

# 9. GAIA: POLIMORFISMOEN DETEKZIO TEKNIKAK

Polimorfismoak detektatzeko bi teknika nagusi daude: azido nukleikoen hibridazioa eta murrizketa endonukleasak.

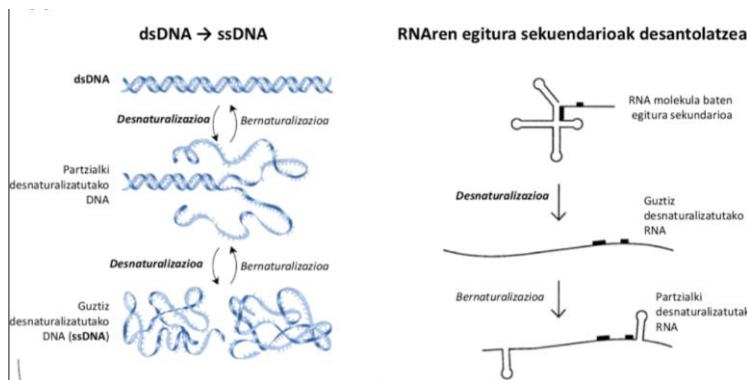
## 1. Azido nukleikoen hibridazioa

Jatorri desberdineko azido nukleikoen arteko parekamendua da, eta hibridazioa gerta dadin bi baldintza bete behar dira:

1. Azido nukleikoen bi harizpiak **osagarriak eta antiparaleloak** izatea. Hala ere osagarritasunak ez du %100 izan behar, baina osagarritasuna zenbat eta handiagoa izan, eraginkorragoa izango da hibridazioa. Hurrengo hibridazioak (parekamenduak) gerta daitezke:
  - DNA-DNA
  - DNA-RNA
  - RNA-RNA
2. Azido nukleikoen hibridazioaren **mekanismoa**:

1. **Desnaturalizazioa**: desnaturalizazioa ematen den baldintzen arabera, hau da, partzialki edo guztiz ematen den, bernaturalizazioa gertatuko da edo ez. DNA desnaturalizatzean nukleotidoen hidrogeno loturak apurtzen dira. Modu ohikoena eta laborategian gehien erabiltzen dena, eragile fisikoak (beroa) dira, merkeenak baitira. Hala ere, eragile kimikoak ere erabil daitezke (urea, detergenteak, formamida, formaldehidoa, pH aldaketak...).

Adibidez, DNA bat 100 gradutan berotzen bada, molekula hori ezingo da bernaturalizatu.

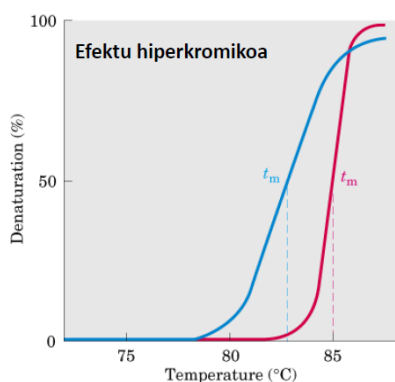


DNA edo RNA desnaturalizatuta dagoen edo ez jakiteko, A260 neurtu beharko dugu. Temperatura igo ahala, A260 handitu egingo da, izan ere, zenbat eta

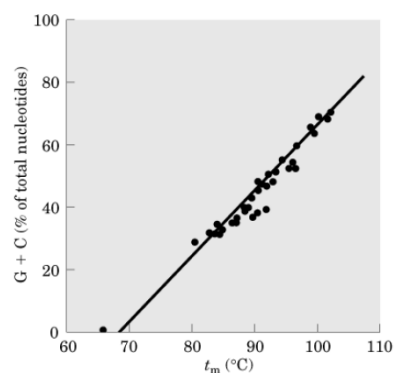
gehiago desnaturalizatu, base nitrogenatuak kanporantz begira geldituko dira, eskuragarriago, eta ondorioz, hobeto absorbatuko dute argia.

$t_m$ : desnaturalizazioaren %50a lortzeko behar den tenperatura. Zenbat eta C-G eduki altuagoa izan, orduan eta altuagoa izango da  $t_m$ ; izan ere, guanina eta zitosinaren artean hiru hidrogeno zubi daude, eta beraz, bero gehiago beharko da lotura hau apurtzeko (sendoagoa delako).

**A260 neurtuz behatu DNAREN eta RNAREN desnaturalizazioa**

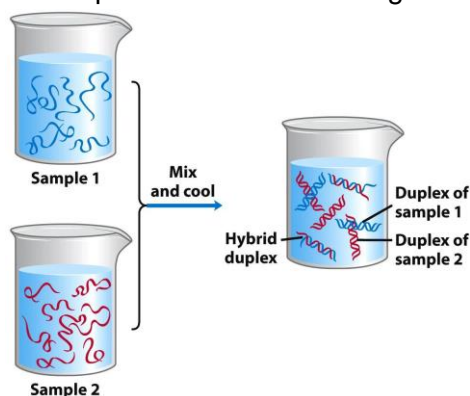


**DNAREN GC edukina handiagoa den neurrian  $T_m$  altuagoa da**



$T \uparrow \rightarrow A_{260} \uparrow$  & biskositatea  $\downarrow$

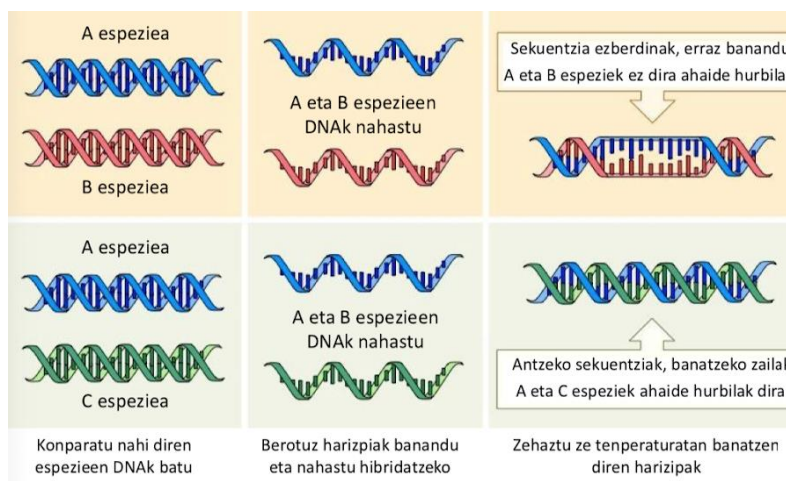
2. **Hibridazioa:** behin laginak desnaturalizatuta daudela, laginak nahastu eta hoztu egin beharko dira (desnaturalizatzeko beroa erabili baduzu). Gerta daiteke azido nukleikoak elkarren artean hibridatzea. Askotan, hibridazioa emateaz gain, jatorrizko parekamenduak emango dira (hau da, jatorrizko harizpian eman diren parekamenduak emango dira berriz ere).



Hurrengo faktoreek errazten dute harizpien parekamendua:

- Tenperatura baxuak.
- Denbora handiak.
- Katearen luzeera handiak.
- Osagarritasuna edo homologia handiak.

DNA-DNA hibridazioak espezien arteko harreman filogenetikoak ezagutzeko erabili izan dira. Ebolutiboki zenbat eta gertuago egon, hibridazioa eraginkorragoa izango da.



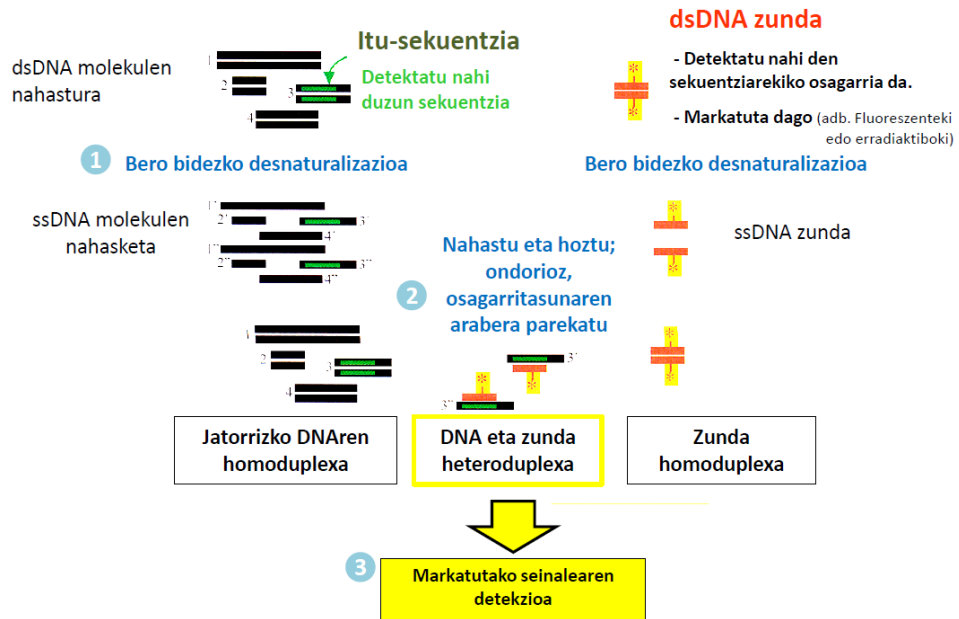
Baina normalean guk hibridazioaren printzipioa **sekuentzia espezifikoak detektatzeko** erabiltzen dugu:

Zunda bat diseinatzen da, DNA molekula bat bi harizpiekin (oso egonkorra delako). Sekuentzia laburrak izaten dira (8-10 nukleotidoetakoak) eta guk identifikatu nahi dugun sekuentziarekiko osagarria izan behar du. Markatuta egongo dira fluoreszente batekin. Gainera, zunda bat aldi berean behin baino gehiagotan erabil daitezke fluoreszente batekin baino gehiagorekin (zunda batean bi sekuentzia desberdin marka daitezke aldi berean) tindatzen baduzu. Gero, fluoreszentzia desberdinak irakurtzeko makina desberdinak erabiliz parekamendu desberdinak ikus daitezke.

Hibridatu baino lehen ezinbesteko pausu bat gertatu behar da, desnaturalizazioa. Behin desnaturalizazioa gertatuta dela gure lagina zundarekin nahastuko dugu. Osagarritasuna badago bi hauen artean hibridazioa gertatuko da eta hiru hibridazio mota gerta daitezke:

- Jatorrizko DNA-ren homoduplexa.
- DNA eta zunda heteroduplexa.
- Zunda homoduplexa.

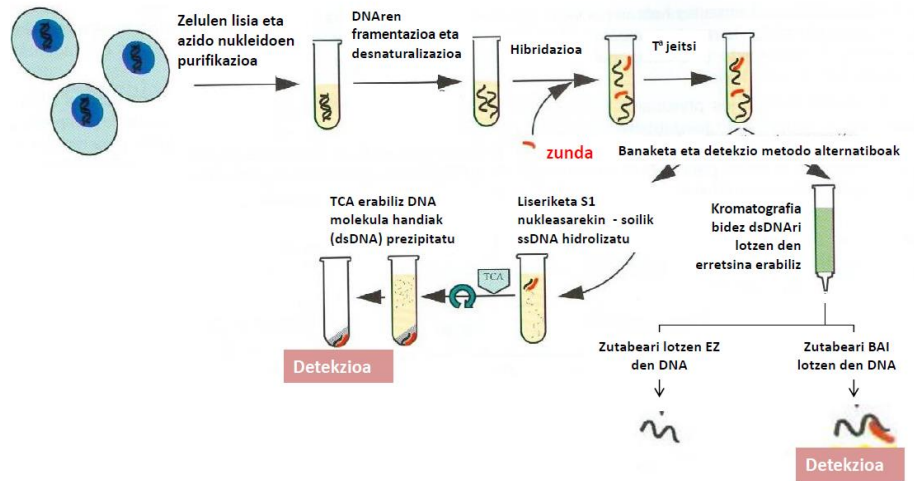
## Hibridazioaren printzipioa sekuentzia espezifikoak detektatzeko



### Hibridazio metodoak:

1. **Hibridazioa fase likidoan:** zelulak apurtu, lisatu (modu kontrolatuan) eta azido nukleikoak purifikatuko ditugu. Ondoren, DNAREN fragmentazioa (DNA-ren apurketa modu deskontrolatuan, ultrasoinuekin, esaterako) eta desnaturalizazioa egingo da. Behin DNA desnaturalizatuta daukagula, zunda txertatuko da. Gero, hibridazioa gertatzeko tenperatura jeisten dugu, eta DNA eta zundaren artean hibridazioa ematen da. Orain bi aukera edukiko ditugu hibridazioa eman den edo ez jakiteko:
  - a. Alde batetik hibridatu diren azido nukleikoak edukiko ditugu; eta bestetik hibridatu ez direnak. S1 nukleasak harizpi bakarreko azido nukleikoak degradatzen ditu, eta modu honetan hibridatu ez diren azido nukleikoak degradatzea lortzen dugu. Honi esker, gure laginean, hibridatutako azido nukleikoak soilik edukiko ditugu. Gure prezipitatu zunda detektatu badaiteke, bertan hibridazioa eman da. Ez baldin badugu detektatzen, gure DNA eta zundaren artean ez da hibridaziorik eman.
  - b. dsDNA-ri lotzen den erretsina erabiliz, kromatografia egin eta ondorioz, zutabeari lotzen ez den DNA eta zutabeari lotzen zaion DNA lortuko dugu. Zutabeari lotutako DNAn egingo dugu detekzioa.



