funciona i per tant, el gel no es torna a solidificar.

5. Centrifuguem perquè el líquid que hi pugui haver als costats del tub baixi a la base del recipient.

6. En uns altres tubs, posem un filtre anomenat columna, que no deixa passar el DNA, però en canvi sí que deixa passar els *buffers* i altres líquids. Aboquem el contingut del tub anterior a dins la columna.

7. Centrifuguem durant 30 segons a $13,4\text{ rpm}$ perquè el *buffer* travessi el filtre i el DNA es quedi atrapat. Buidem el *buffer* del tub i guardem el DNA de la columna.

8. Tornem a posar la columna al tub buit i afegim $500\ \mu\text{l}$ d'etanol a cada recipient. L'efecte de l'etanol és de *buffer* que serveix per rentar sals, proteïnes, etc. que hagin quedat al filtre amb el DNA.

9. Posem els tubs a la centrifugadora durant 30 segons a $13,4\text{ rpm}$ perquè es filtri la solució i es separi el líquid del DNA. Buidem el tub ple d'etanol filtrat i tornem a centrifugar per netejar i assecar bé el DNA.

10. Posem les columnes en tubs nets.

11. Afegim 50 μl d'un tampó (*buffer*) per mantenir un pH 8, ideal perquè es pugui fer la dissolució. És important que la punta de la micropipeta no toqui la membrana del filtre.

12. Centrifuguem durant un minut a 13,4 rpm perquè es dissolgui el DNA i travessi el filtre. Llencem la columna.

Espectrofotòmetre: Per fer aquesta pràctica, utilitzarem una màquina anomenada *nanodrop*, que mesura la concentració de DNA que hi ha en una gota de dissolució dels nostres gens vectors. L'objectiu és saber si hi ha una bona concentració de vectors i inserits al tub, i si s'ha fet bé la digestió.

1. Posem una gota del DNA dissolt i mesurem.
2. Posem una gota de *buffer*.
3. La màquina descompta la diferència i conta el DNA sol.
4. Mirem els resultats:
 - a. 8,3 ng/ μl en el vector
 - b. 1,7 ng/ μl en l'inserit.
5. Hem posat massa etanol i ens hem quedat amb poca quantitat de DNA.

Lligació del plasmidi: Aquesta és una part molt important de la pràctica perquè té per objectiu unir l'inserit al vector mitjançant els extrems digerits (recordem que dos enzims havien digerit vector i inserit pels mateixos punts per facilitar la seva unió).

1. Calculem les proporcions d'insert que hi haurien d'haver per mol de vector. Farem la proporció 3:1, és a dir, 3 inserts per cada vector, ja que així ens assegurarem que tots els vectors tenen insert. Per calcular els microlitres que necessitem de DNA, utilitzem un programa anomenat *BioMath calculator*, que segueix la següent fórmula:

$$\frac{\text{longitud del DNA de l'insert}}{\text{longitud del DNA del vector}} \cdot \text{ng del vector} = \text{ng de l'insert necessitat per la proporció 1:1.}$$

2. En un tub eppendorf afegim:

- a. 1,15 µl de DNA del vector.
- b. 3,45 µl de insert (el triple dels vectors).
- c. 0,5 µl de ligasa.
- d. 1 µl de *buffer*
- e. 2,9 µl d'H₂O.

3. Centrifuguem.

4. Deixem refredar a 16 °C *overnight*.

Segona sessió

Transformació d'*Escherichia coli*: L'objectiu d'aquesta part és aconseguir que els bacteris absorbeixin els vectors i que, en reproduir-se multipliquin el seu DNA (incloent els vectors).

1. En un tub eppendorf posem:
 - a. 100 µl d'una solució amb cèl·lules bacterianes que estaven conservades a temperatures molt baixes (ja estava preparat).
 - b. 2 µl del vector.
2. Ho congelem durant una estona en una caixa amb gel.
3. Xoc tèrmic a les cèl·lules (*heat shock*) perquè les seves membranes obrin els porus i entrin els vectors fàcilment. Durant un minut posem les cèl·lules a 42 °C al *termomixer* (aparell que proporciona la temperatura desitjada).
4. Un cop acabat el xoc tèrmic, afegim 900 µl de medi de cultiu a les cèl·lules amb vector. El medi està fet de LB i gel agarosa, i no porta ampicil·lina per no donar tan estrès a les cèl·lules, ja que el xoc tèrmic és molt dur.
5. Finalment posem el conjunt a 37°C durant uns tres quarts d'hora perquè els bacteris es recuperin del xoc.
6. Posem 50 o 100 µl del líquid sobre plaques de medi agarós i antibiòtic d'ampicil·lina, i amb una anella de Diagralsky, que prèviament hem esterilitzat amb alcohol, ho escampem per la placa. Posem ampicil·lina perquè els bacteris que hem

cultivat oposen resistència a ella i els altres microorganismes que podrien contaminar el cultiu no.

Podem provar de fer créixer els bacteris amb IPTG perquè la nostra proteïna s'expressi. Per això:

1. Preparam una placa de gel agarosa i antibiòtic d'ampicil·lina.
2. Un cop solidificat el gel, aboquem entre 40 i 50 μl d'LB i escampem per tot el medi.
3. Aboquem 4 μl de IPTG, que activa el promotor.
4. Seleccionem varies colònies i les implantem al medi amb la punta d'una micropipeta.
5. Les posem al forn de 37°C *overnight*.
6. L'endemà comprovem que el procés ha sortit bé. Mirem els bacteris en una cambra especial amb llum blava i veiem els bacteris fluorescents. Això vol dir que hem fet bé la transformació i els bacteris sintetitzen GFP-4F2.



Fig. 6.7. En aquesta imatge podem veure com les colònies de bacteris expressant la proteïna GFP-4F2 amb el promotor de IPTG. Hi ha unes colònies que expressen millor la proteïna degut a que a elles els vam transferir un vector que era específic per expressar proteïnes.

