



GARBÍ
PERE VERGÉS

Escola Garbí Pere Vergés d'Esplugues

La síntesi alternativa de proteïnes i les seves aplicacions en malalties com l'Alzheimer.

Autor: Ricard Benages Prats

Curs: 1r de Batxillerat

Àrea: Ciències biomèdiques

Tutora: Mikele Zabala i Anna Ramos

<i>AGRAÏMENTS</i>	1
<i>0. INTRODUCCIÓ</i>	2
0.1. Presentació del Tema	2
0.2. Justificació del Treball	2
0.3. Hipòtesis i Objectius	3
0.4. Metodologia	4
<i>1. L'ALZHEIMER</i>	5
1.1. Què és?	5
1.2. Simptomatologia	6
1.3. Anatomia Patològica	6
1.4. Diagnòstic i exàmens.	8
1.5. Prevenció i Factors de risc que intervenen en la malaltia.	10
1.6. Tractaments i teràpies ja existents.	11
<i>2. ESTUDI PROTEÏC</i>	15
2.1. β -Amiloide	15
2.2. TAU.....	16
2.3. GFP ("Green fluorescent protein").....	17
<i>3. PROCESSOS DE SÍNTESI I EXECUCIÓ DE PROTEÏNES</i>	19
3.1. El dogma central de la biologia.....	19
3.2. Regulacions posttraducionals.....	20
<i>4. ELS BACTERIS COM A MEDI PRODUCTOR</i>	22
4.1. Escherichia Coli.....	22
4.2. Anatomia i morfologia del bacteri.....	22
4.3. Parasexualitat Bacteriana	23
<i>5. ENGINYERIA GENÈTICA</i>	26

5.1.	Vectors d'ADN	26
5.2.	CRISPR-CAS9 i enzims de restricció.....	27
5.3.	Opero Arabinosa i plasmidis pGLO.....	28
6.	<i>PART PRÀCTICA</i>	30
6.1.	Introducció	30
6.2.	Objectius de la pràctica	31
6.3.	Resultats de l'Experiment.....	38
7.	<i>CONCLUSIONS DEL TREBALL DE RECERCA</i>	40
	<i>BIBLIOGRAFIA</i>	42
	<i>IMATGES</i>	46

AGRAÏMENTS

Per començar m'agradaria agrair la gran feina feta per ambdues directores que m'han anat seguint durant el procés, la Sra. Mikele Zabala i la Sra. Anna Ramos qui amb molta dedicació i paciència m'han guiat i tutelat per fer possible aquest treball.

També cal agrair la presència de la meva família i els meus amics qui han aportat un punt de vista crític i constructiu a aquest projecte ajudant a que el producte resultant sigui aquest.

Cal donar les gràcies a la Srta. Maria Granda, estudiant de bioquímica a la UAB que ha estat recolzant tot el projecte, revisant la coherència dels procediments i ajudant a solucionar entrebancs que han aparegut al llarg del mateix.

I per últim al curs Bojos per la Bioquímica de la Universitat de Barcelona que vaig fer l'any passat, més en concret la Srta. María Saez qui em va ajudar a planificar, idear i perpetrar la part pràctica.

0. INTRODUCCIÓ

0.1. Presentació del Tema

Des de fa un segle i cada cop més, les malalties neurodegeneratives com l'Alzheimer són més presents en la nostra societat.

L'increment exponencial de casos que s'han observat en els últims anys han provocat que aquestes malalties passessin de ser minoritàries, a ser el focus d'investigació del segle XXI. Només a Espanya ja hi ha una incidència de vuit-centes-mil persones que pateixen de demència, globalment un total de quaranta-sis milions de persones estan afectades i si no en fem res els nombres podrien créixer ràpidament fins als cent cinquanta-un milions abans del 2050.

A causa dels diferents factors de risc per patir la malaltia, als quals ens hi exposem cada cop més, la mortalitat causada per l'Alzheimer ha crescut un 145% des de l'any 2000.

L'Alzheimer és una malaltia que afecta la creació d'unes substàncies (β -amiloide i TAU) de manera que no es sintetitzen de manera adequada i es produeixen unes aglomeracions d'aquestes al medi de l'encèfal (plaques amiloides) que van ocupant a poc a poc els espais de les neurones provocant lentament la mort cerebral.

Aquest treball aportarà una visió més conscienciada i sensible envers la malaltia. Proporcionarà informació, dades i evidències per poder entendre el funcionament d'aquesta malaltia, les seves afectacions i característiques. Finalment, proposaré una possible pal·liació per veure si es pot endarrerir el desenvolupament de la demència o fins i tot fer-la desaparèixer.

0.2. Justificació del Treball

L'Alzheimer, al tenir una molt alta afectació avui en dia, ens toca a gairebé tots patir els seus efectes, sigui en familiars propers o en els costos econòmics que suposa aquesta malaltia per a un país (En el passat 2021 als Estats Units l'Alzheimer va tenir un cost nacional de tres-cents-trenta-cinc milions de dòlars).

En el meu cas l'Alzheimer afecta un familiar proper donant un valor afegit a aquest treball i creant un interès extra per complir els objectius plantejats.

Encara que costi de creure la mortalitat d'aquesta, és superior a malalties com el càncer de mama i el càncer de pròstata junts.

Per aquests motius i molts d'altres he escollit el tema envers aquesta demència per a intentar aportar el meu granet de sorra a la causa.

0.3. Hipòtesis i Objectius

Gràcies als avenços tecnològics del segle en que vivim es va poder descobrir un mètode de segregació d'insulina per a poder allargar l'esperança de vida dels diabètics.

L'Alzheimer al compartir moltes característiques genètiques amb aquesta patologia ens va fer pensar si seria possible reproduir el mateix mètode (en diferents condicions). Un cop plantejat el mètode més efectiu es van plantejar aquestes tres hipòtesis:

1. Potser la presència de la proteïna beta-amiloide pot ser contrarestada per la presència de la proteïna funcional.
2. Potser es crearan els mateixos nombres de plaques amiloides en un medi amb més concentració de proteïna funcional.
3. Potser és possible expressar heteròlogament una proteïna de manera alternativa a l'organisme.

Plantejades les hipòtesis em vaig plantejar com poder resoldre les preguntes sorgint així el mètode amb el qual treballarem i, tot seguit, els objectius que volem aconseguir abans de concloure aquest projecte.

Aquests objectius són:

- Conèixer els diferents processos per a la creació de proteïnes (naturals).
- Aprendre la fisiologia i morfologia dels bacteris capaços desintetitzar les biomolècules orgàniques necessàries.
- Estudiar l'Alzheimer a fons, aprendre les seves característiques i els seus símptomes.
- Buscar quines malalties comparteixen característiques i propietats per veure si el nostre mètode podria ser o no ser efectiu.
- Desenvolupar un mètode efectiu, mitjançant el mètode científic i amb sentit dins de les possibilitats que tenim .
- Conèixer les diferents entitats que tracten amb aquest tipus de malalties.
- Poder realitzar alguna pràctica al laboratori amb resultat aplicable
- Aprendre termes científics específics.
- Saber distingir diferents tipus de bacteris.

0.4. Metodologia

Per començar a elaborar aquest projecte s'ha fet una àmplia recerca dels temes esmentats prèviament i elaborarem un marc teòric redactat. Aquesta part del treball conté informació extreta de diferents llocs (pàgines web, llibres, experiències, proves mèdiques...) contrastats i prèviament comprovats per assegurar la màxima veracitat del treball. Aquest marc teòric ha estat utilitzat posteriorment com a guia per a començar a treballar en la part pràctica del projecte.

Amb l'ajuda d'un laboratori equipat per poder acomplir les meves demandes s'ha experimentat amb el mètode elaborat per poder trobar una resposta fiable i comprovada per a les meves hipòtesis.

Finalment el treball acaba amb unes conclusions que fruit del resultat de les dues grans parts del projecte.

1. L'ALZHEIMER

1.1. Què és?

Podríem considerar l'Alzheimer com a una epidèmia, tothom és susceptible a patir aquesta malaltia, és més, més d'un deu per cent de les persones que superen els seixanta anys pateixen d'aquesta. Així i tot, és una pandèmia estructural, de la qual en podem preveure l'augment dels casos i esbossar les dades epidemiològiques fins que no es trobi una possible cura definitiva.

Aquesta malaltia forma part del grup de les demències. Cal, però remarcar la diferència entre l'AD (Alzheimer Disease) i una demència: podríem dir que la demència és la conseqüència, és un deteriorament cognitiu progressiu amb la pèrdua d'habilitats físiques i mentals, deixant al pacient en un estat de demència i dependència. En canvi, l'Alzheimer és la causa, és el motiu pel qual la persona pateix la demència.

Des del punt de vista mèdic, l'Alzheimer és una malaltia neurodegenerativa progressiva que afecta majoritàriament a majors de seixanta anys, aquest deteriorament és causat per l'acumulació de dues proteïnes al cervell: Tau (la qual se situa a l'interior de les neurones) i β - Amiloide (situada a l'espai intercel·lular neuronal). Aquestes dues proteïnes en estar desnaturalitzades precipiten i formen conglomeracions polimèriques de proteïnes mal funcionants denominades cabdells neurofibril·lars. Són aquests, els causants de la múltiple fosforilació dels microtúbuls intracel·lulars o també coneguts com a Tau.

Tot i que es produeix un canvi en la funció de la proteïna aquesta no es desnaturalitza ben bé, la fosforilació (procés pel qual passen totes les proteïnes en fase madurativa en el qual la Fosfatasa afegeix o extreu un grup fosfat per a regular la funció de la proteïna) no es produeix correctament adherint més grups fosfats dels necessaris a la proteïna TAU, motiu pel qual polimeritza i crea una substància perjudicial per a les neurones. La proteïna β - Amiloide pateix un tipus diferent de desnaturalització la qual provoca la síntesi de plaques senils. També conegudes com a plaques neurítiques, secreten un dipòsit extracel·lular en la substància grisa del cervell que degenera a poc a poc fins a provocar una atròfia bilateral cerebral.

La majoria de les causes d'aquesta demència es desconeixen encara avui dia; tot i així, es considera que entre l'1% i el 5% dels casos de la malaltia (Alzheimer genètic) són hereditaris per transmissió autosòmica dominant amb alteracions en els cromosomes 1, 14 o 21. Amb una edat d'aparició generalment anterior als seixanta-cinc anys.

Pel que fa a la resta de casos que presenten Alzheimer l'etiologia és variada i multifactorial, com hem esmentat abans es desconeixen moltes de les causes d'aquesta malaltia, però molts dels factors de risc (dels quals parlaré més endavant) estan predeterminats genèticament, augmentant les possibilitats de patir la malaltia si un parent proper l'ha patit. Per tant, podríem dir que aquesta malaltia és esporàdica, ja que ni els factors genètics ni els ambientals per separat

tenen la suficient força per desencadenar la malaltia. Han d'estar associats entre ells i comptar amb el factor d'envelliment per desenvolupar aquesta condició.

1.2. Simptomatologia

Segons la "Alzheimer's Association" dels E.E.U.U. existeixen deu signes d'alarma per detectar si nosaltres o algú del nostre voltant mostra símptomes d'Alzheimer:

- Pèrdua de memòria a curt termini (descuits en labors quotidianes com són dates, experiències, tasques..)
- La necessitat de repetir molts cops un mateix concepte abans que el malalt l'interioritzi també
- pot ser un altra símptoma d'Alzheimer.
- Dificultat per resoldre problemes simples del dia a dia (problemes en la resolució d'operacions simples matemàtiques, decisions quotidianes com podria ser que posar-se per a sortir al carrer...)
- Dificultat en planificar-se envers les seves obligacions i endreçar la seva rutina.
- La dificultat per a relacionar imatges amb conceptes i viceversa també la considerem com a una alerta en aquesta malaltia.
- La dificultat per a assimilar nous conceptes i aprendre coses noves.
- Problemes de dicció i presa de decisions simples i immediates.
- Dificultats en la coordinació de l'aparell locomotor (dificultat per a escriure, mobilitat no fluida...)
- Canvis d'humor sobtats sense precedents ni motius.
- Pèrdua de la habilitat de raonament i coherència.

1.3. Anatomia Patològica

En la Malaltia de l'Alzheimer es produeixen diferents canvis físics i químics en el cervell provocant atrofia cerebral progressiva, bilateral i difusa.

Aquesta comença en regions mesials temporals del cervell , el qual s'encarrega de fer funcionar el llenguatge, la memòria auditiva i sensorial, l'equilibri i la regulació d'algunes emocions a més del processament de la informació auditiva.