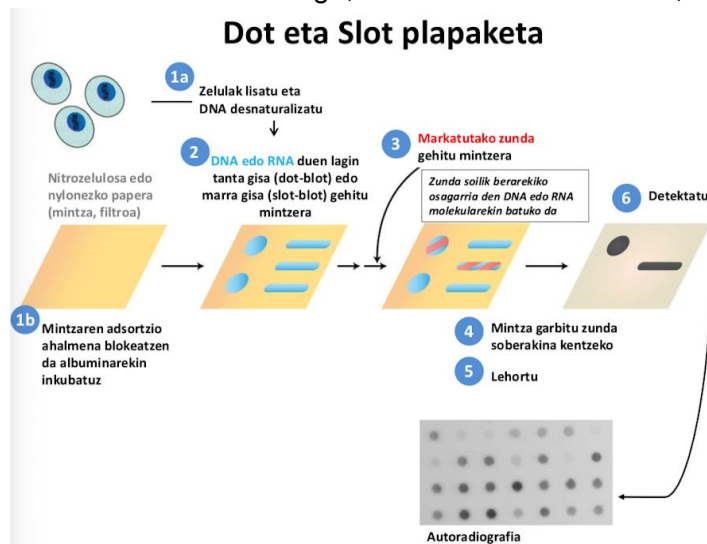


TCA = Azido trikloroazetikoa

2. **Hibridazioa fase solidoan:** hau da laborategian gehien erabiltzen dena. Hibridazioa fase solidoan emateko teknika desberdinak erabili daitezke:

- a. **Dot eta Slot plapaketak:** Teknika hau RNA edo DNA aztertzeko erabiltzen da, bana bereziki DNA aztertzeko. Lagin bat dugu, zelulak lisatu, DNA erauzi eta desnaturalizatu egingo dugu. Lagina mintz batean adieraziko dugu, **tanta-gis (Dot-blot) edo marra gris (Slot-blot)** bezala. Orain, mintzera markatutako zunda gehituko dugu, zunda soilik berekiko osagarria den DNA edo RNA molekularekin batuko da. Ondoren mintza garbitu behar da, zunda soberakina kentzeko. Azkenik, mintza lehortzen da eta guri interesatzen zaigun sekuentzia detektatzen dugu.

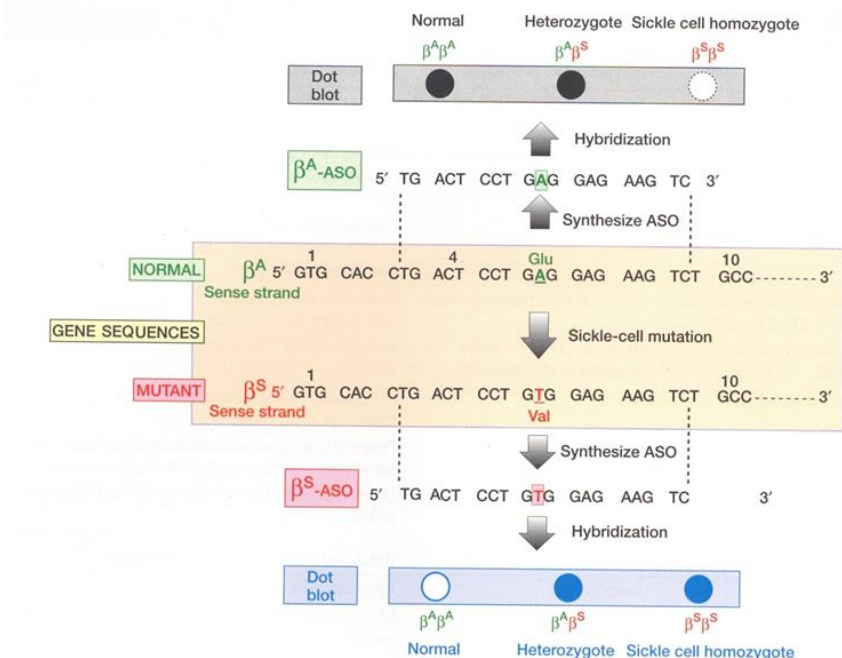
Teknika semikuantitatiboa da: alde batetik guk aztertu nahi genuen sekuentzia badagoen edo ez dagoen adierazten dizu, eta gainera, intentsitateak laginean dagoen sekuentziaren kantitatea adierazten digu, modu kuantitatibo baten, noski.



1. ASO dot plapaketa: dot eta slot plapaketen bariante bat da. Zunda alelo espezifikoa da (ASO, Allele Specific Oligonucleotide). **Espezifikoki** alelo osasuntsuarekin hibridatuko den zunda bat eta alelo mutatuarekin hibridatuko den beste zunda bat diseinatu behar dira. Hibridazioa zunda osasuntsuarekin eman bada, esan nahi du pertsona hori homozigotoa dela, eta alelo biak osasuntsuak dituela, hau da, gaixotasuna sortzen duen aleloaren eramailea ere ez dela.

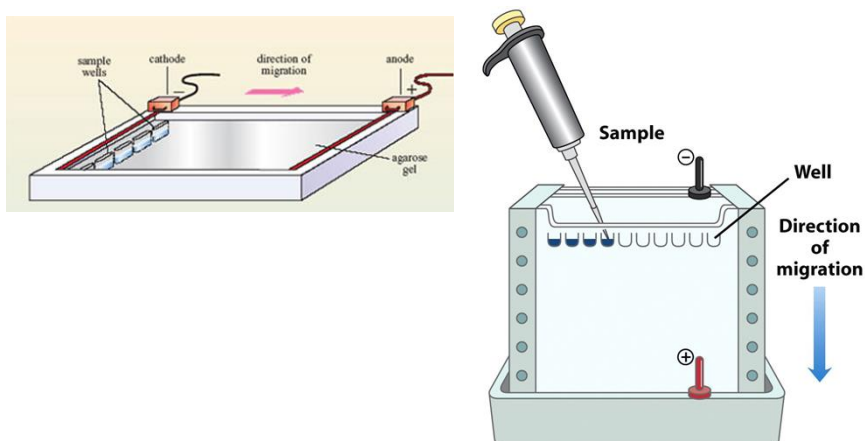
Aldiz, zunda osasuntsuarekin eta gaixoarekin hibridatu bada, pertsona hori heterozigotoa izango da, alelo bat gaixoa eta bestea osasuntsua izango du, beraz eramailea da. Azkenik, azken pertsonak hibridazioa soilik zunda gaixoarekin eman bada, pertsona hori homozigotoa izango da, eta bi aleloak gaixoarenak izango ditu.

Irudian ASO Dot Plapaketa irudikatzen da, anemia faltziformea diagnostikatzeko adibidea da irudikoa.



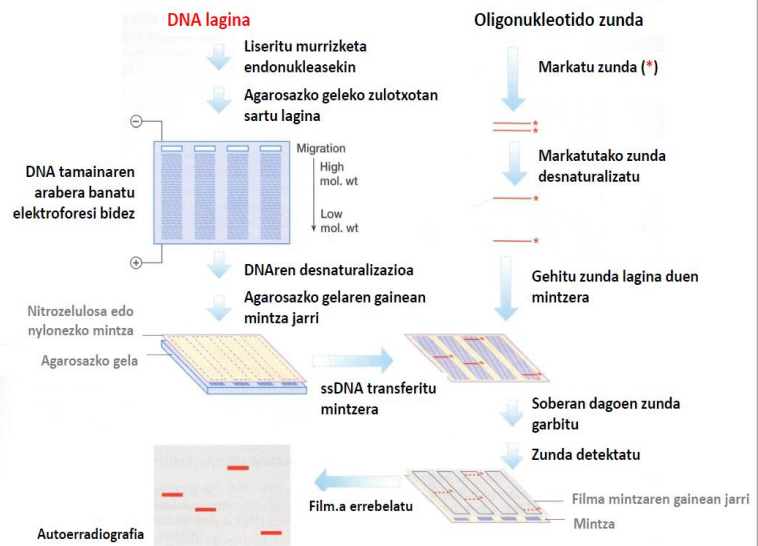
**Southern eta Northern Plapaketek ezaugarri komun** asko dituzte: Behin DNA zeluletatik erauzitakoan lagina elektroforesi bitartez banatzen da. Elektroforesia egin ahal izateko azido nukleikoak alde zuzenetik **liseritu** egin behar dira, bestela laginak ez du gelean migratuko. RNA-ren kasuan ez da beti liseritu behar, DNA-rekin konparatuz, luzera askoz txikiagoa duelako.

**Elektroforesian**, potentzial elektrikoaren bidez kargatutako molekulak tamainaren arabera mugitzen dira. Lagina geletan zulo txiki batzuetan sartzen dugu, eta lagina gelean zehar mugituko da polo negatibotik positibora; azido nukleikoak karga negatiboa dutelako. Polimeroak (gelak) molekulen mugikortasunari erresistentzia ezartzen dio.



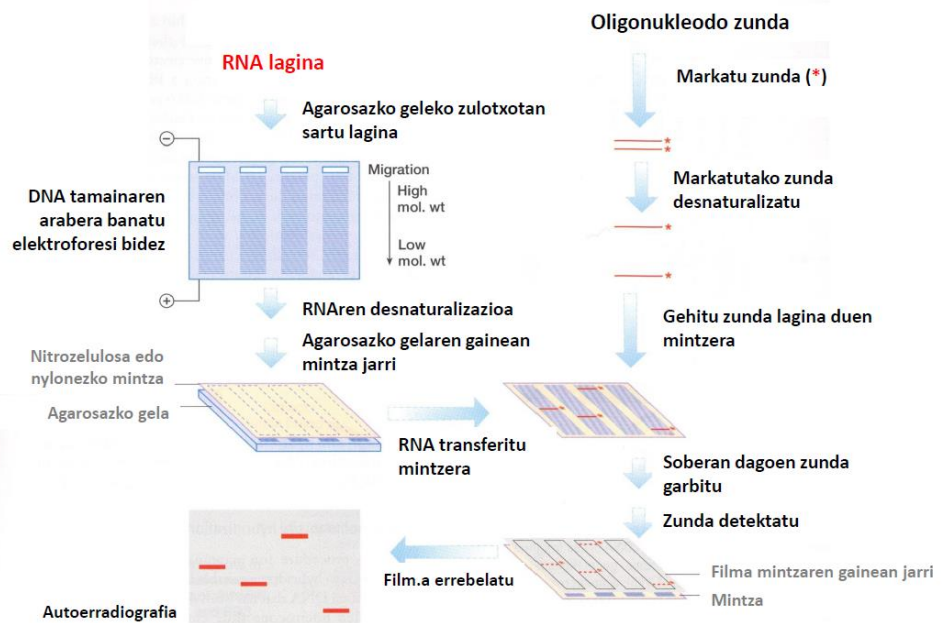
- b. Southern plapaketa:** DNA lagina aztertzen da. DNA erauzi eta liseritu egiten da, murrizketa endonukleasa jakin batzuekin. DNAk polo negatibotik positibora migratuko du, azido nukleikoek karga negatiboa dutelako. Distantzia handiena egiten duen lagina, tamaina txikienekoak izango dira, eta gutxien migratzen duena handiena. Behin migrazioa egiten dela, DNA desnaturalizatu egiten da gelean bertan (ez da beroa erabiliko desnaturalizatzeko, gela urtu egingo litzatekelako). Ondoren, agarosazko gelaren gainean mintz bat (nitrozululosa edo nylonezkoa) jartzen da. Korrante elektriko baten laguntzaz DNA guztia mintzera transmititzen da, DNAREN transferentzia deitzen zaio honi. Desnaturalizatutako zunda gehitzen da, eta mintzean jartzen da, integratzen utziz. Ondoren, garbitu egiten da lotu ez dena kentzeko. Azkenik, zunda detektatzen da, filma errebelatuz eta honen interpretazioa egiten da, honela zundarekin elkartu diren nukleotidoak non dauden detekta daitezke edo sekuentzia jakin bat ze laginetan dagoen jakin dezakegu.