Cultiu cel·lular amb antibiòtics: En aquest apartat volem preparar les cèl·lules eucariotes humanes, a les quals transferirem els vectors, en cultius específics perquè no creixin altres microorganismes. La nostra cèl·lula (HEK 293T) viu en un medi DMEM. Per preparar les plaques cal fer el següent:

1. Escalfem al bany maria a 30°C els materials que utilitzarem:
 - a. FBS (*Fetal Bovine Serum*, en català es diu Sèrum de Fetus de Boví), que és sang de vaca coagulada. S'utilitza en cultius cel·lulars perquè porta moltes proteïnes i altres factors necessaris perquè les cèl·lules creixin.
 - b. Afegim penicil·lina i estreptomina perquè no creixin bacteris juntament amb les cèl·lules.
 - c. Tripsina: enzim de l'estómac que desenganxa les cèl·lules de la placa. La tripsina no actua quan hi ha medi.
 - d. PBS: *buffer* que neteja el medi perquè la tripsina pugui actuar bé.
2. Agafem la placa on s'han cultivat les cèl·lules i aspirem el seu medi (hi ha 25 ml).
3. Aboquem 10 ml de PBS i deixem que netegi durant un minut aproximadament. Aspirem també el PBS.

4. Afegim 2 ml de tripsina, que desenganxa les cèl·lules. Sense treure l'enzim, posem el cultiu al forn de 37 °C.
5. Al cap d'una estona, treiem el cultiu del forn i afegim 22 ml de FBS. Barregem bé la tripsina amb l'FBS (aspirant i tornant el líquid a la placa consecutivament).
6. Dels 24 ml de líquid que hi ha (22 ml de FBS i 2 ml de tripsina), n'utilitzarem 12, que els repartirem en 6 plaques (posem 2 ml a cada placa). Finalment movem suaument les plaques per repartir bé les cèl·lules.

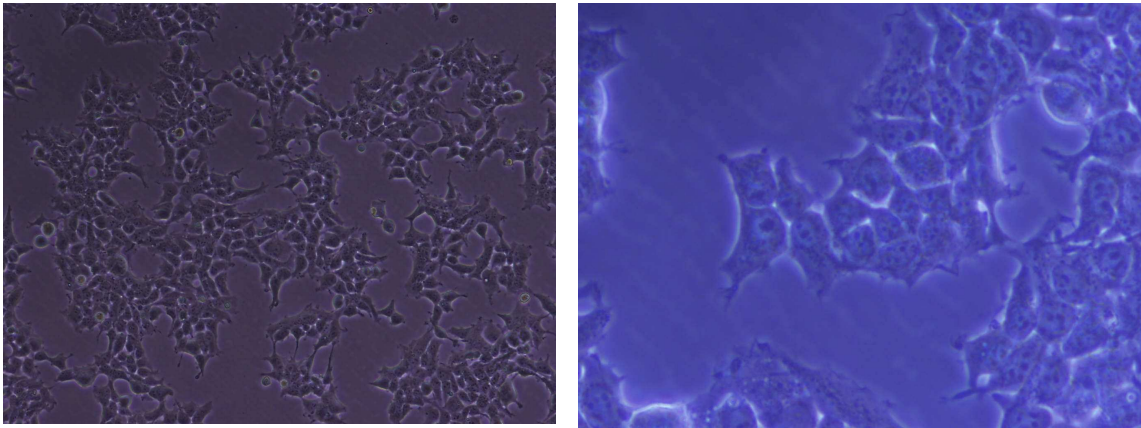


Fig. 6.8. Cèl·lules HEK 293T que hem cultivat vistes des del microscopi òptic.

Tercera sessió

Selecció d'una colònia i creixement en un medi líquid.

1. En un tub d'assaig posem 27 ml d'LB i hi mesquem 27 μ l d'ampicil·lina. La proporció és, doncs, de 1:1000.
2. Aboquem 5 ml de la dissolució a 4 tubs d'assaig.
3. Seleccionem colònies de bacteris transformats amb una micropipeta i les posem dins dels tubs deixant la punta de la micropipeta a dins. Posem dues colònies per tub.

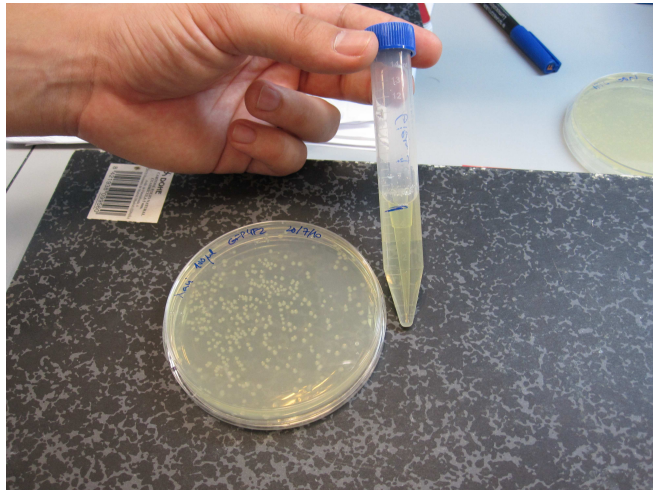


Fig. 6.9. Selecció d'una colònia amb una punta de micropipeta i la posem dins del tub deixant la punta a dins.

4. Amb la resta de líquid que ens queda, posarem 5 ml en un altre tub d'assaig per fer un control negatiu. Aquest servirà per comprovar que el medi no està contaminat.
5. Ho posem en el forn de 37°C.