Posteriorment afecta el neocòrtex (part exterior dels hemisferis cerebrals formada per sis capes, juntes constitueixen el sistema límbic) el lòbul parietal (aquest rep i integra la informació dels estímuls sensorials, visual, tacte, estímuls de el corrent dorsal i el processament del llenguatge), el frontal (pel qual relacionem les seves funcions amb la memòria a llarg termini, l'atenció i la capacitat per planificar-se) i posteriorment redueix l'activitat cerebral fins a causar la mort. En aquestes localitzacions del cervell es produeix una lesió i posterior destrucció de les neurones cerebrals en relació amb

l'aparició dels dipòsits insolubles de les plaques senils (β -Amiloide) o la síntesi de cabdells neurofibril·lars (TAU).

En més concentració trobem els dipòsits extracel·lulars de la proteïna β -Amiloide que forma fibril·les i es conglomera formant les plaques difuses i neurítiques (senils). Aquestes formen un nucli dens i presenten neurites distròfiques formades de β -APP+ (Proteïna precursora del β -Amiloide immunopositiva). El β -Amiloide es produeix per una escissió anòmala de la proteïna precursora Amiloide (APP). Quan la APP es escindida per la α -Secretasa, procés que podríem considerar correcte perquè la proteïna sigui ben segregada, el producte resultant és un pèptid soluble, que un cop ha perpetrat la seva funció s'elimina de l'organisme sense cap problema. Però en el cas de la proteïna en l'AD, predomina l'escissió anòmala i consecutiva de la AAP per part de la β -Secretasa primer i seguidament la γ -Secretasa, formant-se d'aquesta manera el pèptid insoluble de β -Amiloide, el qual és emmagatzemat per les neurones en el seu espai exterior causant la seva mort. El sistema immunitari reconeix aquest patogen anòmal en el cervell i envia cèl·lules de la glia (astròcits i micròglia), aquestes intenten sense èxit el drenatge dels polímers, generen un procés inflamatori que juntament amb la toxicitat del β -Amiloide contribueixen a lesionar les neurones.

Pel que fa als dipòsits intracel·lulars, els quals són responsables de la degeneració neurofibril·lar formada principalment per la proteïna TAU tenen dues conformacions que depenent en quina es trobin provocaran un funcionament immunopositiu o un de neurotòxic. El bon funcionament d'aquesta, forma ponts que mantenen units els microtúbuls que conformen el citoesquelet neuronal.

Però quan el cervell pateix d'aquesta patologia el pèptid TAU pateix una hiperfosforilació, desnaturalitzant el citoesquelet de la neurona i, per tant, donant pas a una degeneració neuronal que forma els cabdells neurofibril·lars.

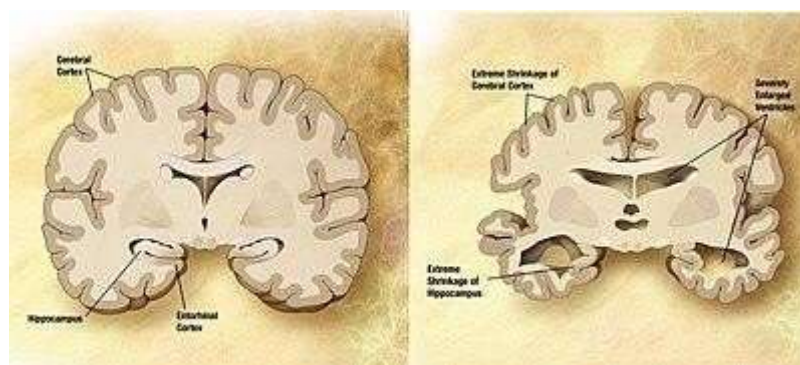


Figura 1

(Anatomia Patològica de l'Alzheimer)

1.4. Diagnòstic i exàmens.

Per diagnosticar l'Alzheimer cal que un metge capacitat ens trastorns cerebrals (Neuròlegs, Psiquiatres, Geriàtrics...) revisi l'historial clínic, els antecedents farmacològics i els símptomes que es presenten ja esmentats prèviament.

Depenent d'aquest primer cribratge i anàlisi de l'estat de la malaltia es procedeix a realitzar diferents proves al pacient:

Avaluació de problemes de memòria

El metge demana al pacient que respongui a una sèrie de preguntes o que completi un cert nombre d'activitats per a posar a prova les habilitats cognitives (memòria, pensament abstracte, habilitats de resolució de situacions i l'ús del llenguatge). Per fer-ho el doctor farà una anàlisi de l'estat mental en que avaluarà l'estat de deteriorament cognitiu del pacient mitjançant proves de raonament i de memòria.

En segon lloc, un neuropsicòleg du a terme proves neuropsicològiques que avaluen de manera exhaustiva quines de les capacitats encara es mantenen. Serveix per donar al malalt una pauta amb les coses que encara pot fer i determinar si pot realitzar les seves tasques diàries de manera segura (conduir, administrar els diners...) Aquest mètode també descarta que els símptomes siguin causats per una depressió i no per la demència.

Per últim, els doctors s'entrevisten amb els amics i familiars del pacient per avaluar el seu comportament: canvis d'humor, capacitat de raonament, capacitats funcionals... Els metges busquen detalls que ajudin a ajustar el diagnòstic i així poder passar a l'anàlisi físic.

Anàlisi de laboratori

Aquesta és una prova addicional que es realitza quan el reconeixement neuropsicològic no és del tot clar.

S'utilitzen mètodes com l'anàlisi de sang per descartar afeccions que provoquen símptomes similars, per exemple: el trastorn de la tiroides o la insuficiència de la vitamina B12 provoquen alguns símptomes que podrien ser compatibles amb la malaltia del Alzheimer.

Recentment ha sortit un estudi que demostra que les anàlisis de sang poden distingir el tipus de demència que es pateix gràcies a mirar els nivells de p-tau217 i a més aquest tipus d'anàlisi podria ajudar a detectar la malaltia fins a 20 anys abans de que apareixin els símptomes.

Proves de diagnòstic per imatges del cervell.

Aquesta malaltia produeix canvis en la substància grisa del cervell, provoca la pèrdua progressiva de cèl·lules cerebrals. Tenint en compte això podem comptar amb les diferents tècniques per fotografiar el cervell i veure en quin estat es troba aquest òrgan:

¹PET/ TC aquesta utilitza petites quantitats de material radioactiu (Radiosondes) que amb l'ajut d'una càmera i un ordinador pot veure l'activitat bioquímica de les cèl·lules del cervell, per tant, podem veure les diferents funcions dels teixits i òrgans. Aquesta és aplicable a l'Alzheimer, ja que detecta les conglomeracions de cabdells Neurofibril·lars i de proteïna tau hiperfosforilada.

També podem tenir en compte les ressonàncies magnètiques per detectar la malaltia, funcionen emetent una freqüència energètica que els diferents àtoms del cos poden captar si estan a dins del camp magnètic. Gràcies a això podem realitzar imatges transversals del cos i veure l'estat dels òrgans.

Per últim, podem usar els ²CT per a detectar l'Alzheimer, ja que funciona molt semblant al PET, però aquest ressalta amb diferents marcadors (colors, pH...) les diferents proteïnes, aconseguint donar a veure si hi ha la presència de les diferents proteïnes en el medi que analitzem.

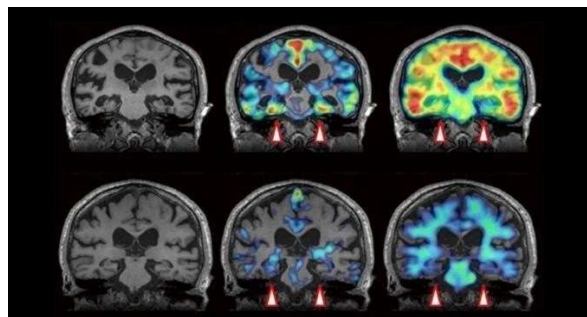


Figura 2

(PET scan de l'evolució del AD)

¹ PET: "Positron emission Tomography" prova diagnòstica que s'ajuda de la radiació per a identificar substàncies exògenes en l'organisme.

² CT: Tomografia computada, procediment d'exploració radiològica basada en raigs X.

1.5. Prevenció i Factors de risc que intervenen en la malaltia.

Factors de risc:

Tot i que fa més d'un segle que la malaltia de l'Alzheimer va ser descrita i reconeguda per primer cop, encara en desconexim quina és la causa que la provoca.

Cada cop tenim més proves i evidències que la malaltia no té només una causa sinó que intervenen múltiples factors en major o menor mesura, aquests factors són els que actualment coneixem com a factors de risc de l'Alzheimer.

Aquests factors estan dividits en dues grans categories: modificables i no modificables.

Els factors no modificables són aquells que es relacionen amb l'edat i la predisposició genètica de l'organisme amb la malaltia. L'edat és el principal factor de risc de la malaltia, ja que com prèviament esmentat, a partir dels seixanta-cinc anys s'incrementen les possibilitats d'acabar desenvolupant-la. Tot i així, molta gent d'edat avançada preserva altes capacitats cognitives i, per tant, l'Alzheimer no és una conseqüència inevitable de fer-se gran. D'altra banda, l'Alzheimer no és una malaltia hereditària, però en un 1% dels casos la causa es pot atribuir directament a factors genètics i en un 99% dels afectats hi ha gens que confereixen en una major vulnerabilitat per a desenvolupar-la, tot i que no són determinants en si mateixos.

Pel que fa als factors de risc modificables, aquest són els que provenen de la salut cardiovascular i a l'estil de vida del pacient. Els factors de risc cardiovasculars són els que fan referència a patologies preexistents com són la hipertensió, la diabetis, el colesterol, el tabaquisme o l'obesitat. El control d'aquestes variables té a veure amb el seguiment mèdic del pacient i del seu estil de vida. Portar un estil de vida sedentari i una dieta poc equilibrada repercuteix en la salut cardiovascular, en la disminució d'irrigació al cervell i conseqüentment en la salut cerebral.

Evitar l'aïllament social i mantenir-se mentalment actiu són alguns dels altres factors que afecten l'estil de vida que poden ser claus per a desenvolupar o no la patologia.

El Barcelona Brain Health Institute (BBHI) és un estudi promogut per l'Institut Guttmann centrat en la determinació de com aquests factors biològics i d'estil de vida incideixen en la salut cerebral.

Prevenció

Poder prevenir la malaltia incidint en els factors modificables, està únicament en les nostres mans.

Prendre les decisions adequades en la nostra joventut perquè no repercuteixin en la nostra salut quan ens fem grans és de vital importància. Modificant els nostres hàbits de vida cap a uns més saludables ens assegurem un benestar tant cerebral com cardiovascular.

Per a modificar aquests hàbits podem començar per adoptar una dieta mediterrània, ja que és la més recomanada pel fet de sers un model de nutrició saludable, equilibrada i variada. Aquesta assegura l'aportació necessària de nutrients i calories per a mantenir un bon ritme de vida de manera sostenible i saludable.

Incorporar activitat física a la rutina també és una manera d'assegurar la salut cerebral, de manera divertida i entretinguda practicant algun esport o directament sortint a caminar una estona.

Per prevenir la malaltia de l'Alzheimer, a més, cal mantenir-se mentalment actiu i usar les diferents capacitats cognitives en el dia a dia.

Mantenint les relacions socials, tenir un pla vital, el descans i son diaris, posar a prova el cervell i treballar la nostra reserva cognitiva ens ajuda a potenciar la resistència de les nostres neurones i, per tant, fer-les més resistents a les alteracions patològiques.

Seguint aquests consells serem capaços d'enfortir la nostra salut i reduir el risc de desenvolupar demència. Els experts afirmen que controlant els factors de risc modificables podem evitar un de cada tres casos de la malaltia.

1.6. Tractaments i teràpies ja existents.

La malaltia de l'Alzheimer és realment molt complexa i és molt difícil trobar un fàrmac que sigui realment efectiu per a totes les persones per igual.

Tot i així, en els darrers anys els científics han desenvolupat diferents fàrmacs que han suposat un gran avenç en la comprensió i pal·liació d'aquesta malaltia. Concretament, en els darrers deu anys, s'han desenvolupat diferents fàrmacs que poden precisar i tenen com a objectiu abordar diferents punts de la malaltia, doncs no tots els fàrmacs tenen el mateix principi actiu i, per tant, no tots els medicaments són efectius en tots els estats de la malaltia.

Dividirem els tractaments en dos grans grups: Tractament per a la malaltia amb símptomes lleus/moderats i símptomes moderats greus.

Tractaments per a la malaltia del Alzheimer amb símptomes lleus i moderats.

El tractament dels símptomes lleus de la malaltia poden donar al malalt benestar, dignitat i independència però en cap cas erradica la malaltia o evita el progrés d'ella.

Tot i que poden alenir la velocitat de progrés no es contempen com a una solució final per a aquest problema i els científics segueixen investigant per millorar aquests tractaments.

La Galantamina, la Rivastigmina i el Donepezil, que són inhibidors de la 3colinesterasa es recepten en aquests casos.