### Southern Plapaketa



c. **Northern plapaketa:** aztertzen den lagina RNA da. RNA erauzitakoan kasu batzuetan liserituko da, eta beste batzuetan ez. Beste prozedura osoa Southern Plapaketaren berdina izango da. RNA desnaturalizatu behar dugu, nahiz eta tipikoki harizpi bakarrekoa izan. Desnaturalizatu ondoren, agaroszko gelaren gainean mintza jartzen da. Jarraian RNA mintzera transferitzen da. Mintzera zunda gehitzen da eta ondoren errebelatu egiten da, ondorioak atera ahal izateko.

### Northern Plapaketa



SOUTHERN ETA NORTHERN PLAPAKETEN ARTEKO DESBERDINTASUNAK:

	<b>Southern Plapaketa</b>	<b>Northern Plapaketa</b>
Detektatzen den <b>azido nukleikoa</b>	DNA	RNA
Elektroforesia baino lehen azido nukleikoaren <b>liseriketa</b>	Bai, murrizketa endonukleasen bidez	Batzutan
Transferentzia baino lehen azido nukleikoaren <b>desnaturalizazioa</b>	Bai. dsDNA izatetik ssDNA izateko	Bai. Gehienetan RNA harizpi bakarrekoa den arren, egitura sekundarioak izan ditzakete ta horrek desnaturalizatu egin behar dira
<b>Zertarako?</b>	- DNA sekuentzia espezifiko bat detektatzeko (ezabaketak, txertaketak...)	- Gene baten <b>adierazpen maila detektatzeko</b> - Gene beretik eratorritako <b>isoforma ezberdinak detektatzeko</b>

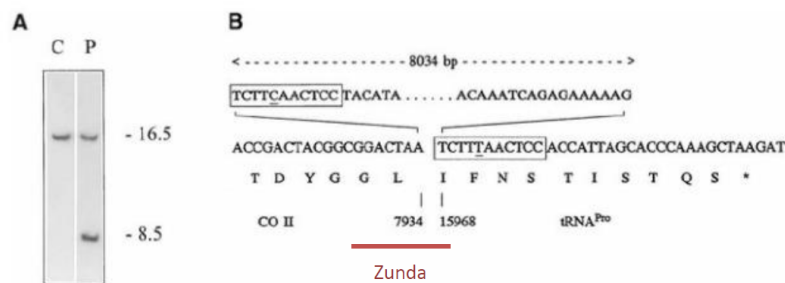
Southern plapaketaren erabilpen bat, Pearson sindromea detektatzea da, izan ere, sindrome hau eragiten duen delezioaren mtDNA n identifikatzeko erabiltzen da:

Gaixotasuna autosomiko gainartzailea izango litzateke, izan ere, gaixoak alelo mutatu bakarra izanda gaixotasuna garatu du.

Adibidea, southern plapaketa

*Pearson sindromea eragiten duen delezioaren detekzioa mtDNA n*

*Pearson sindromea eragiten duen delezioaren detekzioa mtDNA n*



C, osasuntsua  
P, Pearson sindromeduna

DOI: 10.1038/sj.ejhg.5200444

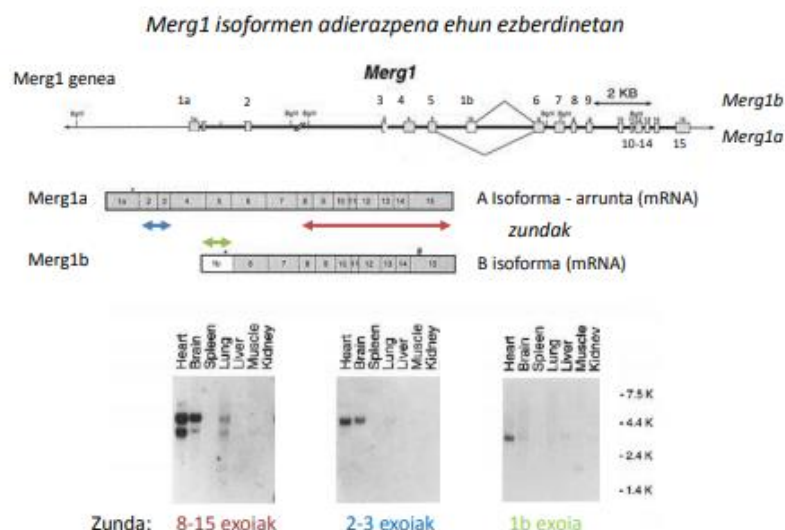
Adibidea: northern plapaketa. Kasu honetan hiru zunda erabili behar dira, eta zunda bakoitzak eremu bat ezagutuko du, zein isoforma transkribatzen den detektatzeko ehun desberdinetan. Zunda gorriak A eta B isoformak detektatzen ditu baina A B baino luzeagoa denez, gutxiago migratuko du eta gorago

geldituko da. Adibidez, bihotzean argi ikusi daiteke bi isoformak transkribatu direla; baita burmuinean eta biriketean ere. Bigarren zundaren bitartez (urdinaren bitartez), A isoforma non transkribatzen den adierazten da, eta azkenik, hirugarren zundaren bitartez (berdearen bitartez) B isoforma non transkribatzen den jakingo dugu.

Zunda bakoitzak ematen duen intentsitatea bere ezaugarri bereizgarri bat da, beraz, ezin da zunda desberdinek ematen duten seinalearen intentsitateak konparatu, bai ordea zunda beraren seinaleen intentsitateak.

Hemen kontrola falta da emaitzak ondo interpretatzeko, honetarako gene konstitutiboak (modu erregularrean etengabe transkribatzen diren geneak dira, ehun guztietan transkribatzen direnak) erabiltzen dira. Askotan erabiltzen den gene konstitutiboa aktinarena da. Beraz, kontrol moduan aktina jartzen badugu eta lagin guztietan aktinaren presentzia baldin badago, A eta B isoformen transkripzioaren konparaketa egin dezakegu. Aldiz, aktinaren kontrola ere ez baldin badago, A eta B isoformak transkribatzen ez badira, beharbada lagina kargatzerakoan edo akatsen bat egin dugulako da, eta ez benetan ehun horretan isoforma horien transkribatzen ez direlako.

Adibidea, northern plapaketa



**Oharra (ariketetarako):** aleloak DNA mailako kontzeptu bat da. Isoformak berriz, RNA edo proteina mailakoa.

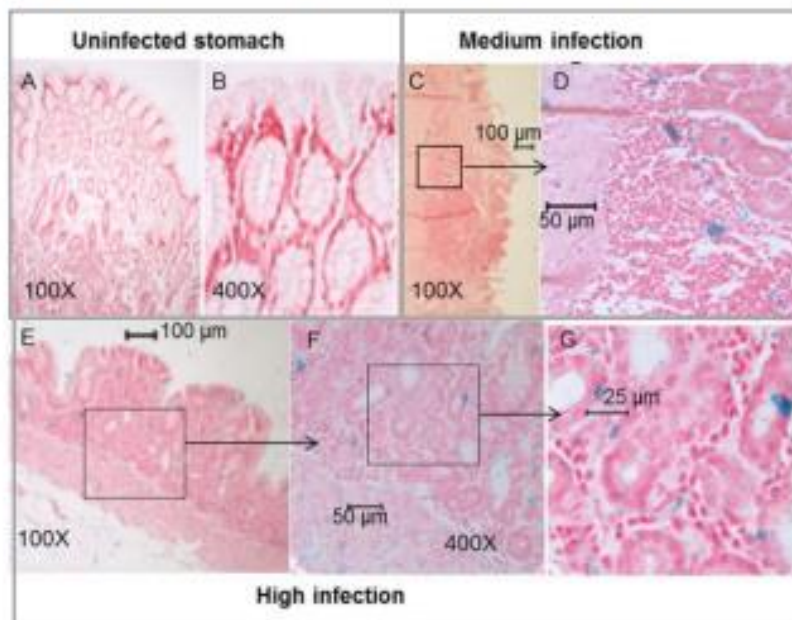
3. **In situ hibridazioa:** azido nukleiko zehatz baten lokalizazioa zehazteko erabiltzen da. Ehunean edo zelulan bertan ikusiko dugu ea interesatzen zaigun sekuentzia dagoen edo ez. Zunda DNA edo RNA izan daiteke. *In situ* hibridazioaren erabilpenak ehunetan edo zeluletan



- Birus edo bakterio bidezko infekzioak antzemateko.
- Ehun batean bertan, gene adierazpena behatzeko.

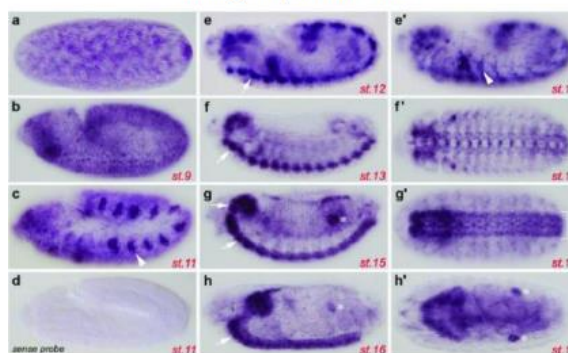
Adibidez: *in situ* hibridazioa ehunetan egin zen *Helicobacter Pylori* bakterioaren detekzioa (zehazki 16S RNA detektatzeko) egiteko gizakien ehun gastrikoan.

*H. Pylori* bakterioaren detekzioa gizakiaren ehun gastrikoan



Beste adibide bat: dLRCH genearen transkripzio patroia *Drosophila* euliaren enbriogenesi prozesuan zehar. Argi dago gene berdinen transkripzio patroia zerao aldatzen dela garapen enbrionarioko fase desberdinetan (morez ikusten dena).

*dLRCH* genearen transkripzio patroia *Drosophila* euliaren enbriogenesi prozesuan zehar

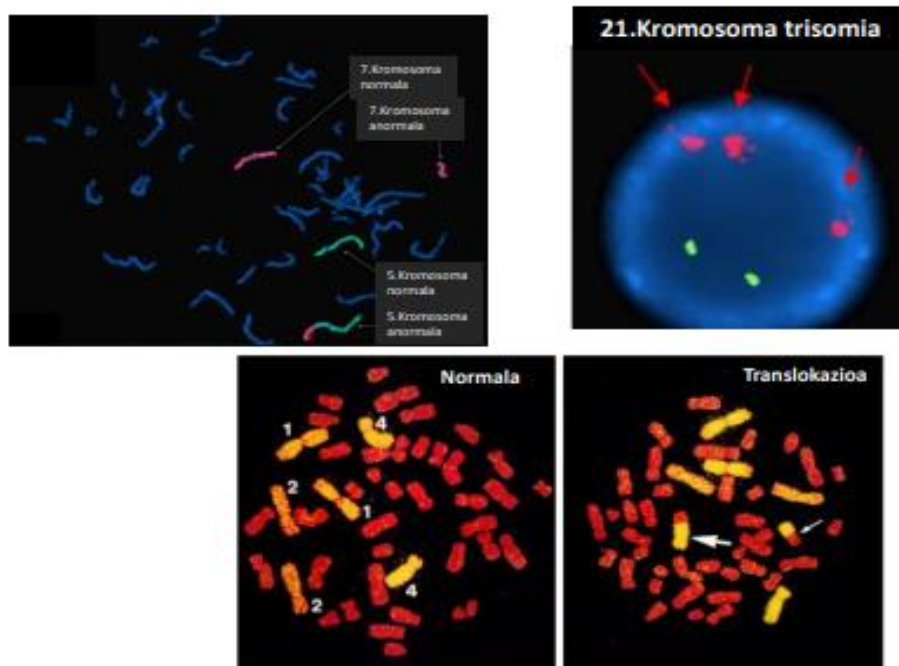


*In situ* hibridazioaren erabilpenak kromosometan (zunda DNA izanik):

- FISH (Fluorescent “in situ” hybridization): Kromosomak DNA zunda fluoreszenteekin markatzen dira, sekuentzia jakin bat detektatu eta lokalizatu ahal izateko. Adibidea irudian:



**FISH: Aberrazio kromosomikoak detektatzeko**



**4. Mikroarray-ak:** aldi berean ehunka edo milaka sekuentzia ezberdin detektatzeko erabiltzen dira:

- Baldintza konkretu batean, zelula transkriptoma zien den ezagutzeko (ordenagailu praktketan egindako adibidea).
- Polimorfismoak aztertzeke.
- Mozt-itsasketa alternatiboaren ondorioz ekoizten diren mRNA produktuak detektatzeko... eta beste hainbat gauzetarako.

a. DNA mikroarrayak:

Konparatu nahi diren bi egoeretatik mRNA erazuten da; lagin bakoitzean, organismo horretan baldintza berezi horretan



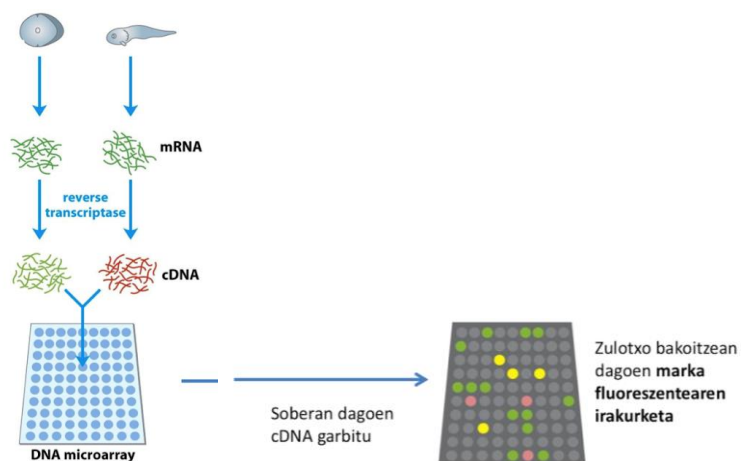
adierazten diren geneen transkriptoak (transkriptoma) egongo dira.