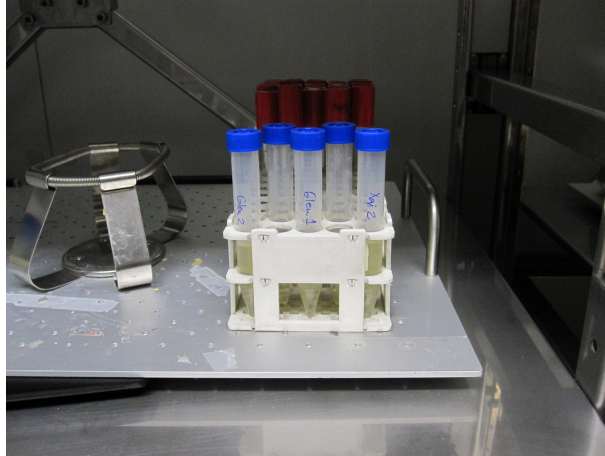


Fig. 6.10. Tubs al forn de 37°C.

Gel de proteïnes: Aquesta pràctica consisteix en preparar un gel d'acrilamida que permet comprovar que els bacteris cultivats amb el vector que hem posat al forn de 37°C sintetitzin la proteïna.

En primer lloc, cal fer el gel. Aquest, està format per dues franges de dos tipus de gel. El que es col·loca a dalt és un gel anomenat *sticking*, que és més dispers perquè les proteïnes es situïn i el gel d'abaix, anomenat *running*, és més espès perquè les substàncies es separin per tamany. El procediment per formar-los és el següent:

1. Col·locar dos vidres dins d'un recipient, separats per un espai molt prim. Tan els vidres com el recipient són específics per fer aquesta pràctica.
2. Per fer el gel d'abaix cal mesclar:
 - a. 8,3 ml d'aigua destil·lada
 - b. 5 ml de Tris 1,5 M de pH 8,8.
 - c. 6,7 ml d'acrilamida 30%. Aquesta substància és molt tòxica.
 - d. 200 µl de SDS 10%, que és un detergent que desnaturalitza les proteïnes.
 - e. 200 µl de APS 10%.

- f. 20 μ l de TEMED, que és un estabilitzador.
3. Per fer el gel *stucking* mesclarem:
- a. 6,67 ml d'aigua destil·lada
 - b. 2,5 ml de Tris 0,5 M de pH 6,8
 - c. 1,3 ml d'acrilamida 30%
 - d. 100 μ l de SDS 10%
 - e. 100 μ l de APS 10%
 - f. 10 μ l de TEMED
4. Aboquem el primer gel en el buit entre els dos vidres. A continuació, aboquem una capa fina de isopropanol, que és un alcohol que, és menys dens que el *running*, i això permet que el gel d'abaix quedi delimitat per una línia ben recta. Un cop el gel ha solidificat, treiem l'alcohol i col·loquem sobre el recipient un motlle que servirà per crear unes cavitats en el gel de dalt, que tot seguit abocarem.
5. Quan ja ha solidificat el gel *stucking*, enretirarem el motlle.

Un cop preparat el gel, hem de preparar el contingut de les cavitats. En aquestes, hi posarem bacteris dels nostres que hem preparat, i també bacteris especials preparats pel nostre tutor.

1. Posar en tubs eppendorf 100 μ l de cada cultiu amb el seu medi líquid inclòs.
2. Centrifugar durant 20 segons a 8.000 rcf.
3. Afegim 50 μ l de *buffer*, que consisteix en una dissolució de SDS, blau de bromofenol i glicerol (*buffer* LSB), perquè es lisiin els bacteris i es separin les proteïnes.
4. Afegim 2,5 μ l de DTT, que és un agent reductor, i centrifuguem.

5. Posem el gel i els vidres que l'envolten en un recipient que omplirem amb un *buffer* 25 mM de Tris, 125 mM de glicina i 0,1% de SDS.
6. Omplim el primer forat amb 50 μ l de marcador, uns altres amb 50 μ l dels nostres bacteris i els altres amb 50 μ l dels bacteris específics.
7. Tapem el recipient i l'endollem a un generador per creac un pol positiu i un de negatiu. Comencem posant un voltatge baix i al cap d'una estona apujem el voltatge.

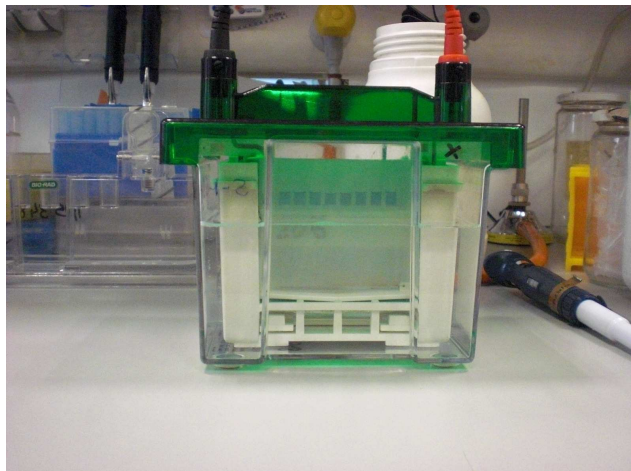


Fig. 6.11. Gel electroforesi dins el recipient amb *buffer* endollat al generador.

8. A mesura que passa el temps observem, gràcies al blau de bromofenol una línia blava que va baixant fins que finalment desapareix. Quan això passa, desendollem l'aparell del generador i treiem el gel.
9. El gel de dalt el podem llençar i guardem el *running* entre dos plàstics específics.
10. Exposem el gel en una llum de fluorescència i ens posem unes ulleres amb vidres de color taronja per veure si els bacteris han expressat bé la proteïna.
11. Tenyim amb tiny coomassi el gel perquè les bandes agafin color i quedin les proteïnes ben fixades. Ho deixem reposar durant una hora.
12. Finalment netegem amb aigua el gel i també amb àcid acètic.

Mini-preparació: Serveix per extreure el DNA dels bacteris, aïllar els plasmidis vectors i preparar-los per transferir-los a les cèl·lules eucariotes.