Aquests medicaments ajuden a controlar o reduir alguns símptomes cognitius de la conducta del pacient. Els científics encara no comprenen gaire bé els efectes i la funció de la colinesterasa per a tractar l'Alzheimer. Però diverses investigacions confirmen que la colinesterasa prové de la descomposició de l' 4acetilcolina, un neurotransmissor que és

molt important per a la memòria i el pensament autònom.

A mesura que la malaltia avança, el cervell deixa de produir acetilcolina per la qual aquests medicaments perden eficàcia a mesura que avança la malaltia i ja no poden ser usats.

Tractaments per a la malaltia del Alzheimer amb símptomes moderats i greus.

Per tractar la malaltia de l'Alzheimer amb símptomes moderats o greus i en estats avançats de la malaltia es recepta un medicament conegut com a Mematina (NMDA) la funció principal del qual, és reduir els efectes dels símptomes i intentar preservar algunes de les funcions que els malalts encara puguin tenir. Per exemple la Mematina pot ajudar als malalts a mantenir la capacitat de regular el trànsit intestinal i decidir quan van o quan no val al lavabo preservant així una mica d'independència i intimitat.

Es creu que la Mematina actua regulant el glutamat, una substància química del cervell important i que si es produeix en excés produeix la mort de les cèl·lules del cervell. Per tant, aquest medicament actua com a regulador de la quantitat de ⁵glutamat al cervell.

La FDA ("Food and Drug Administration") també ha aprovat el Donepezil, el pegat de Rivastigminai un medicament combinat de Mematina i Donepezil per al tractament dels símptomes de moderats a greus de la malaltia d'Alzheimer.

³ Colinesterasa: Enzim essencial per a la transmissió nerviosa en les unions neuromusculars.

⁴ Acetilcolina: Substància química elaborada per algunes neurones

⁵ Glutamat: sal sòdica de l'aminoàcid àcid glutàmic.

A continuació es mostra una taula resum d'aquests medicaments, el seu ús, com funciona i efectes secundaris.

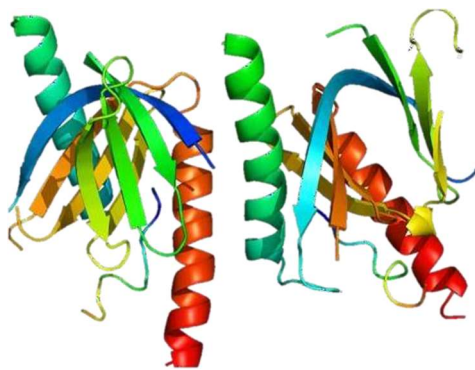
Nom del fàrmac	Tipus de medicament i ús	Com funciona	Efectes Secundaris freqüents.
Aducanumab	Immunoteràpia modificadora de la malaltia receptada per a tractar el deteriorament cognitiu lleu.	Elimina el β - Amiloide anormal per a ajudar a reduir la quantitat de plaques en el cervell.	Anomalies en les imatges relacionades amb l'Amiloide.
Donepezilo	Inhibidor de la colinesterasa receptat per a tractar els símptomes lleus moderats i greus de l' Alzheimer.	Prevenió contra la descomposició de la acetilcolina en el cervell.	Nàusees, vòmits, diarrea, rampes musculars, fatiga i Perduda de pes.
Rivastigmina	Inhibidor de la colinesterasa receptat per a tractar els símptomes lleus moderats i greus de l' Alzheimer.	Prevenió contra la descomposició de la acetilcolina i de la butilcolina en el cervell.	Nàusees, vòmits, Perduda de pes, indigestió i debilitat muscular.
Memantina	Antagonista de N- metil-D- aspartat (NMDA) receptat per a tractar els símptomes moderats o greus de la malaltia.	Bloqueja els efectes tòxics associats al excés de glutamat i regula la seva activació.	Marejos, cefalees, diarrea i confusió.

Nom del fàrmac	Tipus de medicament i ús	Com funciona	Efectes Secundaris freqüents.
Combinació fabricada de Memantina i Donepezilo.	Antagonista d' NMDA i inhibidor de la colinesterasa receptada per a símptomes moderats i greus.	Bloqueja els efectes tòxics associats al excés de glutamat i evita la descomposició de la acetilcolina en el cervell.	Mal de cap, nàusees, vòmits, diarrea, marejos i anorèxia.
Galantamina	Inhibidor de colinesterasa receptat per a tractar els símptomes lleus i moderats del Alzheimer.	Prevenió contra la descomposició de la acetilcolina i estimula els receptors nicotínics per a alliberar més acetilcolina.	Nàusees, vòmits, disminució de la gana, marejos i mal de cap.

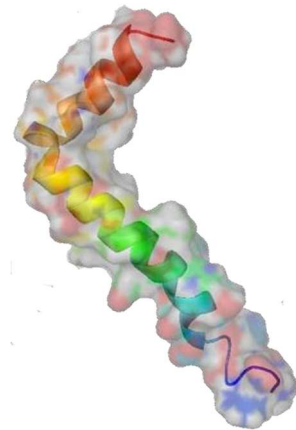
2. ESTUDI PROTEÏC

Per poder realitzar la part pràctica d'aquest projecte i, ja que treballarem amb dues proteïnes (TAU i β -Amiloide) hem de fer un estudi a fons i contrastat sobre aquestes. Realitzar-lo, a més, permet comprovar la compatibilitat d'aquestes proteïnes amb el bacteri que les sintetitzarà i les diferents característiques que presenten aquestes proteïnes per tal de poder ajustar el protocol de l'experimenti així aconseguir millors resultats i més específics.

2.1. β -Amiloide



Proteïna precursora del β -Amiloide (APP)



β -Amiloide

Figura 3 i 4

(Estructura de la β -Amiloide i la APP)

La Proteïna β -Amiloide és un pèptid de 36 a 43 aminoàcids que es sintetitza des d'una proteïna precursora (favorable pel funcionament de l'organisme) APP. Perquè aquesta proteïna es formi i provoqui diferents patologies com l'Alzheimer l'APP es divideix seqüencialment.

**L'APP abans de ser segmentada i quan encara manté la seva funció inicial, és una proteïna transmembrana amb funció no determinada avui dia de caràcter soluble.*

Els enzims β -Secretasa i γ -Secretasa són els encarregats de processar aquesta segmentació dels diferents pròtomes de la APP.

Inicialment la β -Amiloide es forma per l'acció successiva d'aquest enzim (β -Secretasa i γ -Secretasa) i que produeixen un

extrem C-terminal del pèptid. Alhora aquests enzims es volen incorporar a la regió que està en contacte amb la membrana per a formar un altre tipus de proteïnes anomenades isoformases. D'aquestes se'n generen dues A β 40 i A β 42, la isoforma més comuna és la A β 40 i aquesta no produeix cap efecte, en canvi, la A β 42 és més fibrogènica i, per tant, s'associa a malalties com l'Alzheimer. Podríem dir que aquests dos factors (C-terminal i isomerització) són els causants de la insolubilització i per tant la creació de plaques senils.

Perquè aquest procés s'activi hi ha d'haver una mutació genètica autosòmica dominant en el gen que codifica per la APP, tot i que això només és així en el 10% dels casos, en l'altre 90% la síntesis d'A β 42 està relacionada directament amb factors esporàdics esmentats prèviament.

Pel que fa a l'estructura d'aquesta proteïna és intrínsecament no estructurada, és a dir, no té una conformació terciària compacta, sinó que és un conjunt d'estructures. Aquest comportament és el que fa que sigui tan difícil de seqüenciar i estudiar, ja que no es pot cristal·litzar i, per tant, no es pot extreure dels organismes sense que es desnaturalitzi.

Tot i així, l'any 2010 en condicions de baixa temperatura i baixa salinitat es van aconseguir aïllar els oligòmers i aconseguir tota la informació recollida en aquesta secció.

2.2. TAU

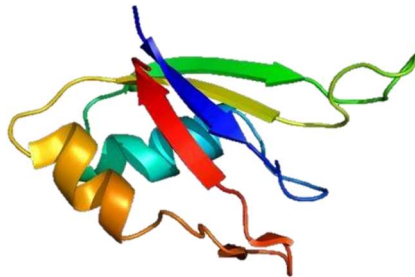


Figura 5
(Estructura de la proteïna TAU)

La proteïna TAU, abundant en el sistema nerviós central i en el sistema nerviós perifèric, té la funció dins d'aquests sistemes vinculada a la unió de microtúbuls que a l'hora s'associen a la tubulina per a estabilitzar el citoesquelet neuronal i així inter-comunicar els diferents òrgans i mecanismes cel·lulars.

Les TAU, són proteïnes microtubulars pirenoides molt poc freqüents fora del sistema nerviós central. Estabilitzen els microtúbuls axonals a través de la interacció amb la tubulina.

Aquesta propietat que la conforma ajuda a què es pugui unir als microtúbuls i els estabilitza permetent el moviment de càrregues sobre d'ells, ja sigui des del soma fins a l'axó d'una neurona o viceversa.

Les neurones produeixen diferents formes de Tau, en concret dos que anomenem 3R i 4R.

Durant el desenvolupament neuronal hi ha nivells molt alts de Tau 4R i molt baixos de 3R, però que en la vida adulta de la cèl·lula adhereixen una proporció del 50% cadascuna.

En el cas de les malalties neurodegeneratives com l'és l'Alzheimer hi ha un desequilibri d'aquests dos percentatges en la qual trobem un major percentatge de 3R en relació amb la 4R.

Això passa atès que la proteïna TAU té uns nivells d'expressió molt regulats, i se sap que les causes més freqüents per a aquests canvis de percentatges són mutacions genètiques que influeixen en aquests mecanismes de regulació.

El gen que codifica per la proteïna TAU es troba en el cromosoma 17 i vaser descobert per l'Institut d'investigacions en enginyeria genètica i Biologia molecular pel doctor Hèctor N.Torres (INGEBI)

Aquest mateix cromosoma pot donar origen a diferents formes de la proteïna, les quals venen codificades pel mateix gen (3R i 4R). Cal recordar que la R davant del número és el punt d'encolatge amb el microtúbul. El numero vol dir quants punts té. Aleshores si en l'Alzheimer hi ha un percentatge més alt de 4R és més difícil de solubilitzar, ja que té més punts amb el que enllaçar-se al citoesquelet i, per tant, es creen aquests cabdells neurofibril·lars que acaben matant a la neurona i causant la neurodegeneració progressiva.

2.3. GFP (“Green fluorescent protein”)

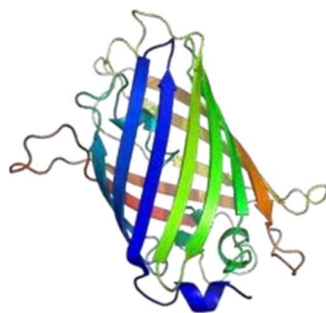


Figura 6
(Estructura de la GFP)

L'estructura de la proteïna verda fluorescent és de 238 aminoàcids, que formen 11 cadenes beta, aquestes 11 cadenes en els plans beta formen un cilindre que en el centre té una alfa, hèlix. Aquesta conté un cromòfor especial (constituït pels aminoàcids 66,65 i 67) i un complex enzimàtic que absorbeix la llum ultraviolada, la catalitza i emet llum verda en aquest cas.

Perquè això passi, quan la llum UV impacta en el complex aquest s'excita, ja que agafa l'energia de la llum i posteriorment el cromòfor s'allibera d'aquesta energia en forma de llum amb longitud d'ona verda. Això permet que la proteïna GFP pugui brillar sense la necessitat d'additius a diferència de les altres proteïnes bioluminescents.

Aquesta proteïna originalment produïda en les meduses *Aequorea victoria* té dos pics d'excitació, 508 nm, el qual és el que emet la freqüència d'ona verda i per tant la que ens interessa, també produeix un de 400 nm que produeix bioluminescència blava, que descartem.

Aquesta proteïna resulta molt versàtil, ja que té molts usos. S'utilitza en diferents camps de la microbiologia, enginyeria genètica i fisiologia. Una de les seves aplicacions més comú és la localització i seguiment de tumors amb metàstasi, pel fet que poden fer-se servir com a marcador. A més permeten veure el desenvolupament cel·lular de diferents espècies injectant-la en diferents estats de creixement i veure'n l'evolució. Per últim i el més important per a aquest treball, és la capacitat que te de poder introduir el gen en espècies exògenes i que es pugui sintetitzar. Aquesta proteïna és originària de les meduses, però si les injectem en ratolins, *E. Coli*, porcs, micos i inclús humans la sintetitzaríem en el nostre citosol.