Alderantzizko transkriptasaren laguntzaz eta fluoreszentekei markatutako dNTPak erabiliz mRNA cDNA (DNA osagarria da, mRNAren kopia, laborategian sintetizatzen da alderantzizko transkriptasaren bidez) bihurtzen da. Lagin bakoitzarentzako fluoroforo ezberdin bat erabiliko da.

Markatutako bi cDNA motak gehituko dira mikroarray-ra. Zulotxo bakoitzean gene bati dagokion DNA egongo da. Osagarritasunaren arabera, gehitutako cDNA zulotxotako DNArri lotuko da edo ez.

Arrayaren bitartez posible da gene beretik eratorritako isoformak lortzea.

Demagun berdez lagin osasuntsua adierazten dela, eta gorritz minbizi lagina. Zulotxo batean soilik berdea detektatzen bada, putzu horretan dagoen zundarekin transkripzio bat gailendu da, hau da, aztertzen ari garen genearen adierazpen maila handiagoa dela zelula osasuntsuetan minbizi zeluletan baino. Horia badago, biak maila berean transkribatu, hibridatu, direla esan nahi du, hau da, aztertzen ari garen genearen adierazpen maila bi laginetan parekoa dela. Zulotxoan soilik gorria badago, minbizi laginean transkripzioa gailendu dela esan nahi du, hau da, aztertze ari garen genearen adierazpen maila askoz handiagoa dela minbizi zeluletan zelula osasuntsuetan baino. Genearen kontzentrazioaren arabera intentsitatea desberdina da.



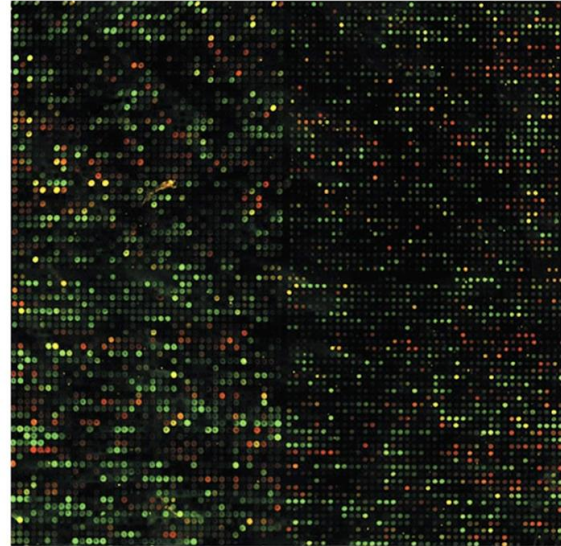
Adibidez:

*Adb. Hazkuntza arruntean (berdez) dauden legamien transkriptoma vs esporulazioan (gorriz) dauden legamien transkriptoma*

•DNA mikroarray.etako datuak software bereziekin aztertu behar dira

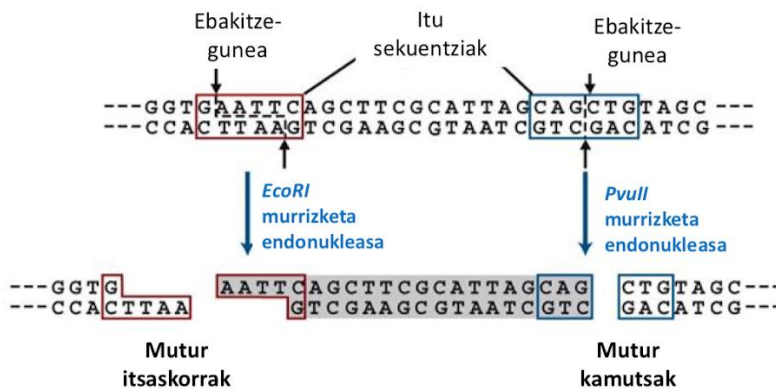
*S. cerevisiae*.ren 6200 generen analisia:  
Orban 1 ↔ Gene 1

- Orban berdea → hazkuntza arruntean gehiago adierazten diren geneak
- Orban gorriak → Esporulazioan gehiago adierazten diren geneak
- Orban horiak → bi egoeretan berdina adierazten diren geneak



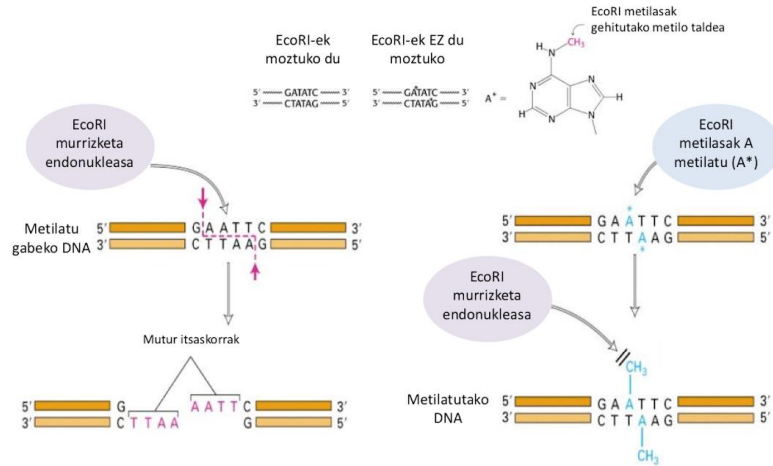
## Murrizketa endonukleasak

Sekuentzia palindromikoak ezagutu (bi harizpietan sekuentzia berdina norabide desberdinetan) eta mozten dituzte. Mozketaren ondorioz, mutur itsaskorrek edo kamutsak utz ditzakete. Bi muturren moten arabera desberdina da, itsaskorra adibidez klonaziorako erabilgarria da.

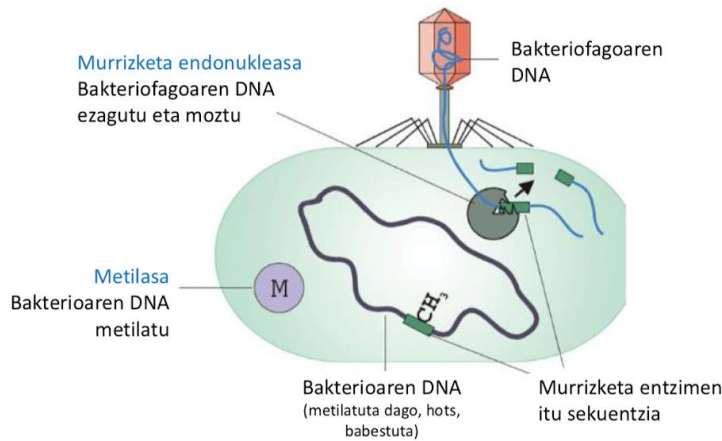


### 1. Bakterioen babes sistema: murrizketa-eraldaketa sistema:

Bakterioen babes sistema da, patogenoetatik babesteko erabiltzen dute. Bakterioen DNA metilatuta dago (metilasa batzuen ondorioz), endonukleasek beraz ez dute ezagutzen. Adibidez, *EcoRI* endonukleasa bat da, soilik sekuentzia palindromikoa ezagutuko duena metilatuta ez badago.



Bakteriofagoaren DNAk bakterioa inbaditu nahiko du, beraz, DNA sartu egingo du baina bakterioaren endonukleasak moztu egingo dute DNA hori, ez dagoelako metilatuta eta bakterioarena bai, inbasioa ekiditen dute honela.



Sistema hau, erabilgarria dela ikusi zen biokimikan eta gure mesedetan erabiltzen da gaur egun. Bioteknologian oso erabiliak diren ehunka murrizketa endonukleasa daude. Batzuk naturalak dira, bakterioetatik eratorritakoak.

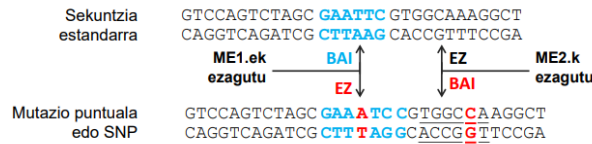
**RFLP= Restriction fragment length polymorphism:**

Murrizketa entzimak DNA mozten dutenean luzera jakineko produktuak ematen dituzte. Polimorfismoen edo mutazioen ondorioz mozketa bidez lortzen diren zatikiek luzera desberdinak izan ditzakete, mutazioek edo polimorfismoek DNA sekuentzian mozketa patroiz ezberdinak sortarazten baitituzte.

RFLP bidez zatikien luzerak detektatu daitezke.

Murrizketa fragmentuen tamaina desberdina izateko bi gauza gertatu behar dira:

1. Entzimek ezagutzen dituzten DNA sekuentzietan aldaketak gertatzea



2. Mozketa lekuen arteko DNA guneetan aldaketak gertatzea

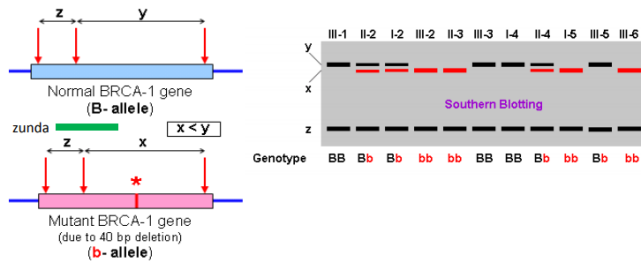


Tipikoki RFLP-a bera bakarrik ez da egiten; normalean Southern plapaketarekin edo PCR-arekin batera egiten da. Izan ere, giza genoma murrizketa endonukleasekin moztu ezker eta gero gel batean korritu ezker, zati pila bat izango genituzke, eta hortaz, ez litzateke ezer bereiztuko, izan ere, murrizketa endonukleasek ezagutzen dituzten adostasun sekuentziak asko dira, beraz, DNA zatiki asko lortuko dira. Horregatik, guk ikustea nahi dugun hori nabarmentzeko “deskarte” moduko bat egin behar da, PCR eta Southern plapaketaren bidez.

Adibidez, 40 baseetako delezio bat egon bada x en , y ren desberdina izango da eta ondoren desberdina izango da ondoren plakan.

Adb. RFLP & Southern plapaketa

BRCA-1n mendeko bularreko minbiziaren diagnostikoa

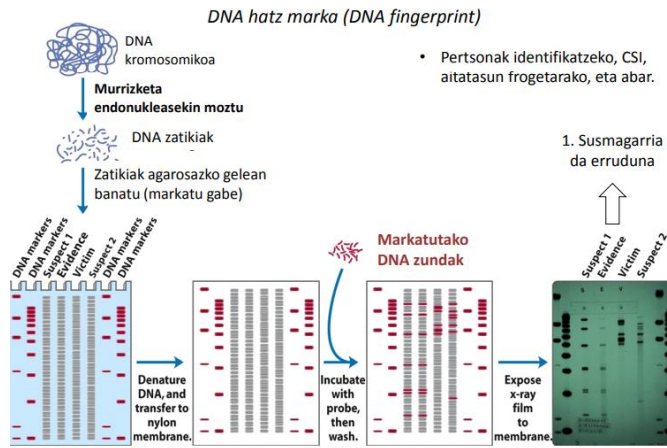


↓ Murrizketa endonukleasak ezagutu eta mozten duen sekuntzia

RFLP eta southern plapaketa tradizionalki eta oraindik ere erabiltzen da pertsonen identifikaziorako, DNA hatz marka zehazteko.

DNA genoma hartu eta endonukleasekin moztu dituzte, gel batean korrituko dituzte eta tamaina desberdinetako sekuentzia izango ditugu. DNA desnaturalizatu eta mintz batera igaroko dira. Mintzean, zunda berezi batzuk daude eta desnaturalizatutako DNA zunda hauekin elkartuko da. Ondoren, garbitu eta erradiografia bat egiten da. Erradiografia hori aztertuz identifikatzen dira pertsonak, ezinezkoa baita bi pertsona desberdinek hatz-marka berdina edukitzea.