1. Centrifugar cultius
2. Després de centrifugar, ha quedat el *pellet* a baix dels tubs. Treure el medi de cultiu i la punta de la micropipeta.
3. Tornar a posar els bacteris amb 250 μ l de *buffer* P1. Resuspendre.
4. Afegir 250 μ l de *buffer* P2 al tub eppendorf i barrejar invertint el tub diverses vegades. Aquest *buffer* lisa les cèl·lules.
5. Afegir 350 μ l de *buffer* N3, que neutralitza la lisis i precipita el detergent SDS. Els àcids nucleics queden dissolts i les proteïnes precipiten.
6. Centrifugar una 10 minuts a màxima velocitat perquè es formi el *pellet* de proteïnes.
7. Decantar el sobrenedant del pas anterior a un filtre columna.



Fig. 6.12. A l'esquerra veiem un tub eppendorf amb la solució de DNA i a la dreta veiem un tub amb el filtre (columna) de color blau.

8. Centrifuguem durant 30 segons a màxima velocitat. Expulsem la part líquida i ens quedem amb el DNA enganxat al filtre.
9. Afegim 0,10 ml de *buffer* PB per netejar. Centrifuguem durant 30 segons a màxima velocitat i treiem el líquid.

10. Afegim 0,75 ml de *buffer* PE per netejar. Centrifuguem durant 30 segons a màxima velocitat, treiem el líquid i tornem a filtrar durant 1 minut.

11. Posem les columnes en tubs eppendorf. Afegim 40 μ l de *buffer* EB, ho deixem estar un minut i tornem a centrifugar durant un altre minut. Aquest *buffer* dissol el DNA per treure'l del filtre.

Espectrofotòmetre: Posem una gota del DNA al *nanodrop*, per calcular la quantitat de DNA que hi ha per μ l segons la llei de Beer-Lambert.

Els resultats obtinguts són els següents:

- a. En un dels tubs: 260 ng/ μ l
- b. En l'altre tub: 304,7 ng/ μ l

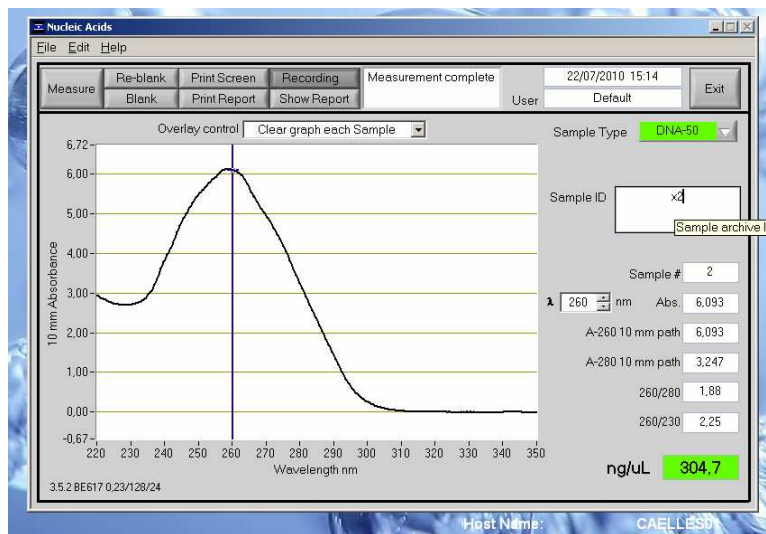


Fig. 6.13. Gràfica de l'espectrofotòmetre.

Transfecció cel·lular: l'objectiu d'aquest últim experiment és introduir els plasmidis al nucli de les cèl·lules eucariotes perquè aquestes expressin la proteïna GFP-4F2.

1. Mirem al microscopi com han crescut les cèl·lules que vam cultivar el dia anterior en 6 plaques.

2. De les 6 plaques, a una no hi farem la transfecció perquè serà el control negatiu, i en prepararem dues amb dissolucions de GFP-4F2, dues amb dissolucions d'una altra transfecció (GFP-LC3), i una amb una dissolució de GFP (de cap proteïna en concret). Aquestes dissolucions hauran de portar:

- a. 2 µg del DNA determinat.
- b. 312 µl de dissolució mil·limolar de clorur de sodi (NaCl) estèril.
- c. 15,6 µl de PEI (polietilenimina), una substància que recobreix el DNA formant una espècie de xarxa que actua com una membrana, que permet l'endocitosi del DNA a la cèl·lula eucariota.

3. Per determinar el volum de DNA que necessitem per mesurar 2 µg hem de tenir en compte la densitat del DNA:

- a. GFP-4F2: la seva densitat és de 1,8 µg/µl, per tant necessitem 1,1 µl.

$$2 \mu\text{g} \cdot \frac{1 \mu\text{l}}{1,8 \mu\text{g}} = 1,1 \mu\text{l}$$

- b. GFP-LC3: la seva densitat és de 1,2 µg/µl, per tant necessitem 1,66 µl.

- c. GFP: la seva densitat és de 1,2 µg/µl, per tant necessitem 1,66 µl

densitat és de 1,42 µg/µl, per tant necessitem 1,4 µl.

$$2 \mu\text{g} \cdot \frac{1 \mu\text{l}}{1,42 \mu\text{g}} = 1,4 \mu\text{l}$$

4. Agafem tres tubs eppendorf per començar les mesclures:

- a. En el primer, que serà per GFP-4F2, hi posem el doble de quantitat perquè omplirem dues plaques: 2,2 µl de DNA, 624 µl de dissolució de NaCl estèril, i 31,2 µl de PEI.

- b. En el segon, que serà el de GFP-LC3, al igual que el primer, doblem les quantitats i hi posem: 3,33 μ l de DNA, 624 μ l de dissolució de NaCl estèril i 31,2 μ l de PEI.
 - c. El tercer tub serà per GFP sol, i hi posarem 1,4 μ l de DNA, 312 μ l de dissolució de NaCl estèril, i 15,6 μ l de PEI.
5. Agitem bé perquè quedi ben barrejat.
6. Aboquem les dissolucions a les plaques corresponents. En el cas dels tubs que hem omplert amb el doble de les substàncies, hem de repartir a igual quantitat la dissolució en les dues plaques.