3. PROCESSOS DE SÍNTESI I EXECUCIÓ DE PROTEÏNES

3.1. El dogma central de la biologia.

En biologia molecular coneixem el dogma central de la biologia com a diferents processos que permeten a la cèl·lula dur a terme les diferents funcions vitals, aquests són: la duplicació de l'ADN (per poder dividir la cèl·lula) i la biosíntesi de proteïnes (la qual engloba la traducció i la transcripció), processos pels quals es passa de tenir un gen a una proteïna.

Per a aquest treball ens centrarem en la traducció i la transcripció, ja que es considera que l'arrel del factor patogen de l'Alzheimer ve des de l'ADN i per tant és malforma una proteïna.

Transcripció

El primer pas per a la biosíntesi de proteïnes és transcriure l'ADN per a convertir-lo en un motlle del qual en traurem la informació per a la síntesi d'una proteïna. Aquest pas d'ADN a ARNm el coneixem com a Transcripció.

Aquest procés comença amb la fase d'iniciació quan l'ARN polimerasa II s'enllaça a la regió promotora amb la seqüència de nucleòtids TAC i posteriorment se separen les dues cadenes d'ADN.

Tot seguit comença la segona fase, elongació, en la qual ARN- Polimerasa II continua la síntesi d'ARNm direcció 5' a 3'. Al cap de 30 nucleòtids al final (extrem 5') de la cadena d'ARNm s'enllaça la caputxa (Gpp-GTP).

Finalment, la darrera fase, en la qual la seqüència TTATTT marca el final de la Transcripció i l'enzim Polí-A-polimerasa col·loca una cua POLI-a a l'extrem 3'.

Abans que la cadena d'ARNm pugui sortir del nucli fins al ribosoma (on posteriorment serà traduït a proteïna) ha de passar per un procés de maduració. Aquest procés anomenat Splicing és un mecanisme mitjançant el qual els introns, és a dir, les regions no codificant dels gens, són escindides del segment extret d'ARNm, i els exons (regions codificadores) s'uneixen per a generar un ARN missatger madur i llest per a ser traduït.

Traducció

La traducció és el procés per al qual es converteix l'ARNm (prèviament extret de la transcripció) en una proteïna immadura.

En la iniciació l'ARNm s'enllaça al ribosoma en el port A, aquest ARNm comença per una seqüència de nucleòtids (AUG) que codifica per l'inici de la síntesi proteica.

Un cop aquesta ha començat l'ARNt comença a portar els diferents aminoàcids, codificats pels corresponents codons al

port P.

Allà els diferents aminoàcids es van enllaçant per enllaç peptídic.

Un cop s'ha traduït tota la cadena d'ARNm una altra seqüència (UAG, UAA i UGA) informa el ribosoma de què la síntesi ha acabat i, per tant, la cadena d'aminoàcids es desenganxa i comença el procés de maduració per a poder ser una proteïna.

3.2. Regulacions posttraducionals.

Les modificacions posttraducionals d'una proteïna són diferents processos químics i biològics que passen després de la síntesi del pèptid.

És el pas final de la síntesi de proteïnes i, per tant, de l'expressió gènica.

Aquest procés és el que dona les diferents funcions a les proteïnes i, per tant, dona joc a crear més d'un protòmer amb un sol gen.

D'aquests processos n'hi ha moltíssims. Atès que el focus del projecte se centra en tres proteïnes, només es detallen els processos que més impacten en el mateix.

Finalment, cal esmentar, també, que molts dels organismes unicel·lulars procariotes a causa de la simplicitat del seu organisme no duen a terme aquestes regulacions.

Fosforilació

La fosforilació és l'addició d'un o més d'un grup fosfat a qualsevol altra molècula.

Es podria dir que és la reacció adversa a la fosfatació.

En el metabolisme, la fosforilació és el mecanisme bàsic de transport energètic amb diferents nucleòtids lliures com l'és l'ATP o l'ADP. Pel que fa a les proteïnes i en especial dels enzims, és un dels principals mecanismes que regula l'activitat proteica.

Aquesta fosforilació en les proteïnes es produeix gràcies a les proteïnes/enzims, quinasa.

Glicosilació

La glicosilació és un procés bioquímic on, tal i com indica el seu nom, s'adhereix un glúcid a un altra molècula.

Com la fosforilació, la glicosilació no només passa en proteïnes tot i que la glicosilació proteica és de les més rellevants, ja que pot donar-se com a una modificació cotraduccional o posttraduccional i això dona molt joc a les diferents funcions que adquireixen les proteïnes dins de l'organisme.

La majoria de proteïnes glicosilades es troben en el reticle endoplasmàtic rugós donat a la composició de l'òrganul i la preservació de la proteïna.

Ubiquitinació

La degradació de proteïnes, la regulació del creixement cel·lular, la reparació de l'ADN, degeneració neuronal i muscular d'entre d'altres són algunes de les funcions de la Ubiquitina.

És un substrat que s'enllaça a una proteïna i forma un barril que agafa els residus de la cèl·lula i els degrada fins que no provoquen una amenaça per a la cèl·lula.

És un regulador cel·lular que contribueix al bon funcionament de l'organisme.

Oxidació

L'oxidació de les proteïnes implica la modificació dels grups laterals d'aminoàcids per ROS i la conversió a carbonil i altres derivats.

Els grups carbonil deficients en electrons són altament reactius amb amines i restes de grups tiol per a produir enllaços creuats entre polipèptids o pròtomes donant una estructura més estable i funcional a la proteïna oxidada.

Prenilació

Aquest procés posttraduccional consta de l'addició de molècules hidrofòbiques (basades en hidrocarburs) que faciliten la unió de la proteïna a la membrana cel·lular, generant una funció similar als anellatges lipídics.

Per tant, amb l'addició d'un grup prenil podem modificar la funció de la proteïna i la seva composició si es requereix d'una funció específica.

4. ELS BACTERIS COM A MEDI PRODUCTOR

4.1. Escherichia Coli

Escherichia Coli o també conegut com a *E. Coli* és un bacteri que trobem en els intestins dels humans d'entre altres organismes, a on ajuda als humans a descompondre i digerir els aliments i posteriorment defecar-los. Tot i haver-hi algunes soques bacterianes que són altament infeccioses i poden produir una mort prematura la gran majoria són favorables per a l'organisme.

Pertany a la família de les enterobacteriàcies i al regne dels procariotes, ja que són organismes unicel·lulars sense nucli. Són molt utilitzats en enginyeria genètica i en la biotecnologia, ja que en tenim codificat el genoma sencer i al tenir l'ADN endreçat en un Plasmidis són molt fàcils de manipular genèticament. A més tenen una capacitat reproductora molt especial anomenada parasexualitat que els ajuda a crear colònies de bilions d'organismes en poc més de 24 hores.

4.2. Anatomia i morfologia del bacteri.

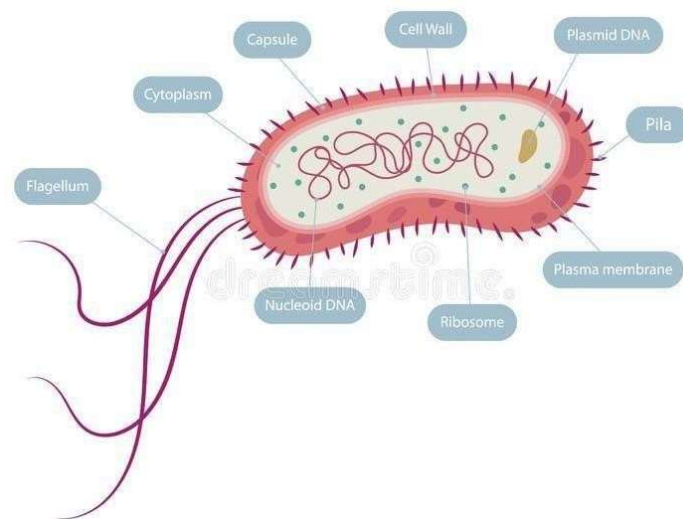


Figura 7
(Estructura del bacteri *E. Coli*)

Començant de fora cap a dins els bacteris presenten una morfologia una mica peculiar i molt diferent a la dels humans. Per començar presenten una paret cel·lular que dona rigidesa i forma a la cèl·lula bacteriana, aquesta està formada principalment de peptidoglicans.

Seguidament i tot just a sota de la paret cel·lular trobem la membrana plasmàtica, composta generalment per lípids i proteïnes inclou la gran majoria d'estructures i orgànuls perquè el bacteri pugui dur a terme les diferents funcions vitals. Seguidament i dins de la membrana trobem els mesosomes, són unes petites invaginacions a la membrana a on es produeix la respiració cel·lular. El citoplasma alberga la resta d'orgànuls que trobem en el bacteri, en ell trobem el material genètic, que no presenta membrana ni forma definida (cromosoma).

Per a la mobilitat dels bacteris compten amb dues estructures anomenades cilis i flagels de conformació proteica i normalment es troben fora de la paret cel·lular.

I per a reproduir-se de manera para sexual els bacteris presenten un pili amb forma d'apèndix filiforme i ajuden a transferir vectors d'ADN entre organismes.

La càpsula és l'orgànel·la més exterior dels *E.coli*, és un revestiment, viscos/mucós constituït de glúcids polisacàrids, la seva funció és protegir als organismes de la fagocitosis i la dissolució.

Finalment, i com la gran majoria dels éssers vius, els bacteris presenten un conjunt de ribosomes que ajuden a expressar les proteïnes i dur a terme les diferents funcions vitals.

4.3. Parasexualitat Bacteriana

Tot i que el mecanisme pel qual es reproduïxen les bacteris és la bipartició (o fissió binària) aquesta suposa un problema per a la proliferació de l'espècie. Els bacteris com que no poden fer la mitosi i, pertant, no hi ha recombinació genètica, per a solucionar-ho han desenvolupat uns mètodes anomenats parasexualitat bacteriana, la qual permet el traspàs de material genètic entre individus de la mateixa espècie. Aquesta propietat és la que provoca la ineficàcia dels antibiòtics, ja que amb només amb un bacteri que dugui a terme resistència a un antibiòtic tots la desenvoluparan gràcies a aquest procés biològic. La parasexualitat consta de tres processos diferents i independents pels quals els bacteris obtenen nou material genètic (transformació, transducció i conjugació).

Conjugació

Aquest procés passa només quan hi ha integrat en els bacteris el plasmidi F, aquest plasmidi conté la informació genètica per crear un pili. La cèl·lula que presenta el plasmidi l'anomenarem F+ i la cèl·lula que no el té i que, per tant, serà la receptora l'anomenarem F-.

Les cèl·lules donadora i receptora entren en contacte mitjançant pilis sexuals i es transfereixen l'ADN plasmídic autoreplicatiu.

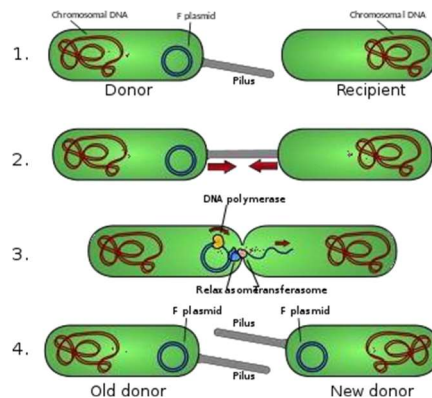


Figura 8
(Conjugació Bacteriana)

Aquest plasmidi autoreplicatiu és el plasmidi F+ en enterobacteris, que codifica la informació necessària per a la generació del pili sexual i, així, la transferència de plasmidis.

El pili de la cèl·lula F+ s'uneix a la cèl·lula F-, s'escurça i entren en contacte. Aleshores el plasmidi es replica pel mètode rodant, que es tracta del pas d'una de les cadenes a la cèl·lula receptora mentre l'altra es replica a la donadora.

La cèl·lula receptora passa a ser F+ quan el plasmidi F s'incorpora al cromosoma bacterià.

Transducció

Per a que aquest procés es dugui a terme caldrà tenir present un virus bacteriòfag, ja que és el mitjà de transport per als segments d'ADN que es vulguin donar.

Els Bacteriòfags transporten l'ADN d'un donador a un receptor. Es produeix la incorporació de gens bacterians a l'interior de la càpsida d'un bacteriòfag en comptes de l'ADN víric a conseqüència d'errors en el cicle vital del virus. El virus que conté aquests gens els injecta a un altre bacteri, que els incorporarà. És el tipus de recombinació genètica més freqüent en bacteris i n'hi ha de dos tipus:

- **TRANSDUCCIÓ GENERALITZADA:** Es produeix durant el cicle lític dels fags virulents i temperats i és capaç de transferir qualsevol part del genoma bacterià.
- **TRANSDUCCIÓ ESPECIALITZADA:** Només es transporten regions específiques de l'ADN bacterià. El fag s'introdueix al cromosoma bacterià abans de replicar-se i quan s'escindeix, transporta un fragment d'ADN de la cèl·lula donadora.