Adb. RFLP & Southern plapaketa



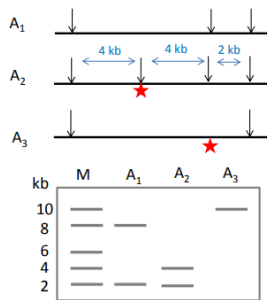
[http://highered.mheducation.com/sites/9834092339/student\\_view0/chapter17/dna\\_fingerprinting.html](http://highered.mheducation.com/sites/9834092339/student_view0/chapter17/dna_fingerprinting.html)

Adb. RFLP & Southern plapaketa

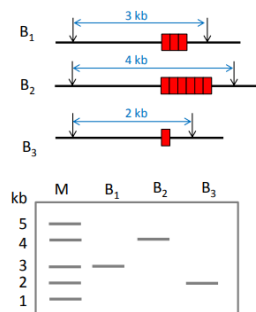
**DNA hatz marka (DNA fingerprint)**

Pertsona ezberdinek zergatik daukate DNA hatz marka ezberdina?

SNPen (★) eragina RFLP analisisietan:



STRen eragina RFLP analisisietan:



Taldeko 9. jarduera begiratu.

# 10. GAIA AZIDO NUKLEIKOEN ANPLIFIKAZIOA IN VITRO ETA DNAREN SEKUENTZIAZIOA

## Azido nukleikoen anplifikazioa in vitro

### 1. PCRA:

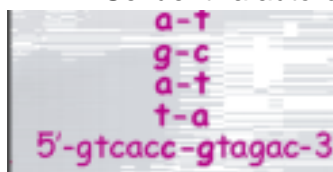
PCR-ren esanahia hurrengoa da: polymerase chain reaction. **In vitro** egiteak, ez dela organismo batean egiten esan nahi du, **tutu** batean baizik, eta PCR-a in vitro egiten dugunean DNA eremu jakin baten milaka kopia lortzen ditugu. PCRA nahiko DNA izan ondoren, DNA sekuentziatzeko, elektroforesi bidez eremu jakin hori bistartzeko, klonatzeko, eta abar erabiltzen da.

PCR-a ondo egiteko bi osagai dira garrantzitsuenak:

- Osagai garrantzitsua **Taq polimerasa** da. Bi ezaugarri hauek ditu: DNA polimerasa termoeonkorra da ( bere tenperatura optimoa gutxi gora-behera 72 gradukoa da). Baina taq polimerasak ez dauka 3' exonukleasa aktibitatearik. PCR-a egin ostean anplifikatutako DNA-rekin egin nahi dugunaren arabera ez digu axolako taq polimerasak 3' exonukleasa jarduerarik ez edukitzea, tamaina aztertu nahi badugu ez digu axolako, baina klonatu nahi badugu, klonean akatsik ez egotea nahi izango dugunez, 3' exonukleasa jarduera izatea erabilgarria izango zen.
- Gure zelulek RNA hasleak dituzte, baina ondoren ezabatu egiten dira, bi kateak lotuta utziz. Hau ez da ematen PCRan, izan ere, **DNA hasleak** erabiltzen dira. DNA hasleak espezifikoak dira, osagarriak izan behar dute anplifikatu nahi den sekuentziarekin soilik, honela anplifikatu nahi den DNA eremua mugatzen dute hau da, genoma batean, zuk anplifikatu nahi duzun zatiaren hasieran eta amaieran egon behar dute eta kontuan izan behar da soilik erreplikatu nahi den sekuentzian egotea.

Honetaz gain, baldintza batzuk bete behar dute, 18-24 nt luzera izan behar dute eta GC edukia %45-55 izan behar du; gainera, ekidin egin behar dira sekuentzia auto-osagarriak eta dimerok eraketa (dimerok eratuz gero hasleak afuntzionalak bihurtzen baitira).

- Sekuentzia auto-osagarriak:



- Hasleen arteko dimerok

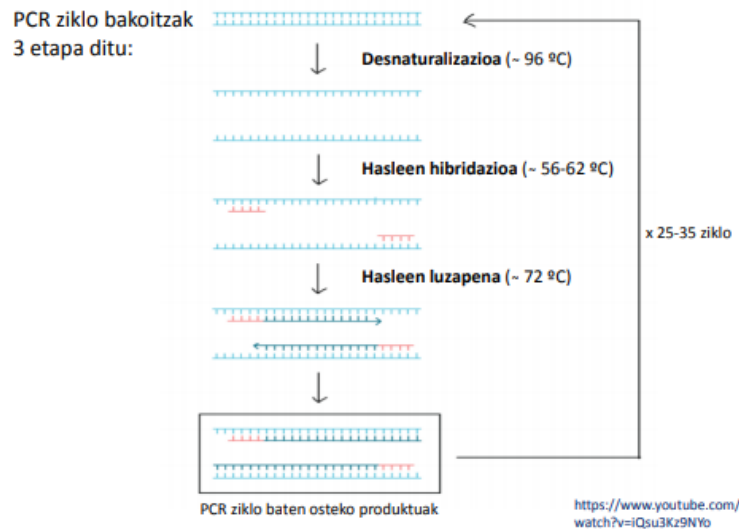
Haslea 1: 5'-actaccagtgccagatacag-3'  
 Haslea 2: 5'-tagacaggaagtccactgta-3'

Hasle-dimeroak | 5'-actaccagtgccagatacag-3'  
 3'-atgtcacctgaaggacagat-5'

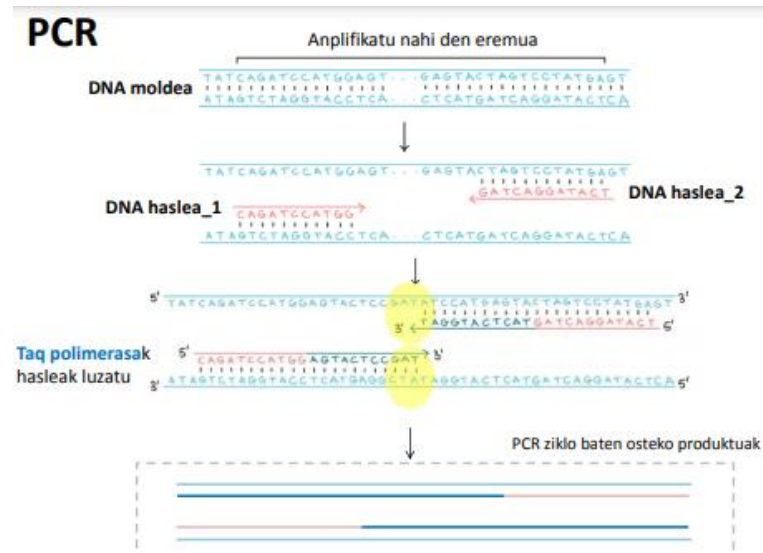
- DNA moldea, MgCl, dNTP, indargetzailea eta ura ere beharko dira PCR bat egiteko.

PCR ziklo bakoitzak hiru etapa ditu: desnaturalizazioa, hasleen hibridazioa eta hasleen luzapena. Hiru etapa hauek tenperatura jakin batzuetan gertatzea oso garrantzitsua da:

Desnaturalizazioa oso tenperatura altuan (96 gradutan) eman behar da, hidrogeno zubiak apurtzen direla ziurtatzeko. Hasleen hibridazioan hidrogeno zubiak eratu nahi direnez, tenperatura baxua izango da baina tenperatura hasleen sekuentziaren arabera izango da (56-72 gradu tartean). Behin hibridazioa bukatu ondoren, hasleen luzapena gertatzen da, eta taq polimerasak katalizatzen duenez, 72 gradu inguruan gertatzen da, hau baita taq polimerasaren tenperatura optimoa.

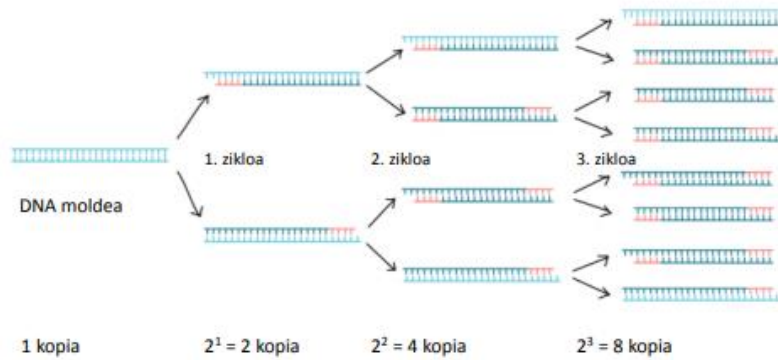


PCRan ez daude ligasak, DNA haslea delako eta beraz ez dira kendu behar eta gainera ez daude okazakiren zatiak.

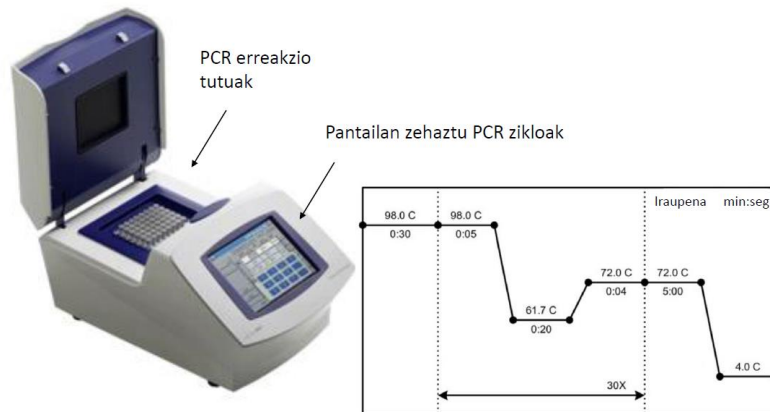




PCRa ziklo bakoitzeko, DNA kopia kopurua esponentzialki hasten da.



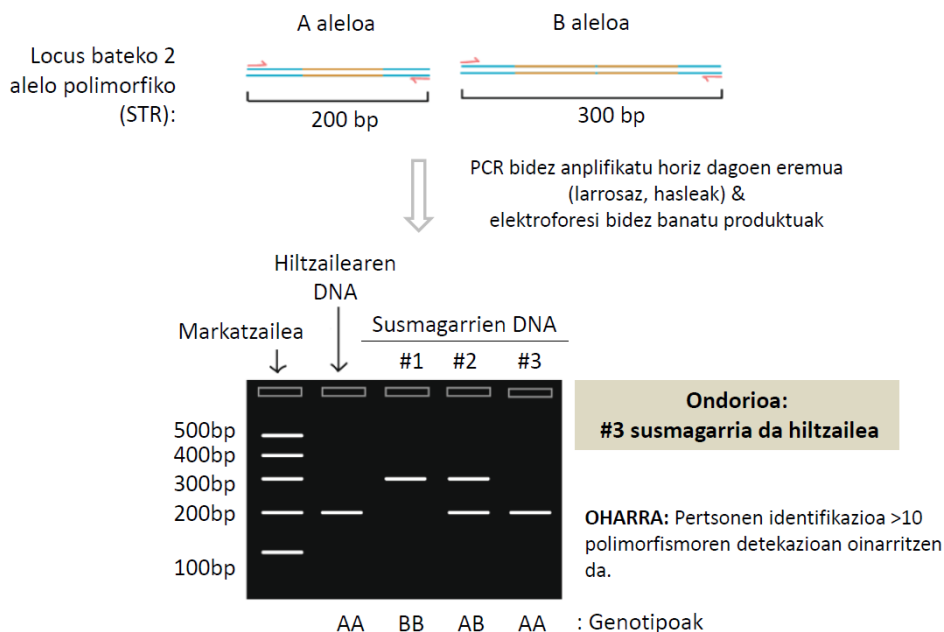
PCR **termozikladore** izeneko tresnan egiten da. Termozikladoreak plantxa bat dauka, erreakzio tutuak dituena, eta bertan sartzen dira laginak. Termozikladoreak pantaila bat du, PCR zikloak zehazten dituena.





Adibidez: PCR-aren erabilera zientzia forentsean:

Adb. PCR-aren erabilera zientzia forentsean (GL praktketan antzekoa egingo duzue)



Locus bateko 2 alelo polimorfiko (STR):

Banda bakarra egoteak ez du esan nahi alelo bakarra duenik, gizakiok diploideak baikara. Baina kontuz; gizonezkoak X kromosomekiko haploideak direnez, sexuarekin erlazionatutako aleloekin lan egiten dugunean gizonezkoen kasuan X-rekin erlazionatu daitekeen alelo bakarra egongo da. Beste kasu guztietan, alelo bakarra baldin badago, indibiduaa homozigotoa dela esan nahiko du.

Markatzailea ez da kontrol bat, banden tamainak adierazten ditu soilik. Kontrol positiboa, guk detektatu nahi duguna egongo dena ziurtatuko digun lagina da. Aldiz, kontrol negatiboaren funtzioa kontrakoa izango da: guk detektatu nahi duguna ez dagoela esango digun lagina.