Quarta sessió

Canvi del medi de cultiu de les cèl·lules: Aquest procés cal fer-lo perquè el PEI no és convenient deixar-lo 16 hores.

1. Xuclem el medi amb una micropipeta.
2. Posem altre cop el medi DMEM.

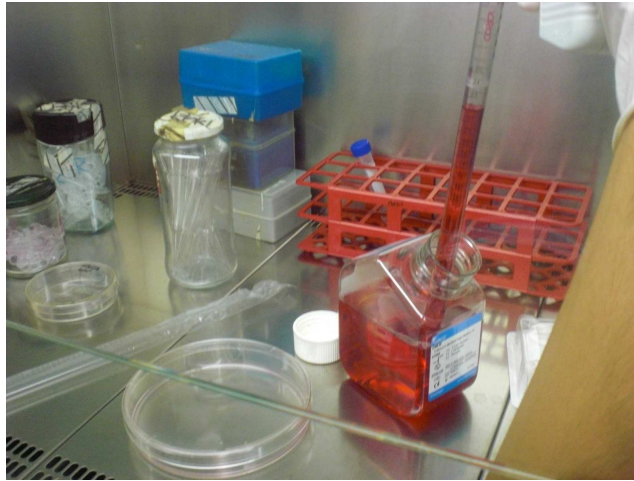


Fig. 6.14. Canvi de medi. Acabem de xuclar el medi anterior i estem posant altre cop el DMEM.

Observació al microscopi: Observem al microscopi com les cèl·lules expressen fluorescència en sotmetre-les a llum ultraviolada.



Fig. 6.15. Microscopi òptic.

7. RESULTATS

A continuació explicarem els resultats obtinguts i mostrarem les imatges que vàrem obtenir observant els cultius al microscopi amb llum normal i llum ultraviolada.

En primer lloc, les cèl·lules del control negatiu, tal com havia de ser, no han fabricat cap proteïna fluorescent. La funció del nostre control negatiu era assegurar-nos que els cultius de cèl·lules, abans de ser modificades genèticament, no tinguéssin ja el gen de la GFP (fet que seria molt rar tractant-se de cèl·lules de ronyó d'embrió humà).

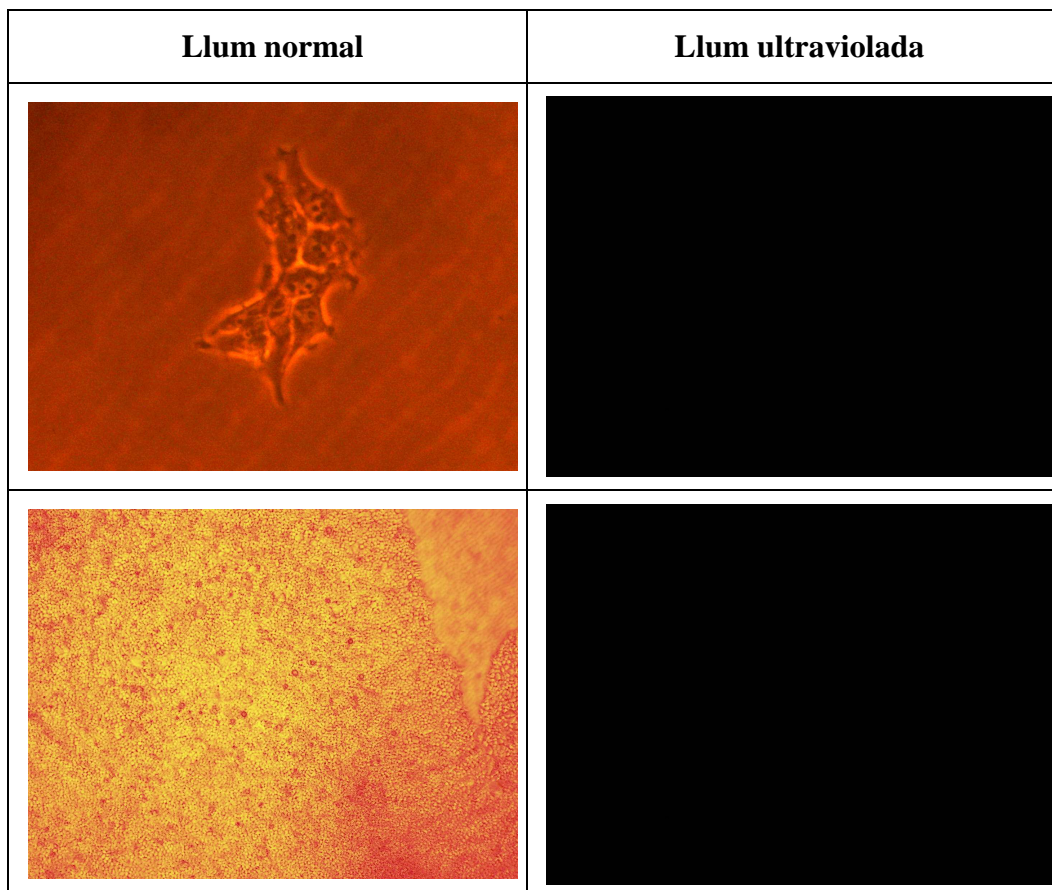


Fig. 7.1. Resultats del control negatiu.

En segon lloc, els cultius als quals vàrem transfectar el plasmidi per expressar el gen de la proteïna GFP-4F2, no l'acaben de fabricar bé. Hi ha algunes cèl·lules que es tornen fluorescentes, però la gran majoria no ho fa. A més, per veure la fluorescència hem

necessitat augmentar el temps d'exposició (per això el fons es veu tan clar). Això és degut a que el plasmidi que vàrem utilitzar és inductible i no constitutiu, de manera que en cèl·lules humanes no s'expressa del tot bé.