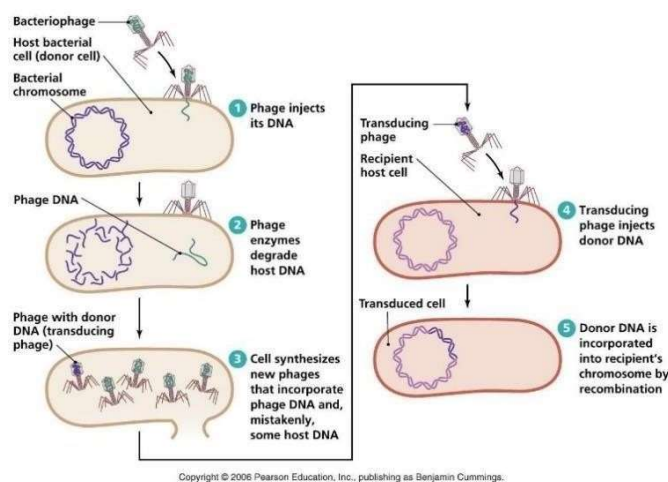


Figura 9
(Transducció bacteriana)

Transformació

Aquest procés consisteix en la captació d'ADN lliure en el medi (provinent d'un altre ⁶bacteri llat en molts casos) que penetra a un bacteri receptor en estat de ⁷competència (bacteri ha de ser competent, sinó no es transformarà) i, aquest, l'incorpora al seu genoma, de forma que podrà ser heretada per la seva descendència.

La molècula d'ADN en qüestió pot ser un fragment d'ADN lineal del medi (originat de la lisi d'un bacteri, per exemple) o bé una molècula d'ADN circular (plasmidi).

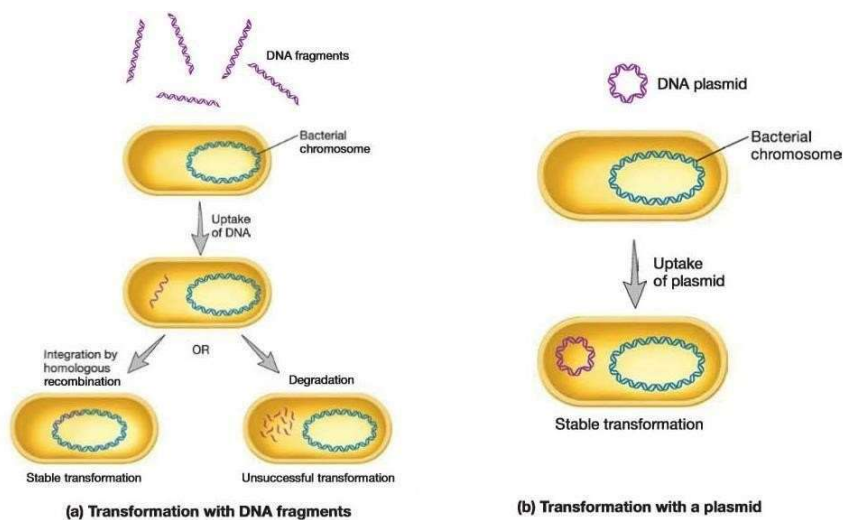


Figura 11
(Transformació Bacteriana)

⁶ Llat: Organisme trencat dins d'un medi (en el cas dels bacteris l'embolcall cel·lular es trenca i tots els orgànuls, proteïnes iADN estan lliures en el medi)

⁷ Estat de competència bacteriana: El bacteri presenta alteracions en la seva paret cel·lular i per tant permet la entrada de factors externs al citoplasma

5. ENGINYERIA GENÈTICA

Tot i que en la part pràctica comprarem el plasmidi ja modificat, cal entendre els passos i les eines que prèviament s'han hagut d'utilitzar per fer-ho.

A tal efecte, hem analitzat a fons l'article "*AraC protein, regulation of the L-arabinose operon in Escherichia coli, and the light switch mechanism of AraC action.*" Schleif, R. *FEMS Microbiol Rev.* 2010 Sep;34(5):779-96

5.1. Vectors d'ADN

Considerem un vector com a una molècula d'ADN de doble cadena amb la capacitat de poder acceptar un fragment d'ADN exogen. Aquests els podem classificar de dues maneres segons el seu ús: vectors de clonació i vectors d'expressió:

Els vectors de clonació que són aquells que com a funció tenen emmagatzemat de seqüències i a obtenció de grans quantitats d'ADN inserit o de la molècula recombinant. Com a diferents exemples tenim els plasmidis, fags, còsmids i cromosomes artificials bacterians o del llevat.

Els vectors d'expressió són els que realment apliquen en el present projecte. Són aquells que treballen com a un vehicle per a inserir nou material genètic a un organisme i produir ARN transcrit de la proteïna producte d'aquell transcrit.

Aquests vectors d'expressió són:

Plasmidis

Un plasmidi és un petit tros d'ADN circular que es troba principalment en bacteris.

Aquests es troben físicament separats de l'ADN cromosòmic i es replica independentment. Normalment, presenten un nombre reduït de gens i poden ser passats entre organismes.

En el cas que es facin servir com a vectors aquests reben un gen d'interès en el genoma del plasmidi, s'introdueix a un altre bacteri mitjançant la parasexualitat bacteriana i es reproduïx dins del nou organisme expressant la proteïna per la qual codifica el gen inserit en el plasmidi.

Bacteriòfags

Un bacteriòfag és una espècie de virus capaç d'infectar a bacteris. Varien molt de forma i de material genètic motiu pel qual s'utilitzen tant en els camps de l'enginyeria genètica.

Un bacteriòfag, per tant, és un paràsit intracel·lular, molt semblant als virus de les cèl·lules animals.

5.2. CRISPR-CAS9 i enzims de restricció.

Les CRISPR, acrònim de la llengua anglesa " Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats" es produeixen en els genomes d'algunes bacteris.

La tecnologia CRISPR-Cas9 pot oferir la capacitat de modificar o corregir directament errors en les seqüències de nucleòtids que tenen una relació directa amb malalties subjacents en el genoma.

Cas-9 és una endonucleasa que quan s'associa a la molècula CRISPR funciona com unes tisores moleculars, que talla, edita o corregeix en una cèl·lula l'ADN que s'associa a una malformació o a una mutació genètica.

El funcionament d'aquest equip de molècules comença amb un ARN guia que porta la Cas-9 al lloc exacte que es vol modificar. Un cop les tisores han realitzat un tall en la seqüència, els mateixos mecanismes intrínsecs de la cèl·lula i l'ADN exogen utilitzaran la maquinària de la mateixa cèl·lula per a reconstruir el tros segmentat d'ADN específicament.

Com a alternativa a la tecnologia de la CRISPR Cas-9 i que només la trobem en el regne dels bacteris tenim els enzims de restricció.

Aquests reconeixen diferències en les seqüències d'ADN, anomenades llocs de restricció i s'uneixen a elles. Cada enzim de restricció reconeix un o dos ,com a molt, llocs de restricció. Quan la proteïna troba el seu lloc aquesta tallarà d'una manera específica i a prop del lloc de restricció.

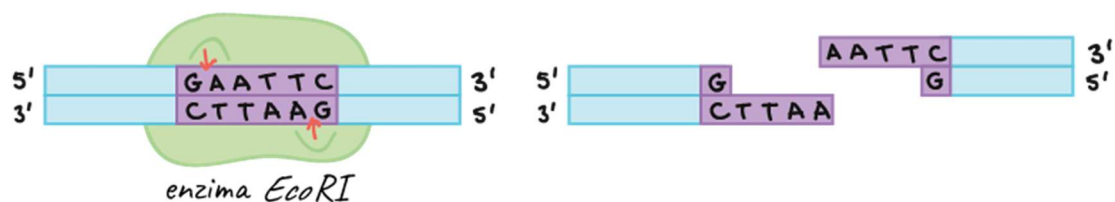


Figura 12

Aquest tipus de tall que fan els enzims de restricció i que deixen aquestes formes de cadena senzilla s'anomenen extrems cohesius i són útils per a la clonació, ja que mantenen els dos fragments d'ADN junts. L'ADN ligasa els pot ajuntar i així l'ADN recupera la seva funcionalitat al cent per cent.

5.3. Opero Arabinosa i plasmidis pGLO.

OPERO ARABINOSA.

El bacteri *E. coli* pot emprar L-arabinosa, que és un monosacàrid de 5 carbonis (constituent de les parets cel·lulars d'algunes cèl·lules vegetals) com a font de carboni i energia. Quatre gens, *araA*, *araB*, *araC* i *araD* codifiquen per proteïnes que es requereixen per la captació i posterior conversió de L-arabinosa en D-xilulosa-5-fosfat, que entra a la via de les pentoses. Els gens *araA*, *araB*, i *araD* codifiquen pels enzims L-arabinosa isomerasa, ribulokinasa i ribulosa-5-fosfat epimerasa. També s'han identificat dos sistemes de transport, el producte del gen *araE* i el sistema format pels productes dels tres gens *araFGH*. La proteïna *AraC* és un activador positiu de l'operó arabinosa.

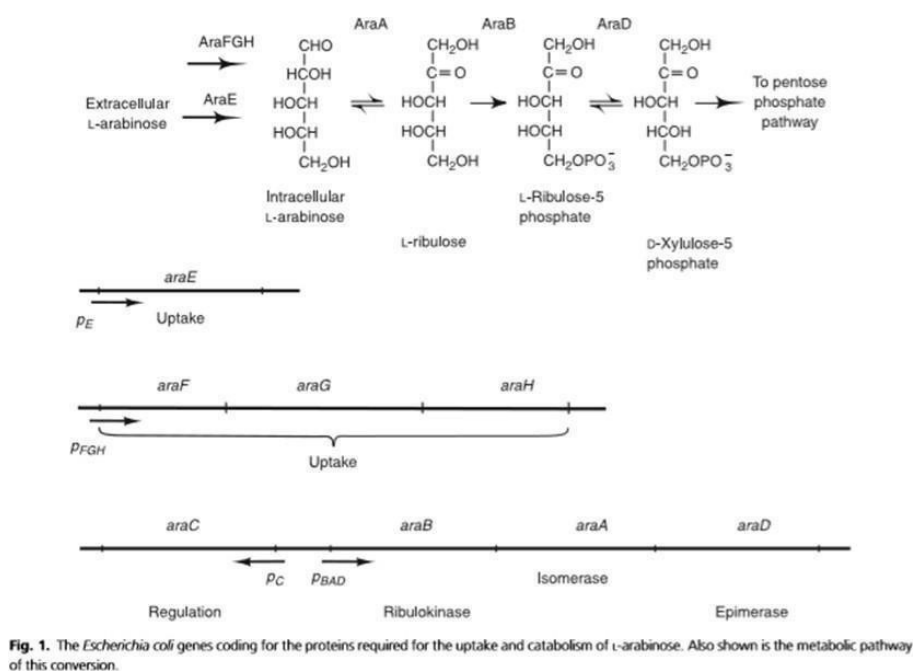


Fig. 1. The *Escherichia coli* genes coding for the proteins required for the uptake and catabolism of L-arabinose. Also shown is the metabolic pathway of this conversion.

Figura 13

La figura de dalt mostra els gens bacterians que codifiquen per les proteïnes requerides per la captació i metabolisme de la L-arabinosa. L'operó L-arabinosa conté els tres gens *araB*, *araA* i *araD*, que són transcrits com un únic mRNA des de el mateix promotor. L'expressió de l'operó està controlada per la proteïna *AraC* i per la proteïna CAP. La proteïna *AraC* actua com a activador (en presència d'arabinosa) i com a repressor, en la seva absència.