## 2. RT-PCR (alderantzizko transkripzioa PCR)

RT-PCR-ren esanahia hurrengoa da: reverse transcription PCR. PCR-aren esanahia polymerase chain reaction da. **In vitro** egiteak, ez dela organismo batean egiten esan nahi du, **tutu** batean baizik. RT-PCR prozesuaren bidez **RNA cDNA-n** (complementary DNA-n) **bilakatzen** da; eta ondoren **produktua PCR bidez amplifikatzen** da.

PR-PCR teknika honako arrazoi hauengatik egiten da:

- Erretrobirusen genoma (RNA) aztertzeko. Adibidez, coronavirusaren genoma aztertzeko.
- Geneen transkripzio maila neurtzeko (geneen espresioa aztertzeko). Guztiok dauzkagu gene nahiko berdinak (hauen nahiko egonkorak dira); pertsona

batetik bestera aldatzen dena transkriptoma izango da, gene bat edo beste transkribatzea, alegia.

- Gene eukariotoak prokariototan txertatzeko...

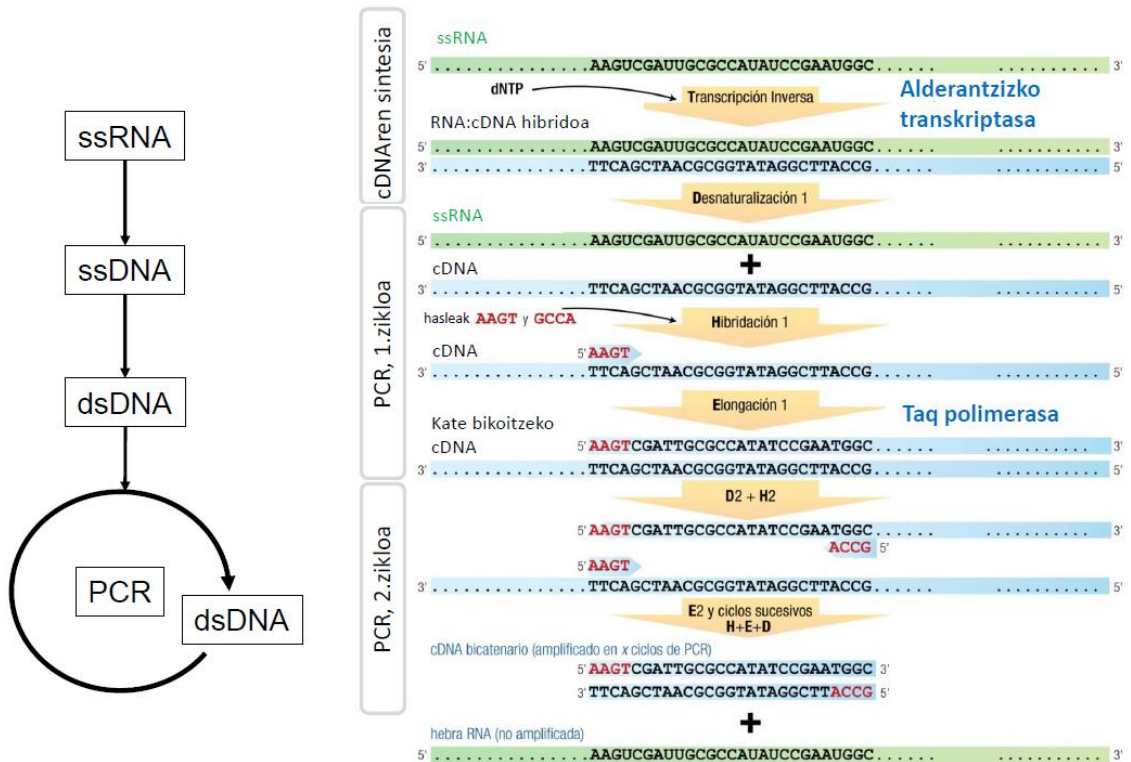
cDNA molekulen berezitasunak:

- RNA-ren sekuentzia bera izango du, desberdintasuna uraziloaren ordez timina edukiko duela da. RNA oso molekula hauskorra, ez-egonkorra da, ondorioz, ez da komeni molekula hau asko manipulatzeko. Horregatik, molekula honekin lan egin nahi bada, RNA cDNA-n bilakatzen dugu, cDNA egonkorra baita eta azken molekula hau aztertzen da (azken finean informazio bera gordetzen baitute).
- Harizpi bikoitzeko molekula da.
- Ez dauka introirik, izan ere, RNA mezulari prozesatutik abiatuta sintetizatzen da.

Entzima gakoa:

- Alderantzizko transkriptasa: Birusek beraien RNA DNA bilakatzen dute alderantzizko transkriptasaren bitartez era horrela txertatuko dute gero gure genomaren beraien material genetiko.

## RT-PCR

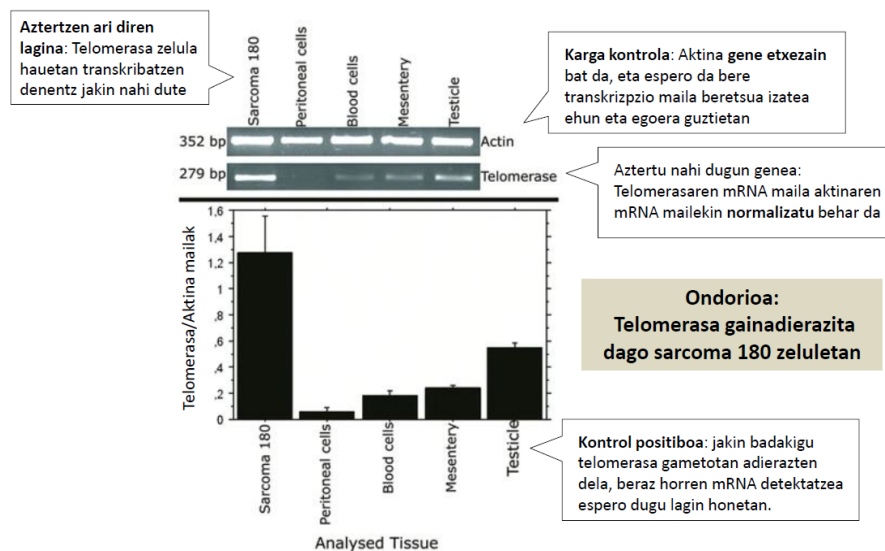


RNAtik abiatuta, alderantzizko transkriptasak RNA cDNA hibridoa osatzen du. Molekula hau PCR-ra eramaten da. Hasieran harizpi bakarra izango dugu baina lehen zikloan dagoeneko bi harizpi cDNA izango ditugu eta honen anplifikazioa emango da.

RNA (harizpi bakarrekoa) ez da anplifikatuko, PCR-aren amaieran cDNA milaka kopia egongo dira, eta RNA oso diluituta egongo denez, ez du eraginik edukiko.

Adibidez: telomerasa genearen transkripzio mailaren azterketa sarcoma 180 zeluletan.

Adb. Telomerasa genearen transkripzio mailaren azterketa sarcoma 180 zeluletan



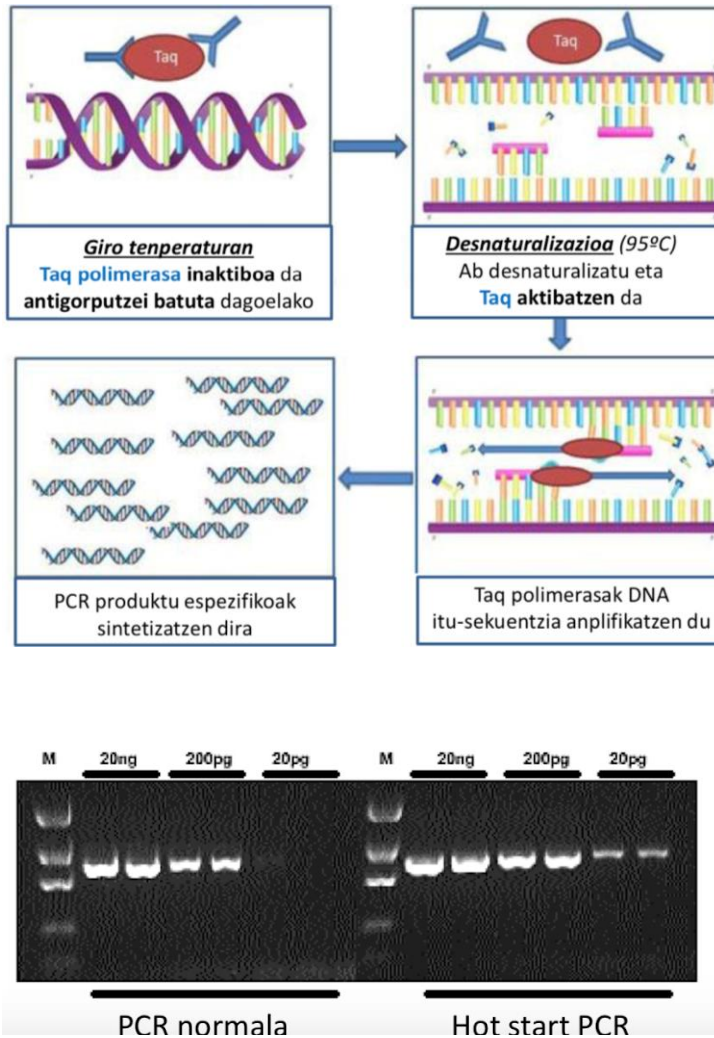
Testikuluetakako lagin bat hartuko dugu bertan gametoak daudelako eta gametoetan telomerasa aktibo egon behar delako. Lagin hau kontrol positibo moduan erabiliko da, hau da, esperimientua ondo egin badugu, testikuluen laginean seinaleak altua izan beharko du bertan telomerasa aktibo dagoelako. Hori horrela ez bada, zerbait gaizki egin dugunaren seinalea izango da.

Beraz, horrelako probak interpretatzen hasi aurretik, karga kontrola eta kontrol positibo/negatiboak ondo daudela ziurtatu beharko dugu (benetan esperimientua ondo egin dugula ziurtatu beharko dugu).

PCR eta RT-PCR teknikaren aldaerak, deribazioak:

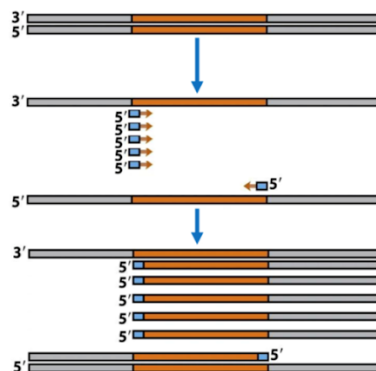
- **Hot Start PCR:**

Tenperatura baxuetan taq polimerasa aktibo egoten da, eta anplifikatu nahi ez den zerbait anplifikatu daiteke PCRa hasi baino lehen, hau da, anplifikazio ez-espezifikoa gertatzen da batzuetan (ez da oso ohikoa). Anplifikazio ez-espezifikoa ekiditeko Ab **antigorputzek** taq polimerasa inaktibatzen dute, honela zikloak hasi baino lehen ez da nahi ez dugun ezer anplifikatuko. Ohiko PCR zikloekin hasi aurretik lagina berotu behar da, antigorputzak desnaturalizatzeko eta Taq polimerasa berriro aktibatzeke. Hot Start PCR ohiko PCR-arekn konparatuz gero, sentikorragoa da, hau da, kantitate txikiagoak anplifikatzen dira metodo honen bidez.



- **PCR asimetrikoa:**

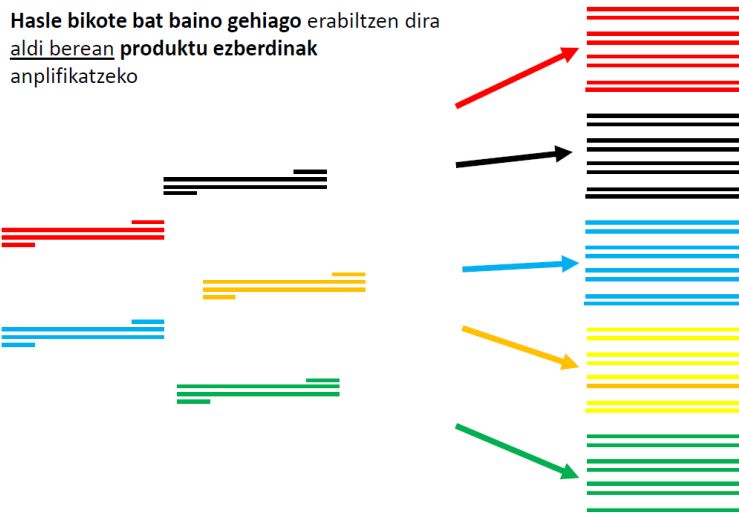
DNA harizpietako bat bestea baino askoz gehiago anplifikatuko da, bi hasleen ratioa ez baita 1:1. Azken produktua ssDNA (harizpi bakarreko katea) da. Sekuentziazio teknika batzuetan erabiltzen da estrategia hau.