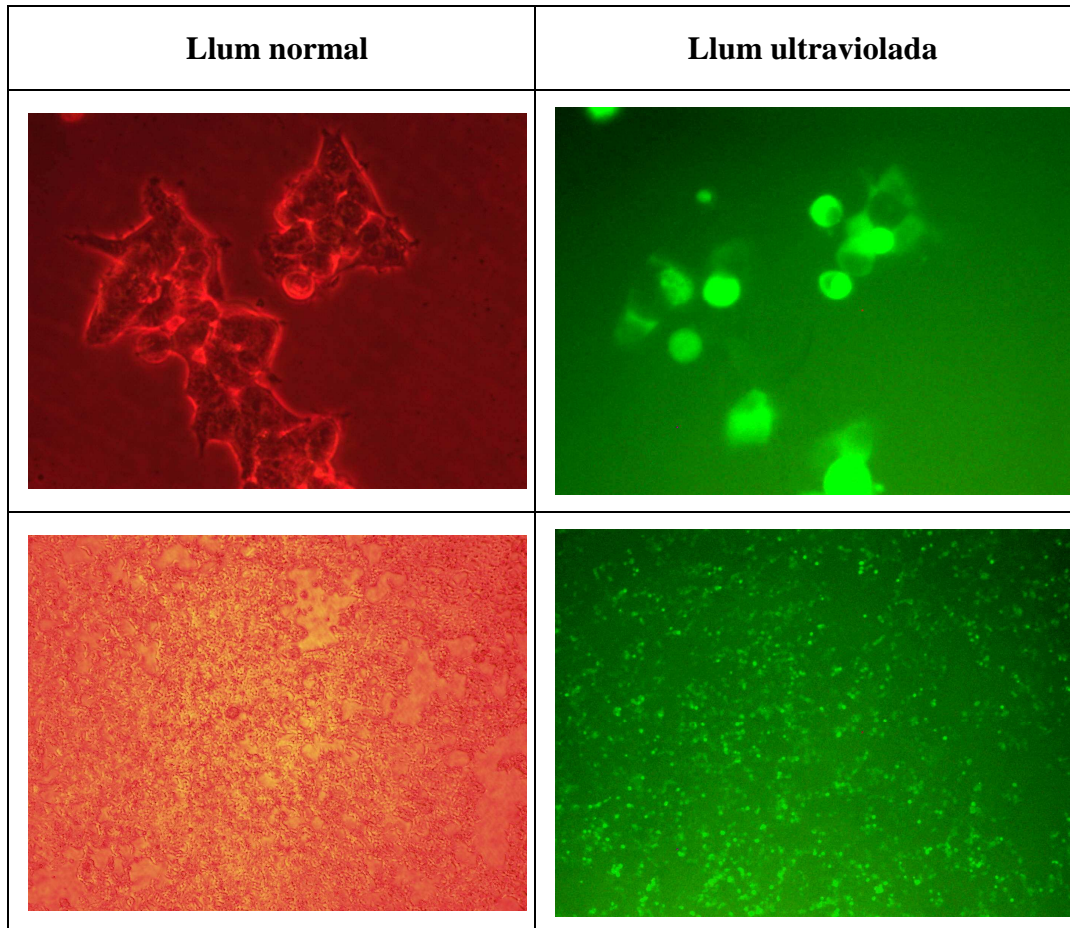


Fig. 7.2. Resultats de les plaques cultivades amb cèl·lules expressant GFP-4F2.

La tercera taula de fotografies correspon als cultius de cèl·lules amb plasmidis amb GFP-LC3, que ja teniem preparats anteriorment. Aquestes cèl·lules sí que fabriquen bé la proteïna, ja que el plasmidi era el més adequat per a fer la transfecció a cèl·lules eucariotes.