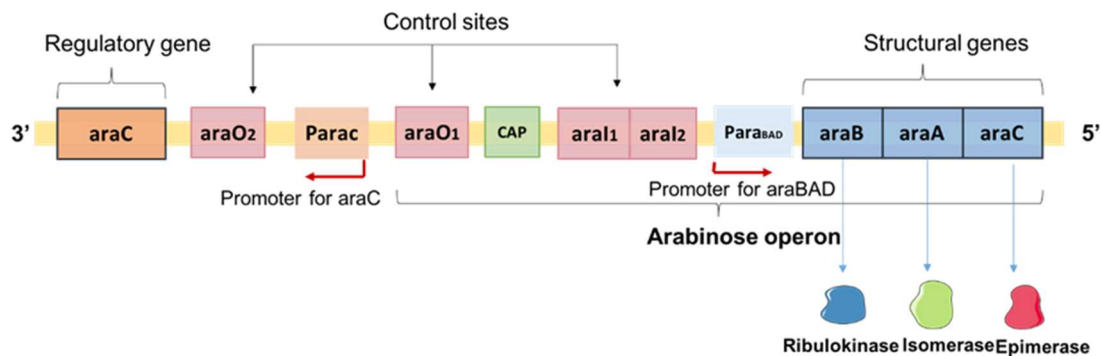
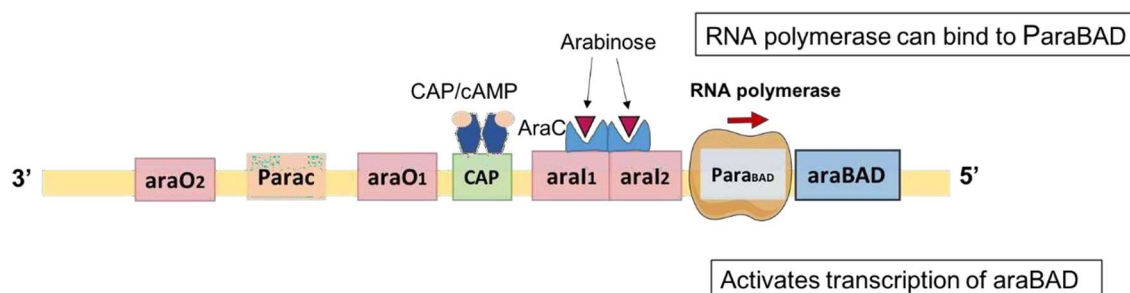


Figura 14 i 15



La figura anterior mostra la situació en la que l'operó està activat, degut a la absència de glucosa ([cAMP] elevat) amb la unió de la proteïna CAP a l'operó i presència de AraC unida a arabinosa. En absència d'arabinosa, AraC dimeritza i actua com un repressor de l'operó, formant un "loop" que bloqueja la unió de la RNA-polimerasa a l'operó arabinosa.

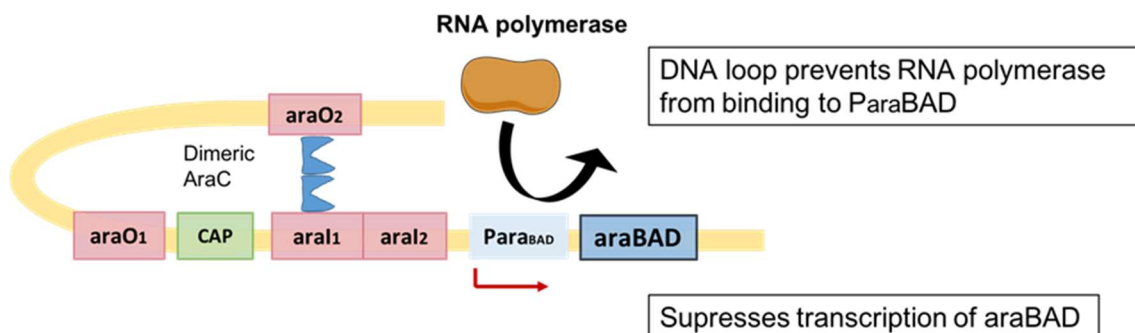


Figura 16

El gen regulador araC, està situat "upstream" de l'operó arabinosa i codifica per la proteïna AraC.

Els gens araBAD i araC són transcrits en direccions oposades des dels seus promotors PBAD i PC, respectivament.

El plasmidi pGLO, conté la regió de DNA que controla l'expressió de araC i araBAD, també la regió codificant de AraC, però la zona codificant de araBAD, ha estat substituïda per la regió codificant de la proteïna GFP.

També conté bla, el gen que codifica per l'enzim β -lactamasa que hidrolitza l'antibiòtic ampicil·lina, amb el que bacteris que tinguin aquest plasmidi, podran créixer en presència d'ampicil·lina al medi de cultiu. ori és un origen de replicació, el que permet la replicació del plasmidi.

6. PART PRÀCTICA

6.1. Introducció

Per respondre i confirmar les hipòtesis inicials he hagut de plantejar i dissenyar un experiment assequible i realista subjecte als meus recursos i possibilitats .

Desenvolupant aquest protocol vaig agafar idees de diferents processos biomèdics i experiments realitzats com a font d'inspiració i vaig reformular la teoria subjecta a la pràctica.

Com a idea principal volia expressar la proteïna β - Amiloide i la proteïna precursora APP en diferents medis, però en un mateix organisme, per tant, expressar-la de manera heteròloga en els bacteris *E.coli*.

Aquest procés ja es du a terme en el cas de la insulina i es fan servir els diferents bacteris com a medi de secreció de la proteïna.

Un cop tinguéssim les dues proteïnes (β - Amiloide i APP) purificades les ajuntaríem en un medi de líquid cefalorraquidi i n'observaríem la seva interacció veient si els efectes de la β - Amiloide són contrarestats per la presència de l'APP o si realment no passa res i l'efecte neuro-tòxic i degeneratiu de la β - Amiloide encara és igual de virulent.

Ara bé, com esmentat prèviament, els organismes unicel·lulars procariotes no realitzen regulacions post- traduccional, i, per tant, com que la malformació en la proteïna β - Amiloide es produeix en un d'aquests processos, el cultiu no es podia realitzar en un bacteri i s'havia de fer en una cèl·lula viva, cosa impossible degut a la immensa quantitat de regulacions ètiques i legals que contempla l'ús de cèl·lules humanes en un experiment.

Davant d'aquest entrebanc, i un cop analitzades les alternatives, vaig decidir realitzar el mateix experiment canviant la proteïna de la β - Amiloide a la GFP ("green fluorescent protein").

Tot i no ser la mateixa proteïna i tenir diferents estructures, el diferents radicals dels aminoàcids que contemplen ambdues estructures comparteixen moltes característiques, així que amb poques modificacions en el protocol prèviament formulat he acabat de conjugar la pràctica d'aquest treball de recerca titulada, finalment, "procés d'expressió d'una proteïna heteròloga GFP", i que, dividida en dues parts clarament identificades, s'assimilarà al màxim a la pràctica inicial podent així aportar una evidència prèvia per, més endavant, dur a terme la pràctica amb la proteïna β - Amiloide i trobar la possible pal·liació a la malaltia que buscava des d'un principi.

Cal comentar que el procediment de la pràctica és ja existent i el protocol ja ve preparat des d'un altre laboratori.

L'expressió heteròloga d'una proteïna s'inicia amb el clonatge de la seqüència d'àcid nucleic que la codifica en un vector

d'expressió. El vector d'expressió consisteix en un fragment d'àcid nucleic (generalment ADN), que conté almenys un origen de replicació que li permet propagar-se a la cèl·lula hoste de destí; un gen que permet seleccionar les cèl·lules que han incorporat el vector (generalment que permet a la cèl·lula hoste resistir a un antibiòtic contra ella), i una seqüència promotora darrere la qual s'introdueix el fragment d'ADN forà que codifica per la proteïna que es vol expressar. La seqüència promotora és la seqüència a la qual s'uneix l'ARN polimerasa per tal d'iniciar la transcripció del gen en qüestió. Es pot fer servir la que més ens interessi, induïble per un compost, o constitutiva (es transcriu sempre al mateix nivell).

En una segona part, el vector d'expressió amb l'ADN forà, és introduït a la cèl·lula hoste. Si l'hoste és un bacteri, generalment s'introdueix mitjançant el procediment conegut com a transformació (parasexualitat bacteriana). En aquest cas el vector utilitzat és un Plasmidi d'ADN.

6.2. Objectius de la pràctica

- L'objectiu general d'aquesta pràctica és assajar un sistema de la proteïna fluorescent verda (GFP, de l'anglès, Green Fluorescent Protein), procedent de la medusa *Aequorea victoria*, en un hoste bacterià (*E. coli*).
- Observar el flux de la informació gènica ADN → ARN → Proteïna → Fenotip (Trets característics).

Una vegada introduït el vector d'expressió amb el gen de la GFP en els bacteris, aquests seran capaços d'expressar la GFP, que podrem observar gràcies a la seva fluorescència sota llum ultraviolada.

A partir de l'obtenció del bacteri transformat amb el plasmidi, es podria purificar la proteïna GFP, fent créixer un cultiu de bacteris transformats amb el plasmidi pGLO en presència d'arabinosa. Després de trencar les cèl·lules, s'aplicaria un protocol de cromatografia hidrofòbica i es podria observar la fluorescència de les diferents fraccions del compost proteic.

Part 1: Expressió de la proteïna heteròloga GFP en bacteri.

El plasmidi que farem servir en la pràctica s'anomena pGLO.

Aquest plasmidi conté, a més d'un origen de replicació i el gen de la GFP, el gen *bla* que codifica per un enzim beta-lactamasa, que dona al bacteri la resistència a l'antibiòtic ampicil·lina; i el gen *araC* que codifica per la proteïna AraC. El gen de la GFP del plasmidi, està controlat per un promotor induïble pel sucre arabinosa.

L'arabinosa s'ajunta amb la proteïna AraC i llavors el complex proteïna AraC-arabinosa activa l'expressió de la proteïna GFP, en facilitar la unió de la ARN polimerasa al promotor que controla l'expressió de la GFP.

L'expressió de la proteïna AraC també depèn de la presència d'arabinosa.

Per tant, les cèl·lules transformades amb el plasmidi pGLO emetran fluorescència si i només si s'afegeix arabinosa al medi de cultiu i s'il·luminen amb llum UV.

El protocol de transformació inclou l'ús de CaCl_2 i calor+ fred anomenat xoc tèrmic, per incrementar l'eficiència de la entrada del plasmidi a les cèl·lules creant uns forats en la paret cel·lular del organisme. De totes maneres, no totes les cèl·lules hauran acceptat el plasmidi pGLO i, per aïllar les cèl·lules que l'han incorporat, es fa la selecció per creixement en plaques que contenen l'antibiòtic ampicil·lina.

Per tant, els bacteris que no incorporin els gens que ens interessin no podran sobreviure ja que no tindran el gen bla i aleshores no resistirà al antibiòtic morint i deixant en el cultiu els bacteris que sí ens interessin.

Material per a la primera part.

0. Placa inicial d'E-Coli de la soca HB101 (1x placa)
1. Medi de cultiu Luria Bertrani (LB)
2. Plaques d'agar (1 LB, 2 LB/AMP, 1LB/AMP/ara) (x4 plaques)
3. Plasmidis pGLO (30 μL) (x1)
4. Loops d'inoculació (x10)
5. Tubs d'Eppendorf (x1)
6. Contenidor amb Gel (x1)
- 7.

Procediment

1. Retolar dos microtubs com a +pGLO i -pGLO. Obrir els tubs i transferir 250 μL de solució de transformació CaCl_2 amb una pipeta micromètrica i col·locar els tubs en gel.
2. Utilitzar un loop estèril per a agafar de 2 a 4 colònies de bacteris de la placa inicial i submergir el loop fins al fons en el tub retolat com a +pGLO. Girar el loop fins a que la colònia quedi dispersa en la solució de transformació. Col·locar el tub al contenidor amb gel i repetir el procés amb el tub de -pGLO.
3. Pipetejar 5 μL del tub que conté la preparació de pGLO i introduir-los dins de la suspensió cel·lular del tub retolat com a +pGLO. Tancar el tub i retornar-lo al contenidor en gel/aigua. Tancar també el tub retolat com a -pGLO. NO s'ha d'afegir DNAsplasmídica al tub retolat -pGLO.
4. Incubar els tubs en gel durant 10 minuts. Assegurar-se d'introduir del tot els tubs en el gel.

5. Durant la incubació dels tubs en gel, retolar les quatre plaques d'agar amb medi LB a la part inferior
 - En una de les plaques LB/amp, retolar + pGLO
 - En la placa LB/amp/ara, retolar + pGLO
 - En una de les plaques LB/amp, retolar - pGLO
 - En la placa LB, retolar – pGLO

6. Xoc tèrmic. Transferir el contenidor de microtubs, que conté els tubs +pGLO i -pGLO, en un bany d'aigua a 42 °C, durant exactament 50 segons ja que sinó els bacteris poden morir si els exposem a més estona. Assegurar-se que els tubs estan ben col·locats en el contenidor i que estan completament en contacte amb l'aigua del bany. Quan els 50 segons han passat, col·locar els tubs novament en gel/aigua. Per optimitzar el procés de transformació, els processos de transferència dels tubs des de 0 °C a 42 °C s'ha de fer el més ràpidament possible i així evitar errors en la transformació del plasmidi.
Tot seguit, incubar els tubs en gel durant 2 minuts

7. Treure els tubs del gel i col·locar-los a la poiana. Obrir un tub i, utilitzant una punta de pipeta estèril, afegir 250 microlitres de medi de cultiu LB a un tub i tornar-lo a tancar. Repetir el procés per l'altre tub, utilitzant una altra punta de pipeta estèril. Incubar els tubs durant 60 minuts al bany d'aigua a 37 °C.