- **Multiplex-PCR:**

PCR saio bakar batean sekuentzia bat baino gehiago anplifikatzea nahi bada, hasle bikote bat baino gehiago erabiltzen dira. Produktu ezberdinak anplifikatuko ditugu,

honela lagina, dirua, eta denbora aurreztuz. Dena den, interpretatzeko zailagoa izango da eta interferentziak sortzeko berriz, errazagoa.



Adibidez: multiplex RT-PCR bat garatu dute garia infektatu dezaketen zortzi birusen mRNA-k aldi berean detektatzeko.

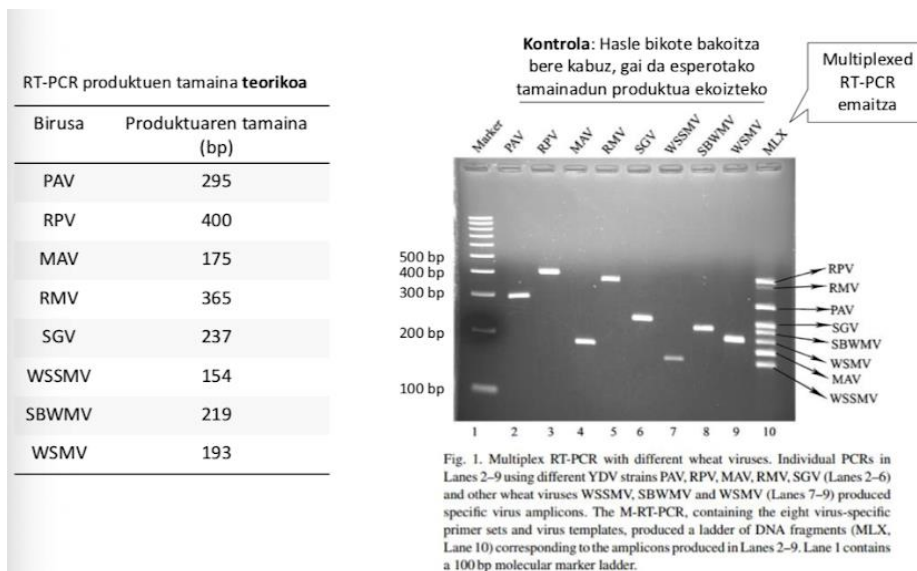
Lehenik frogatu behar da birus bakoitza produktuaren tamaina zehatzean markatuta dagoela, 8 birusak badaudela frogatzeko, eta ondoren laginean birus desberdinak detektatuko dira.

Adb. Mutliplex RT-PCR bat garatu dute garia infektatu dezaketen 8 birusen mRNA.k aldiberean detektatzeko.

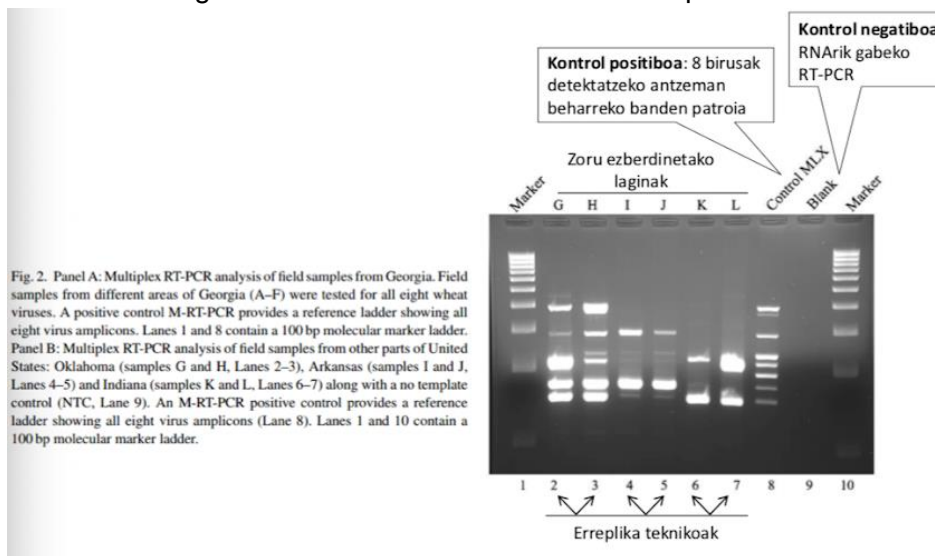
Table 1  
Virus-specific primers used in the multiplex-RT-PCR detection method

Target virus	Primer	Sequence	5'Position	$T_m$ (°C)	NCBI accession	Amplicon size (bp)
BYDV-PAV	PAVL1	AGAGGAGGGGCAAATCCTGT	2999	59.4	D11032	295
	PAVR1	ATTGTGAAGGAATTAATGTA	3272	47.1		
BYDV-MAV	MAVL1	CAACGCTTAACGCAGATGAA	896	55.3	D11028	175
	MAVR1	AGGACTCTGCAGCACCATCT	1071	59.4		
BYDV-SGV	SGV L2	ACCAGATCTTAGCCGGGTTT	631	57.3	AY541039.1	237
	SGV R2	CTGGACGTCGACCATTCTT	911	57.3		
BYDV-RMV	RMVL1	GACGAGGACGACGACCAAGTGGA	41	66.0	L12757.1	365
	RMV R	GCCATACTCCACCTCCGATT	357	59.4		
CYDV-RPV	RPV L	ATGTTGTACCGCTTGATCCAC	3275	57.9	AF235168.2	400
	RPV R	GCGAACCATTGCCATTG	3655	52.8		
WSSMV	WSSMV L1	GCAACCCTTAGCGAAGTCAG	4059	59.4	X73883	154
	WSSMV R1	GAGGCTCCGTGTCTCATAGC	4213	61.4		
WSMV	WSMV L2	CGACAATCAGCAAGAGACCA	5444	57.3	NC.001886	193
	WSMV R2	TGAGGATCGTGTGTTTCAG	5622	57.3		
SBWMV	SBMV L2	CCTATGGCGCTCAACGTGT	2584	59.4	NC.002042	219
	SBMV R2	CACAATCTGCAGGAAGACGA	2803	57.3		

Ziurtatu multiplex RT-PCR bidez posible dela zortzi birusak detektatzea.



Zoru ezberdinetako laginak erabiliz detektatu zortzi birusen presentzia.



Kontrol negatiboa ere beharrezkoa da. Hau egiteko, RT-PCR bat egiten da baina RNAririk izan gabe, beraz teoriarik ez da ezer amplifikatuko eta ez da seinalerik egongo. Honela ziurtatuko dugu produktuak ez daudela kutsatuta.

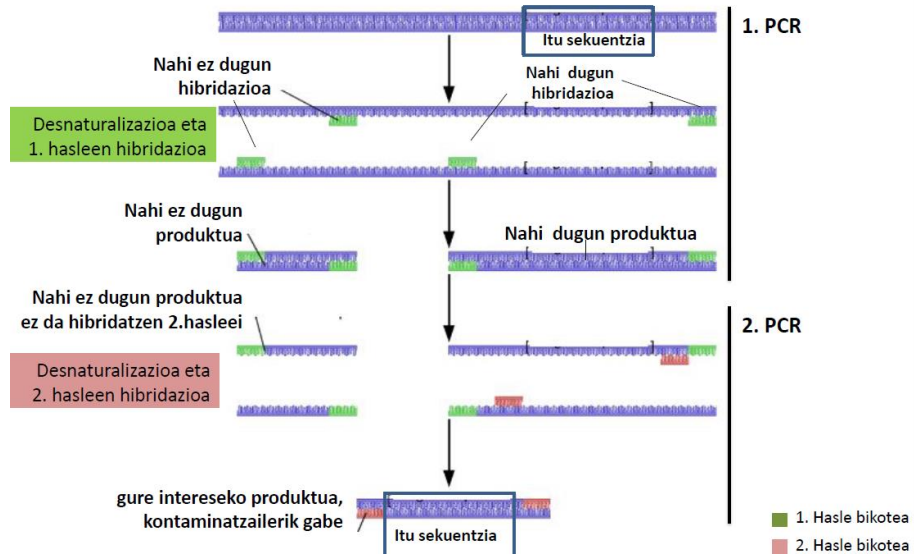
**Nested-PCR:**

Prozedura honetan, espezifikotasuna ziurtatzea da garrantzitsua; horretarako, 2 hasle bikote izango ditugu, bat berdea eta bestea gorria edo arrosa. Hasle bikote berdea ez da oso ona, nahi genituen lekuez gain, beste leku batzuk ere hibridatu dituelako. Hau gertatu daitekeen kasuetan beste hasle bikote bat diseinatzen da, arrosa edo gorria.

Gerta daiteke hasle batek produktu inespezifikoa amplifikatzea. Gerta daiteke bigarrenak ere produktu inespezifikoren bat amplifikatzea, baina beti egongo da hasle bat beste bat baino hobea dena (hau da, sekuentzia inespezifikoko gutxiago amplifikatuko dituen).

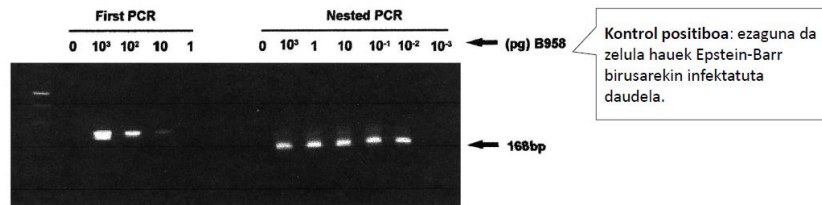


Gainera, Nested-PCR-a 1000 aldiz sentikorragoa da PCR arrunta baino.

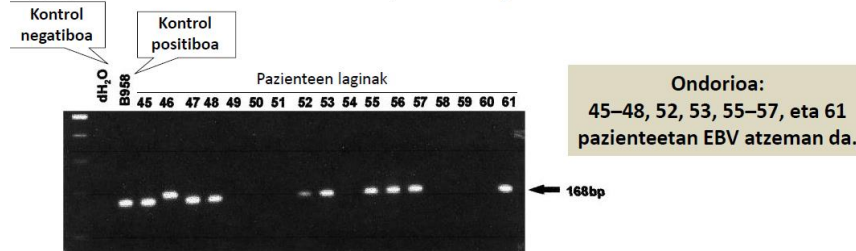


Adb. Nested PCR bat garatu dute Epstein-Barr birusaren (EPV) DNA plasman detektatu, eta nasofaringe minbizia diagnostikatzeko

(i) Frogatu Nested PCR bidez, Epstein-Barr birusaren DNaren detekzioa askoz sentikorragoa dela



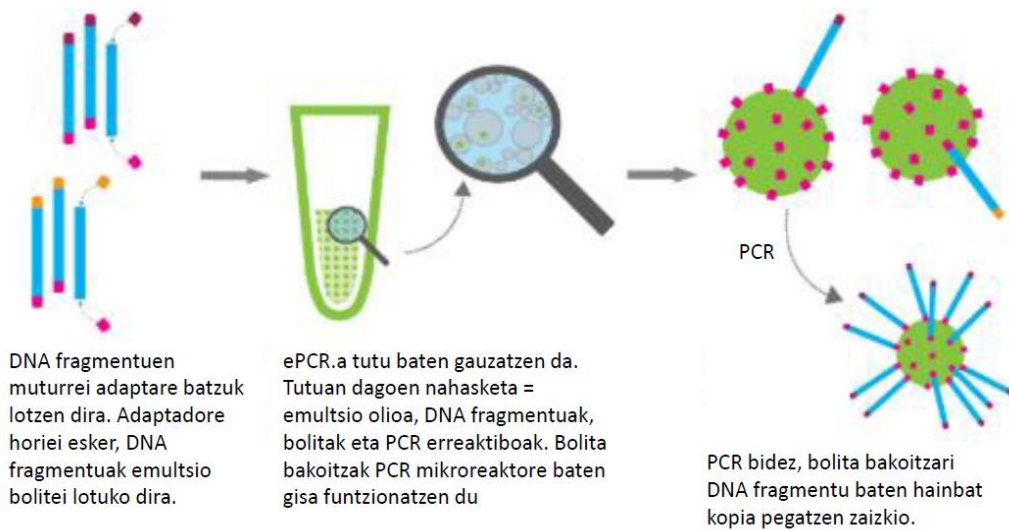
(ii) Epstein-Barr birusaren DNaren detekzioa pazienteen laginetan Nested PCR bidez



- **Emultsio-PCR (ePCR):**

Hurrengo belaunaldiko sekuentziazio teknika batzuetan (NGS, next generation sequencing) DNA kopiatzeko erabiltzen den PCR mota da hau.