Llum normal	Llum ultraviolada
--------------------	--------------------------

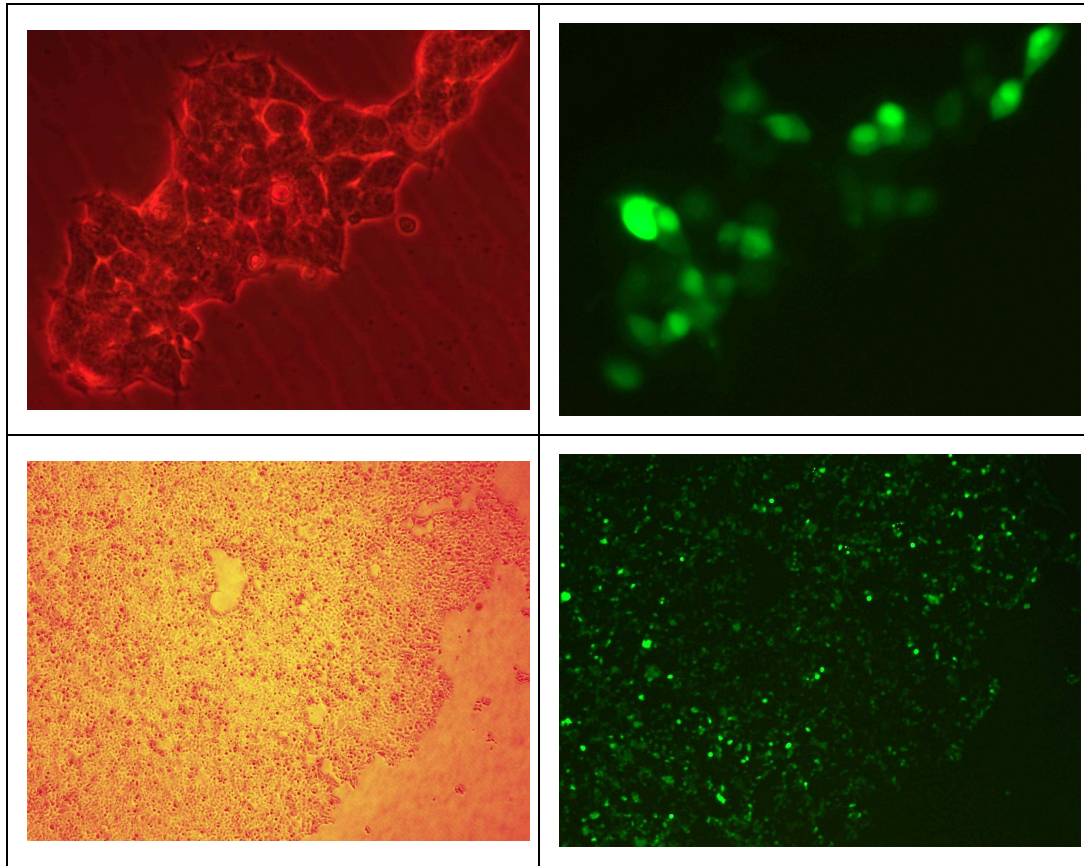


Fig. 7.3. Resultats de les plaques cultivades amb cèl·lules expressant GFP-LC3.

Finalment, el control positiu, ha sortit com esperàvem. Les cèl·lules han expressat el gen de la fluorescència donant aquest color a tota la cèl·lula sencera.

Llum normal	Llum ultraviolada
--------------------	--------------------------

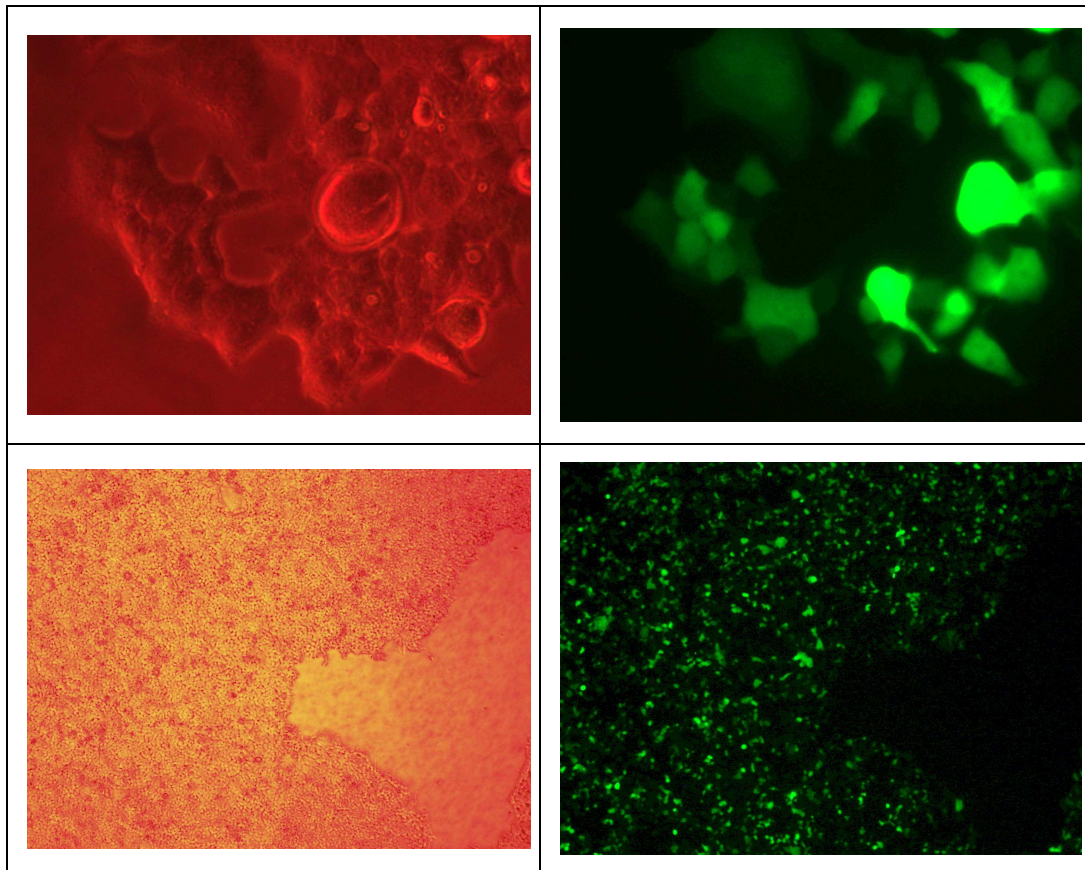


Fig. 7.3. Resultats de les plaques cultivades amb cèl·lules expressant GFP-LC3.

Com es pot veure, algunes cèl·lules amb GFP-LC3 i GFP no han expressat els gens transfectats. La causa d'aquesta inefectivitat prové del procés de transfecció cel·lular, que és molt delicat i per tant ja prevèiem que no funcionaria completament.

Per tant, en general podem dir que han sortit els resultats esperats i, doncs, hem aconseguit que cèl·lules de ronyó humà fabriquin proteïnes amb fluorescència no pròpia de cèl·lules humanes.

CONCLUSIONS

A l'inici del treball ens vàrem plantejar dos objectius. El primer era aprendre quines són les tècniques de l'enginyeria genètica per poder modificar el genoma de les cèl·lules, i el segon era poder-les aplicar experimentalment. Tot i que era molt difícil d'assolir el segon objectiu, ha estat possible portar-lo a la pràctica gràcies a l'accés al Parc Científic de Barcelona i l'ajut dels seus membres.