8. Centrifugar durant 30 segons a 5000 rpm i treure 150 µL del sobrenedant, que seran llençats i prèviament esterilitzats en un recipient amb 10% de lleixiu. Resuspendre suaument el contingut dels tubs amb la resta de medi i pipetejar 100 µL de les suspensions de transformació (tub +pGLO) i del control (tub –pGLO) en les plaques d'agar corresponents.

9. Inocular amb un loop diferent en cada placa el pellet de bacteris per tota la superfície i assegurant-se de que no queda líquid sobre l'agar.

10. Segellar les plaques amb tires de parafina i posar-les a la incubadora cap per avall a 37 graus durant 24h.

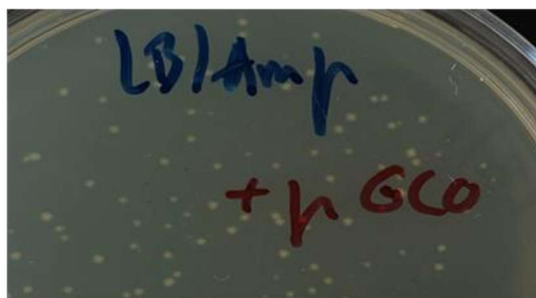
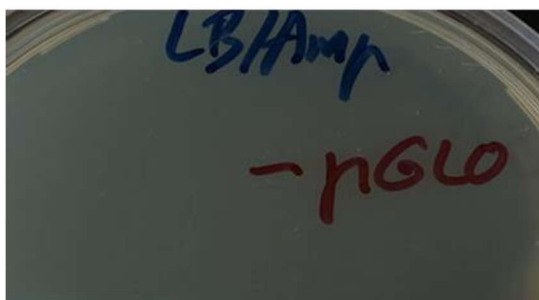
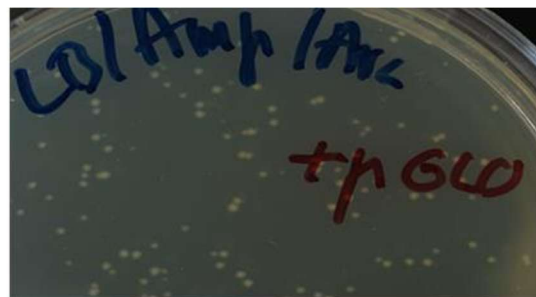
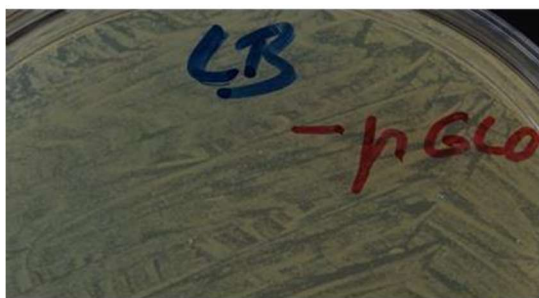
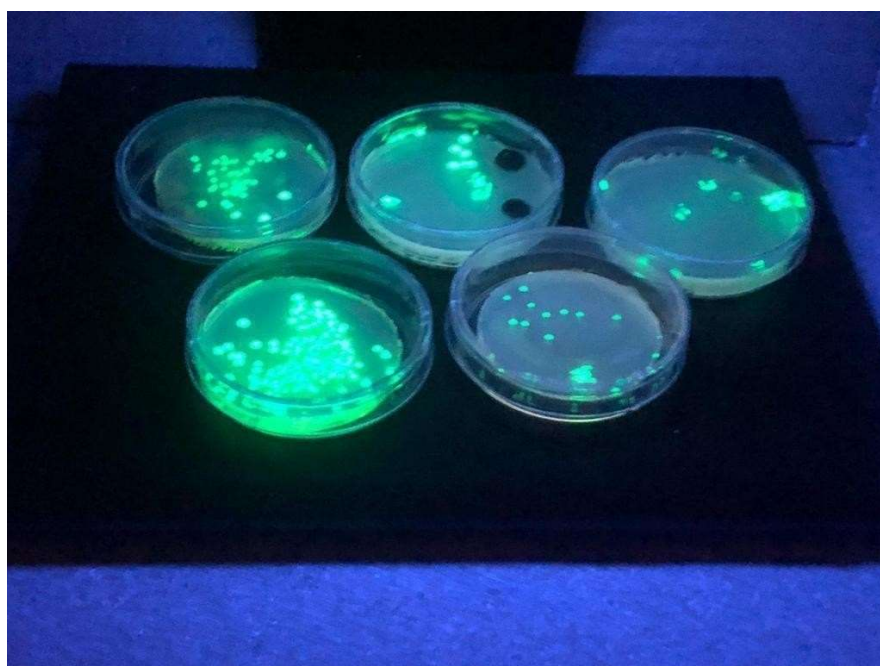


Figura 17 i 18 (abaix)
(Plaques d'agar retolades i incubades)



Part 2: Cromatografia Hidrofòbica (Purificació de la GFP)

Les proteïnes són cadenes polipeptídiques formades per concatenació d'aminoàcids, alguns dels quals són hidrofòbics. La GFP conté diferents zones riques en aminoàcids hidrofòbics, que, col·lectivament, donen a la proteïna un caràcter hidrofòbic general.

A més a més, la GFP és molt més hidrofòbica que la majoria de proteïnes bacterianes.

Per tant, podem utilitzar el caràcter hidrofòbic de la GFP per purificar-la d'altres proteïnes bacterianes més hidrofíliques.

Per a aconseguir aquest pellet pur de proteïnes GFP haurem de realitzar una cromatografia la qual és una tècnica molt potent que ens permet separar proteïnes i altres molècules presents en mescles complexes i que és rutinàriament utilitzada en biotecnologia per tal de purificar proteïnes genèticament modificades.

A la cromatografia, la mescla de proteïnes que es volen separar es passa a través d'una columna que conté partícules esfèriques microscòpiques. Les proteïnes, un cop dins la columna, es mouen cap a la part inferior a través dels intersticis presents entre les partícules esfèriques.

Aquí s'utilitza una columna que conté partícules altament hidrofòbiques.

Aquesta tècnica s'anomena cromatografia d'interacció hidrofòbica (HIC, de l'anglès Hydrophobic Interaction Chromatography). Quan s'aplica el llisat bacterià a la columna, les proteïnes hidrofòbiques (dissoltes en un tampó que conté una elevada concentració de sals) interaccionaran amb les partícules de la columna, mentre que les proteïnes més hidrofíliques, passaran per la columna interaccionant feblement.

Quan la concentració de sal disminueix, les proteïnes hidrofòbiques interaccionen menys amb les partícules de la columna i s'elueixen de la columna, purificades.

La columna cromatogràfica de la pràctica conté una matriu de partícules microscòpiques hidrofòbiques.

Quan la mostra, en un tampó amb alta concentració de sals, es carrega sobre aquesta matriu, les proteïnes hidrofòbiques s'uneixen a la matriu. Com més hidrofòbiques són les proteïnes, més fortament s'uneixen a la matriu i vice-versa.

A mesura que la concentració de sal disminueix, es debilita la unió de les proteïnes hidrofòbiques amb la suport cromatogràfic i comencen a eluir de la columna.

Material per a la segona part

Reactius

Microtubs

Pipetes

Caixa de microtubs

Vas de precipitats amb aigua per netejar les pipetes

Columna de cromatografia Butil-Sepharosa

Vas de precipitats per a material de rebuig

Tampó d'unió (Sulfat amònic 4 M en TE pH 8) (1 vial)

Tampó d'equilibrat (Sulfat amònic 2 M en TE pH 8) (1 vial)

Tampó de rentat (Sulfat amònic 1.3 M en TE pH 8) (1 vial)

Tampó d'elució (TE=Tris 10 mM/EDTA 1 mM, pH 8) (1 vial)

Aparells

Centrífuga

Làmpada de llum UV

Sonicador

Procediment

1. Emprar un cultiu O/N de 4 mL de HB101 transformades amb pGLO, crescudes en LB+Amp (75 µg/mL) + arabinosa (6 mg/mL). Sedimentar les cèl·lules i portar-les com a pellet congelat en els mateixos tubs de 15 mL (en els que s'hancrescut O/N). Llavors afegir 200 µL de tampó TE i resuspendre el pellet pipetejant amunt i avall. Transferir la suspensió a un tub eppendorf de 1.5 mL.
2. Sonicar el contingut del eppendorf en intervals de 3 segons durant 5 vegades i posant el tub en un contenidor amb gel durant 10s entre intervals per a evitar la desnaturalització dels elements del tub.
3. Incubar la suspensió de cèl·lules a temperatura ambient durant 10-15 minuts. Cada 2-3 minuts anar pipetejant amunt i avall per homogeneïtzar la suspensió. Examinar el tub amb la làmpada de llum UV.
4. Col·locar el tub a la centrífuga per tal de sedimentar la fracció insoluble corresponent a les restes bacterianes

per centrifugació durant 10 minuts a velocitat màxima.

5. Durant l'espera que comporta el procés de centrifugació anterior, preparar la columna de cromatografia, deixant que el tampó que conté la columna s'elueixi (aproximadament 3-5 minuts). Quan el menisc arribi abaix, tapar la columna amb el tap (és millor que no s'assequi).
6. Preparar la columna afegint 2 mL del tampó d'equilibrat (TE amb sulfat amònic 2M) a la part superior de la columna. Eluir el tampó de la columna fins que el menisc arribi abaix. Tancar la columna amb el tap. Després dels 10 minuts de centrifugació, treure immediatament el tub de la centrífuga. Examinar el tub amb la làmpada de llum UV. Les restes bacterianes (pellet) haurien de ser visibles al fons del tub. Treure amb una pipeta 250 µL del sobrenedant i posar-los en un microtub nou.
7. Afegir 250 µL del tampó d'unió (TE amb 4M sulfat amònic) al microtub que conté el sobrenedant. Aquests 500 µL seran els que passarem per la columna.
8. Rotular tres tubs col·lectors amb els números 1, 2 i 3. Col·locar a sota de la columna el tub col·lector rotulat com a 1 i utilitzant una pipeta, carregar amb compte els 500 µL del sobrenedant i del tampó d'unió, a la part superior de la columna recolzant lleugerament la punta de la pipeta contra la paret de la columna tal i com s'indica a la figura. Treure el tap de la columna i deixar que passin aquests 500 µL.
9. Examinar la columna utilitzant la làmpada UV. Anotar les observacions. Quan hagin entrat els 500 µL del sobrenedant (i tampó d'unió) i el menisc arribi a la part superior de la columna, afegir amb molta cura 250 µL més de tampó d'equilibrat (TE amb sulfat amònic 2M) i recollir- ho també en el mateix tub #1. Tancar la columna amb el tap . Ara tindrem 0.75 mL al tub #1.
10. La mateixa tècnica de càrrega utilitzada a l'apartat anterior, afegir 750 µL del tampó de rentat (TE amb sulfat amònic 1.3 M). Treure el tap groc i deixar que tot el volum s'elueixi dins del tub #2. Ara tenim 0.75 mL al tub #2.
11. Quan el tampó de rentat arribi a la part superior de la columna, tancar-la. Examinar la columna utilitzant la làmpada UV i anotar els resultats observats. Posar el tub 3 a sota de la columna.
12. Utilitzant una punta de pipeta nova, afegir 750 µL del tampó d'elució (tampó TE sense sulfat amònic). Treure el tap i deixar eluir tot el volum a través de la columna, recollint-lo al tub #3. Novament, observar la columna utilitzant la làmpada UV. Anotar els resultats observats.

13. Examinar els tubs col·lectors 1, 2 i 3 amb la làmpada UV i notar les diferències de fluorescència dels tubs.



Figura 19 i 20
(Productes de la cromatografia)

6.3. Resultats de l'Experiment.

Per a cada tampó carregat a la columna cromatogràfica vam recollir una fracció de mostra diferent, és a dir, vam obtenir 4 mostres que corresponen als 4 tampons diferents:

1. Tampó d'unió (Sulfat amònic 4 M en TE pH 8): conté una elevada concentració de sals que afavoreix la interacció hidrofòbica entre aquestes molècules i la columna. La GFP queda fortament associada a la matriu quan carreguem aquest tampó a la columna ja que la proteïna és de les més hidrofòbiques que té la proteïna bacteriana i presenta zones riques en aminoàcids hidrofòbics. Aquest tampó, per tant, afavoreix la unió de les proteïnes hidrofòbiques i elueix aquelles que no ho són.
2. Tampó d'equilibrat (Sulfat amònic 2 M en TE pH 8): el tampó equilibrat s'afegeix després del d'unió, i aquest, permet tornar a tenir les condicions inicials a la columna cromatogràfica però, amb les proteïnes hidrofíliques de la mostra eluïda.
3. Tampó de rentat (Sulfat amònic 1.3 M en TE pH 8): es redueix la concentració de sal, per tal de deixar només aquelles proteïnes que siguin les més hidrofòbiques i eluint d'aquesta manera les que no tinguin un caràcter hidrofòbic tan fort com el de la proteïna GFP.