Experimentalment hem comprovat que, gràcies al l'invent de la PCR, es pot seleccionar i copiar un fragment de DNA desitjat fins a centenars de milions de vegades. Els gens amb els que es treballen són impossibles de veure a ull nu o mitjançant microscopis òptics, i la única manera de poder veure'ls és mitjançant l'electroforesi. Actualment, aquest mètode és un dels més utilitzats, ja que s'ha vist que també permet concentrar i aïllar tots els gens del mateix tipus d'una dissolució de DNA.

Amb el descobriment del funcionament dels enzims de restricció, avui en dia és possible tallar el DNA per llocs molt concrets, per separar gens concrets d'un genoma sencer i recombinar-los amb altres molècules de DNA. Si aquests gens els recombinem amb vectors, els podem introduir a cèl·lules procariotes com els bacteris, i cèl·lules eucariotes com les cèl·lules animals.

Per tant, tot i la gran complexitat de les tècniques utilitzades, ens ha sobtat la relativa facilitat amb la que es pot modificar el genoma d'una cèl·lula segons els interessos del científic, de manera que una cèl·lula pot incorporar gens externs i utilitzar-los com si fossin propis seus: replicant-los i sintetitzant proteïnes a partir d'ells.

Nosaltres hem treballat amb el gen d'una proteïna, la 4F2, i el gen de la fluorescència, GFP, per poder veure la proteïna. La proteïna 4F2 és important ja que reconeix les proteïnes de la membrana d'antígens. Mitjançant les tècniques de l'enginyeria genètica, es pot fer que a qualsevol proteïna s'hi uneixi el gen de la fluorescència, que és molt útil ja que permet identificar molt fàcilment les proteïnes a les quals s'enganxa i estudiar la seva funció, el seu moviment a dins de la cèl·lula, la seva relació amb altres substàncies, etc.

El fet de treballar amb els gens de la proteïna 4F2 i la de la fluorescència, ha estat solament un mitjà per entendre el funcionament de l'enginyeria genètica. Així, la conclusió més important a la qual hem arribat és que, si es pot introduir el gen que codifica a la proteïna 4F2 i GFP a qualsevol cèl·lula, també es podran introduir altres gens que portin la informació per sintetitzar proteïnes com la insulina, resistències a substàncies letals, o qualsevol altre gen, a cèl·lules que no tenien el gen determinat prèviament.

L'enginyeria genètica, doncs, obre una gran porta a la investigació per conèixer millor el funcionament dels éssers vius, per l'elaboració de productes farmacèutics (com la insulina o la hormona del creixement), per a la millora de cultius de plantes per a l'agricultura, i pel tractament de malalties animals (en particular, humanes) com per exemple el càncer, la SIDA, i les malalties hereditàries.

BIBLIOGRAFIA

La cèl·lula eucariota i procariota

AAVV: *Malalties infeccioses, sistema immunitari i genètica* (Enciclopèdia de Medicina i Salut, Volum 7), Enciclopèdia Catalana, Barcelona, 1991.

<http://www.cienciasnaturals.com/alumn1/RoserFont2.html>

<http://www.aula2005.com/html/cn1eso/10cellules/bacteri.jpg>

http://es.wikipedia.org/wiki/Envoltura_celular_bacteriana

http://en.wikipedia.org/wiki/HEK_cell

Àcids nucleics, genètica molecular, les proteïnes i enginyeria genètica.

L. NELSON, DAVID; M. COX, MICHAEL; *Lehninger, Principios de Bioquímica*.
Quarta edició. Edicions Omega, Sabadell, 2008.

PIERCE, BENJAMIN: *Genètica, un enfocament conceptual*. Segona edició. Editorial medica panamericana. Madrid, 2006.

BERG, PAUL; SINGER, MAXINE: *Tratar con genes. El lenguaje de la herencia*.
Edicions Omega S.A.. Barcelona, 1994.

D. WATSON, JAMES; TOOZE, JOHN; T. KURTZ, DAVID: *ADN recombinante: introducción a la ingeniería genética*. Primera edició. Editorial Labor S.A.. 1988.

<http://campus.usal.es/~dbbm//modmol/index.html> (*Universidad de Salamanca*)

<http://themedicalbiochemistrypage.org/spanish/nucleic-acids-sp.html>

<http://www.ucm.es/info/genetica/grupod/index.htm> (*Universidad Complutense de Madrid*)

Imatges

<http://tiempodexito.com/bioquimica/images/ribosa.jpg>

http://ca.wikipedia.org/wiki/Base_nitrogenada

<http://www.iesbanaderos.org/html/departamentos/bio-geo/Apuntes/Bio/T%206%20Ac%20Nucleicos/2%20Composicion.htm#Nucleotidos>

http://cellbiology.med.unsw.edu.au/units/images/DNA_replication_fork.png

http://www.frontiers-in-genetics.org/fr/pictures/chromatin_2.jpg

http://es.wikipedia.org/wiki/Archivo:TRNA-Phe_yeast_1ehz.png

<http://www.pdb.org/>

http://en.wikipedia.org/wiki/File:GFP_structure.png

http://www.mun.ca/biology/scarr/MGA2_03-20.html

<http://www.porquebiotecnologia.com.ar/index.php?action=cuaderno&opt=5&tipo=1¬e=3>

http://matragut.files.wordpress.com/2010/02/fig6_10.jpg

<http://www.obgynacademy.com/basicsciences/fetology/genetics/>

http://ca.wikipedia.org/wiki/Enlla%C3%A7_d%27hidrogenhttp://www.biologia.arizona.edu/biochemistry/problem_sets/large_molecules/01t.html

<http://alex00.site40.net/curtis/libro/c3c.htm>

<http://www.gene-quantification.de/platform1.html>

<http://caminhos-na-madrugada.blogspot.com/2009/12/electroforesis.html>

<http://abretusmanos.com/blog/?m=20090219&paged=3>

http://www.innoprot.com/documentos/fotos/productos/2009313175459_es_LINTERN A%20HEK293.jpg

<http://dannycdc.blogspot.com/2010/10/membranas-biologicas.html>