4. Tampó d'elució (TE=Tris 10 mM/EDTA 1 mM, pH 8): té la funció d'eluir tot allò que estava unit a la columna cromatogràfica gràcies a que es disminueix considerablement la concentració de sals. Es van eluint poc a poc les poques proteïnes hidrofòbiques que quedaven fins que, desfavoreix completament la forta unió de la GFP i la matriu de la columna.

Per tant el Eppendorf que mostrarà més GFPi per tant a on trobem la proteïna purificada és troba en l'últim tub.

7. CONCLUSIÓNS DEL TREBALL DE RECERCA

Després de mesos i moltes hores de recerca i pràctica he aconseguit concloure aquest projecte amb satisfacció.

De les 3 hipòtesis que m'havia plantejat, ha estat impossible treballar en les dues primeres degut a que les complicacions ètiques i legals que implicava fer el cultiu en una cèl·lula viva impossibilitaven tirar endavant l'experiment. Ara be, la cerca de solucions alternatives i el canvi en el protocol experimental, ha permès, finalment, estudiar i confirmar la tercera, és a dir, que realment si que es poden expressar proteïnes heteròlogues provinents de diferent regne animal en un altre organisme.

De fet, han passat moltes coses des d'aquell primer moment en el que vaig plantejar la idea fins ara que tinc un producte tangible i real. El canvi ha requerit esforç i dedicació perquè ens hem anat trobant amb força inconvenients i reptes que he hagut d'anar enfrontant amb l'ajut de les tutores de TR.

Més enllà de les regulacions ètiques i legals, he hagut d'afrontar la demanda de recursos que el projecte plantejava i la negativa de les entitats a les que em vaig dirigir per fer-se càrrec parcial o totalment dels extra costos.

Aquests dos punts, van provocar una allau de reunions i moltes hores de cerca i reflexió per arribar a relacionar els dos experiments de manera que quadressin amb els objectius i hipòtesis del treball.

Així doncs, el projecte, va donar un gir i vaig començar a treballar perquè aquesta segona oportunitat fos una realitat.

Ara be, no tot han estat entrebancs, aquest treball també està ple de victòries i sorpreses agradables. Des d'haver aconseguit informació anant a conferències privades de la "Barcelona Brain Health Institute", o que uns laboratoris de renom m'enviessin a casa un esquema gegant amb composicions químiques, fins a haver aconseguit amb els meus coneixements bàsics de bioquímica haver dut a terme una expressió heteròloga d'una proteïna i la seva purificació.

Puc afirmar, per tant, que he assolit de forma satisfactòria tots i cadascun dels objectius que m'havia plantejat: tant el comú de tot treball de recerca com és aprendre a fer una investigació coherent i contrastada; com tots els objectius específics d'aquest treball plantejats de bon inici destacant, especialment, el comprendre els mecanismes de síntesi proteica i el desenvolupar un mètode efectiu mitjançant el mètode científic.

Treballar durant tant de temps en una malaltia real, que afecta a tants milers de persones i que, a més, a mi em toca de tant a prop, al principi em provocava una sensació de respecte. No ha estat un tema fàcil de tractar.

Aquest treball, però, m'ha servit per aprofundir i entendre realment el que vol dir patir aquesta malaltia, entendre-la des

de dins i confirmar que qualsevol línia d'investigació, per petita que sembli, aporta esperança a la seva cura. Poder aportar el meu granet de sorra ha valgut molt la pena i la satisfacció que produeix és immensa comparada amb la por i la incertesa que patia al principi.

N'extrec un balanç molt positiu del projecte i m'agradaria poder seguir investigant en la línia del treball per aconseguir acabar amb aquesta malaltia que tanta preocupació provoca a la societat d'avui en dia.

Això només es el principi d'un llarg camí d'investigació i experimentació però que, de ben segur, en uns anys, donarà els seus fruits i farà que l'Alzheimer acabi sent una malaltia amb cura.

BIBLIOGRAFIA

A neurosurgeon's overview the brain's anatomy. (s/f). Aans.org. Recuperado el 30 de septiembre de 2022, de <https://www.aans.org/en/Patients/Neurosurgical-Conditions-and-Treatments/Anatomy-of-the-Brain>

American Health Imaging. (2021, septiembre 20). *Head CT scan: How they help detect Alzheimer's disease.* American Health Imaging. <https://americanhealthimaging.com/blog/head-ct-identify-alzheimers-disease/>

Canet, J. J. (2016, enero 19). *Escherichia Coli: características, patogenicidad y prevención (I).* Blog sobre seguridad alimentaria. <https://www.betelgeux.es/blog/2016/01/19/escherichia-coli-caracteristicas-patogenicidad-y-prevencion-i/>

Chen, G.-F., Xu, T.-H., Yan, Y., Zhou, Y.-R., Jiang, Y., Melcher, K., & Xu, H. E. (2017). Amyloid beta: structure, biology and structure-based therapeutic development. *Acta Pharmacologica Sinica*, 38(9), 1205–1235. <https://doi.org/10.1038/aps.2017.28>

¿Cómo se trata la enfermedad de Alzheimer? (s/f). National Institute on Aging. Recuperado el 30 de septiembre de 2022, de <https://www.nia.nih.gov/espanol/medicamentos-enfermedad-alzheimer>

Diagnosing Alzheimer's: How Alzheimer's is diagnosed. (2022, mayo 7). MayoClinic. <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/alzheimers-disease/in-depth/alzheimers/art-20048075>

El rol de la proteína Tau en las enfermedades neurodegenerativas. (s/f). Gov.ar. Recuperado el 30 de septiembre de 2022, de <https://www.conicet.gov.ar/el-rol-de-la-proteina-tau-en-las-enfermedades-neurodegenerativas/>

Enfermedad de Alzheimer: parte 2. (s/f). Hipocampo.org. Recuperado el 30 de septiembre de 2022, de <https://www.hipocampo.org/alzheimer-2.asp>

Fosforilación oxidativa. (s/f). Khan Academy. Recuperado el 30 de septiembre de 2022, de <https://es.khanacademy.org/science/ap-biology/cellular-energetics/cellular-respiration-ap/a/oxidative-phosphorylation-etc>

González C, J. (2000). Fosforilación en células eucarióticas: Papel de fosfatasa y quinasas en la biología, patogenia y control de protozoosis tisulares y sanguíneas. *Revista Medica de Chile*, 128(10), 1150–1160. <https://doi.org/10.4067/s0034-98872000001000012>

Having a PET scan. (s/f). Alzheimer's Society. Recuperado el 30 de septiembre de 2022, de <https://www.alzheimers.org.uk/research/take-part-research/pet-scan>

Home. (s/f). Alzheimer's Disease and Dementia. Recuperado el 30 de septiembre de 2022, de <https://www.alz.org/>

La fosforilación en la señalización celular es mucho más diversa de lo que se pensaba. (s/f). Edu.ar. Recuperado el 30 de septiembre de 2022, de <http://ingenieria.uner.edu.ar/boletin/index.php/lo-ultimo-en-cyt/343-la-fosforilacion-en-la-senalizacion-celular-es-mucho-mas-diversa-de-lo-que-se-pensaba>

LaMotte, S., & Kane, A. (2020, julio 30). *Prueba de sangre para detectar el alzhéimer está más cerca de ser realidad, revelan estudios.* CNN Español. <https://cnnespanol.cnn.com/2020/07/29/prueba-de-sangre-para-detectar-el-alzheimer-esta-mas-cerca-de-ser-realidad-revelan-estudios/>

Mahoney, D. (2018, enero 31). *CT head interpretation.* Geeky Medics. <https://geekymedics.com/ct-head-interpretation/>

Maragall, F. P. (s/f-a). *Factores de riesgo del Alzheimer: qué son y cómo podemos reducirlos.* Fpmaragall.org. Recuperado el 30 de septiembre de 2022, de <https://blog.fpmaragall.org/factores-de-riesgo-del-alzheimer>

Maragall, F. P. (s/f-b). *¿Podemos prevenir el Alzheimer?* Fpmaragall.org. Recuperado el 30 de septiembre de 2022, de <https://blog.fpmaragall.org/prevenir-alzheimer>

- Murphy, M. P., & LeVine, H., 3rd. (2010). Alzheimer's disease and the amyloid-beta peptide. *Journal of Alzheimer's Disease: JAD*, 19(1), 311–323. <https://doi.org/10.3233/JAD-2010-1221>
- Nerd, N. [NinjaNerdScience]. (2021, abril 6). *Cell biology | Translation: Proteinsynthesis*. Youtube. <https://www.youtube.com/watch?v=80kxa1zApUM>
- Ossenkoppele, R., Tolboom, N., Pijnenburg, Y. A., Lammertsma, A. A., Scheltens, P., & van Berckel, B. N. M. (2011). Amyloid-plaque imaging of the brain using PET. *Nederlands tijdschrift voor geneeskunde*, 155, A2981. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21586182/>
- Pérez Millán, M. I., & Becú-Villalobos, D. (2009). La proteína verde fluorescente ilumina la biociencia. *Medicina*, 69(3), 370–374. http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0025-76802009000400015
- Recognizing Alzheimer's disease - Helpguide.org*. (s/f). Recuperado el 30 de septiembre de 2022, de <https://www.helpguide.org/harvard/recognizing-and-diagnosing-alzheimers.htm>
- Resumen de la transcripción*. (s/f). Khan Academy. Recuperado el 30 de septiembre de 2022, de <https://es.khanacademy.org/science/ap-biology/gene-expression-and-regulation/transcription-and-rna-processing/a/overview-of-transcription>
- Vectores de clonación y expresión*. (s/f). Mhmedical.com. Recuperado el 30 de septiembre de 2022, de <https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1473§ionid=102743892>
- Wikipedia contributors. (s/f). *Fosforilación oxidativa*. Wikipedia, The Free Encyclopedia. https://es.wikipedia.org/w/index.php?title=Fosforilaci%C3%B3n_oxidativa&oldid=145145561
- Yamin, G., & Teplow, D. B. (2017). Pittsburgh Compound-B (PiB) binds amyloid β -protein protofibrils. *Journal of Neurochemistry*, 140(2), 210–215. <https://doi.org/10.1111/jnc.13887>
- (S/f-a). Wiley.com. Recuperado el 30 de septiembre de 2022, de https://faseb.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1096/fasebj.31.1_supplement.91.3
- (S/f-b). Bayer.com. Recuperado el 30 de septiembre de 2022, de

<https://www.bayer.com/es/es/blog/espana-que-es-la-tecnologia-crispr>

Barcelona Brain Health Initiative. (s/f). BBHI. Recuperado el 5 de octubre de 2022, de
<https://bbhi.cat/en/>

Locos por la ciencia. (s/f). Fundaciocatalunya-lapedrera.com. Recuperado el 5 de octubre de
2022, de <https://www.fundaciocatalunya-lapedrera.com/es/locos-ciencia>

IMATGES

Figura 1

“CT Scan .” Geeky Medics , <https://geekymedics.com/ct-head-interpretation/>.

Accessed 19 May 2022.

Figura 2

Extreta de Wikimedia, sense drets d'autor.

Figura 3,4,5 i 6

Estructures 3D extretes de “NCBI” iCn-3D

Figura 7

Fotografia lliure de drets. www.dreamstime.com

Figura 8

(S/f). Wikimedia.org. Recuperado el 3 de octubre de 2022, de

https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/8/8d/Conjugatio_n-es.svg/300px-Conjugation-es.svg.png

Figura 9

Fotografia lliure de drets. www.dreamstime.com

Figura 10

Fotografia lliure de drets. www.dreamstime.com

Figura 11

“Enzimas De Restricción .” Khan Academy, 2018, <https://es.khanacademy.org/science/biology/biotech-dna-technology/dna-cloning-tutorial/a/restriction-enzymes-dna-ligase>. Accessed 12 Aug. 2022.

Figura 12

Fotografia lliure de drets. www.dreamstime.com

Figura 13, 14 i 15

Extret de l'article: "AraC protein, regulation of the L-arabinose operon in Escherichia coli, and the light switch mechanism of AraC action." Schleif, R. FEMS Microbiol Rev. 2010 Sep;34(5):779-96.

Figura 16

Imatge d'elaboració pròpia: La figura de mostra com els bacteris transformats amb el plasmidi pGLO poden créixer en LB+Amp.

Figura 17

Figura d'elaboració pròpia: A la figura observem les colònies de bacteris modificats i per tant fluorescents.

Figura 18

Figura d'elaboració pròpia.

Figura 19 i 20

Figures d'elaboració pròpia: Mostren els diferents productes que s'han obtingut de la cromatografia hidrofòbica.