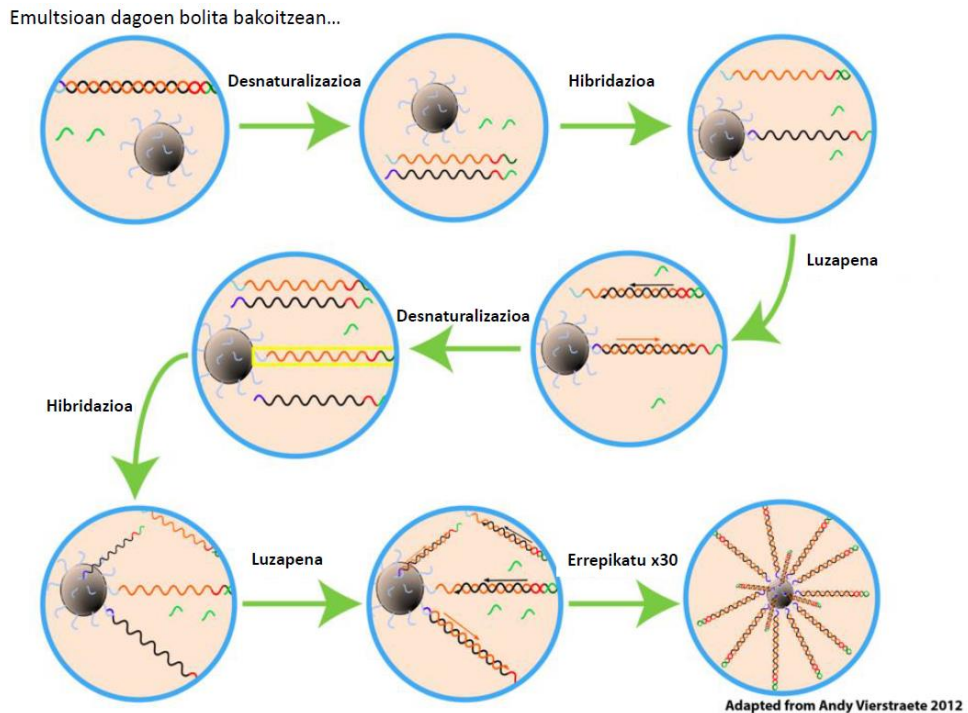
Fragmentu bat behin baino gehiagotan sekuentziatzen da.



DNA fragmentuen muturrei adaptadore batzuk lotzen zaizkie. Adaptadore horiei esker, DNA fragmentuak emultsio bolitei lotuko dira.

ePCR-a tutu batean gauzatzen da. Tutuan dagoen nahasketa **emultsio olioia**, DNA fragmentuak, bolitak eta PCR errektiboak izango dituen osagai moduan. Bolita bakoitzak PCR mikroreaktore baten gisa funtzionatzen du.

PCR bidez, bolita bakoitzari DNA fragmentu baten hainbat kopia pegatzen zaizkio.

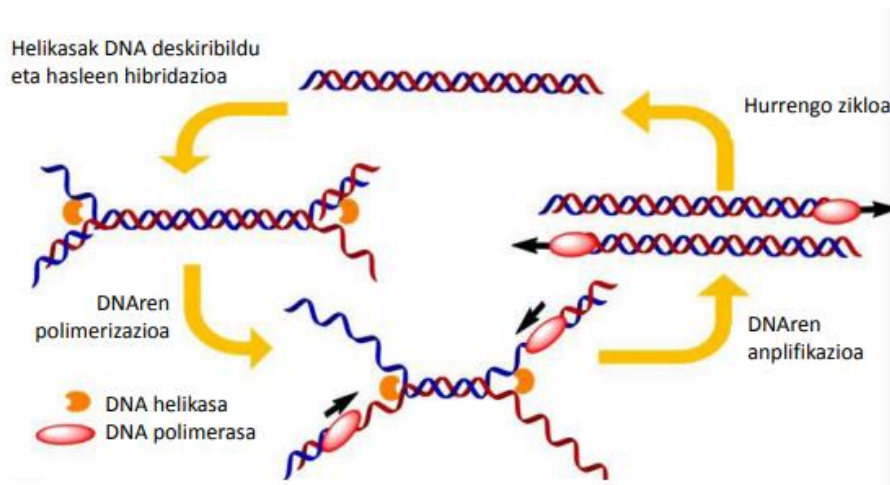


PCR prozesua bera aurrekoen berdina izango da.



- **Helikasen menpeko DNA-ren anplifikazioa:**

Berezitasuna helikasak erabiltzen direla da. Helikasak DNA desnaturalizatzeaz arduratzen diren entzimak dira. Kasu honetan densaturalizazioa entzima honen efektuaren ondorioz gertatuko da, eta ez tenperatura altuaren ondorioz. Prozesua tenperatura konstantean gertatzen denez, anplifikazioa isotermikoa izango da.



3. **PCR eta RT-PCR kuantitatiboa:**

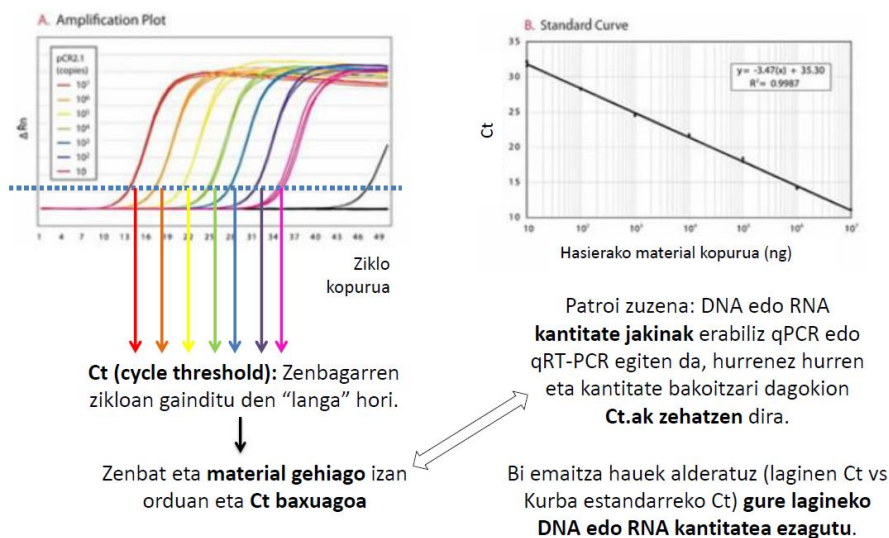
Guk laborategian egin genuen PCR-a kualitatiboa izan zen (banda dago edo ez dago). Baina orain analisi kuantitatiboa egitea interesatzen zaigu. Edozein teknika kuantitatiboetan erlatiboa eta absolutua bereizten dira. PCR-tan gehien erabiltzen dena erlatiboa da.

PCR-aren prozesua berdina da, baina erabiltzen den makina desberdina. Prozesu honetan erabiltzen diren termozikladore hauek garestiagok dira, eta PCR prozesuan zehar anplifikazioa nola gertatzen ari den ikustea ahalbidetzen digute.

PCR mota hauetan, langa bat markatzen da, **Ct balio** bat zehazten da. Ct (cycle threshold) balioak guk ipinitako laginak zenbagarren zikloan gainditzen duen langa adierazten du. Hau da PCR kuantitatiboaren oinarriko printzipioa.

Zenbat eta ziklo gehiago behar izan Ct langa gainditzeko, orduan eta material gutxiago edukiko dugu. Ct balioa baxua bada (azkar gainditu badu langa lagin batek), hasieran material kantitate handia izango genuke.

Absolutu bilakatzeko patroi zuzena erabiltzen da. Kantitate ezaguneko laginak (DNA edo RNA) hartzen ditugu, hasierako material kopuru (ng) ezagunekoak eta hauen PCRa egin eta Ct balioak kalkulatu ditugu. Datu hauekin Ct eta hasierako material kopuruarekin grafiko bat egiten dugu. Bi emaitza hauek alderatuz (laginen Ct vs Kurba estandarreko Ct) gure lagineko DNA edo RNA kantitatea ezagutu dezakegu.



Abididez, qRT-PCR bidez, minbuzian gainadierazita dauden CK19, Erb2 eta muc1 geneen espresio analizatuko da.

Kontrol osasuntsua izango dugu, baita gene etxezain bat ere, transkripzio faktorea beti berdina dena lagin guztietan (beta aktina).

qRT-PCR emaitzak (Ct balioak)

Genea	Kontrol osasuntsua	1 pazientea	2 pazientea	3 pazientea
$\beta$ -aktina*	10	10.5	10.2	9.8
CK19	18	11	10.5	17
ErbB2	23	13	13	22.5
muc1	22	10	11	22

Ondorioa:

Kontrol osasuntsuarekin konparatuz, 3. pazientea osasuntsua izango da eta aldiz 1 eta 2 pazienteen geneak gainadierazita daude (Ct balioak oso txikiak direlako, ondorioz, hasierako kantitatea handia da) eta ondorioz minbuzia dute.

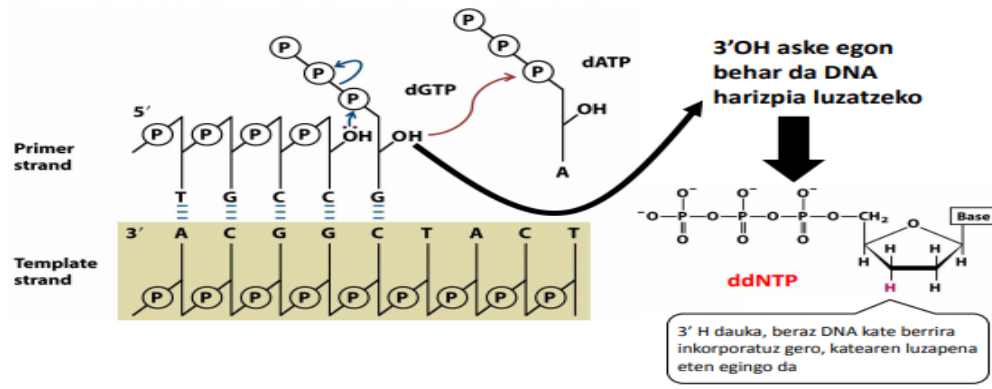
KONTUZ! Ez dago konparatzerik bi gene desberdinen Ct maila. Bai ordea, gene berdin baten Ct maila lagin desberdinetan.

## DNAREN SENKUENTZIAZIOA:

### 1. Sanger sekuentziazioa:

1977an asmatutako teknika da, eta Nobel saria eman zieten asmakuntza honengatik. Ia 40 urteetan zehar sekuentziazio teknika bakarra izan da, gaur egun hurrengo belaunaldiko sekuentziazio izeneko teknika batzuk ere existitzen dira, baina hala ere, hau erabiltzen jarraitzen da.

ddNTP-en erabileran oinarritzen da. ddNTP hauen bereizgarria: 3'-n OH bat izan beharrean, H izango dute; beraz, DNA kate berrira inkorporatuz gero, katearen luzera eten egingo da. Izan ere, ezin izango da eman baseen arteko fosfodiester lotura.

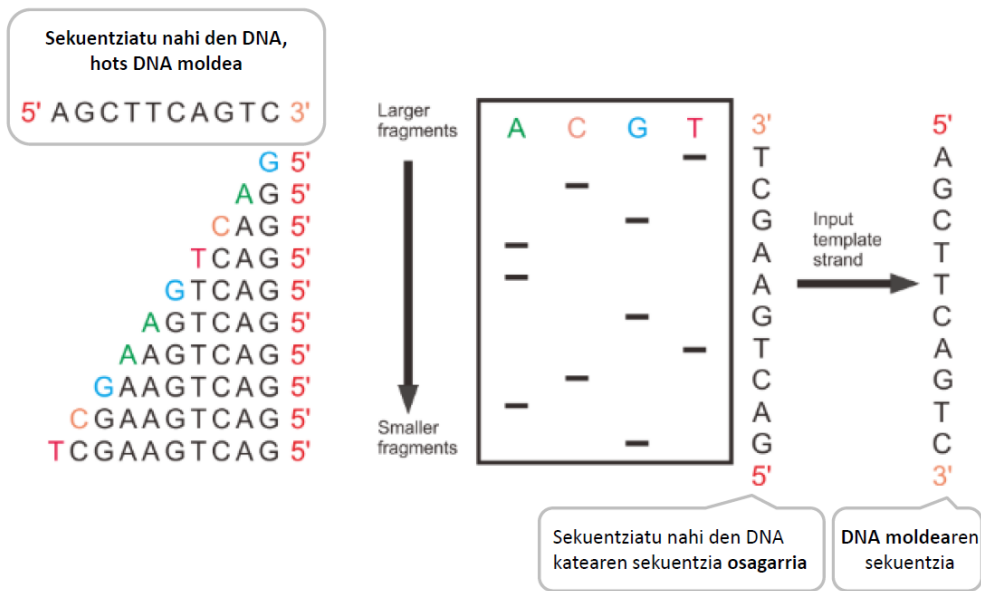
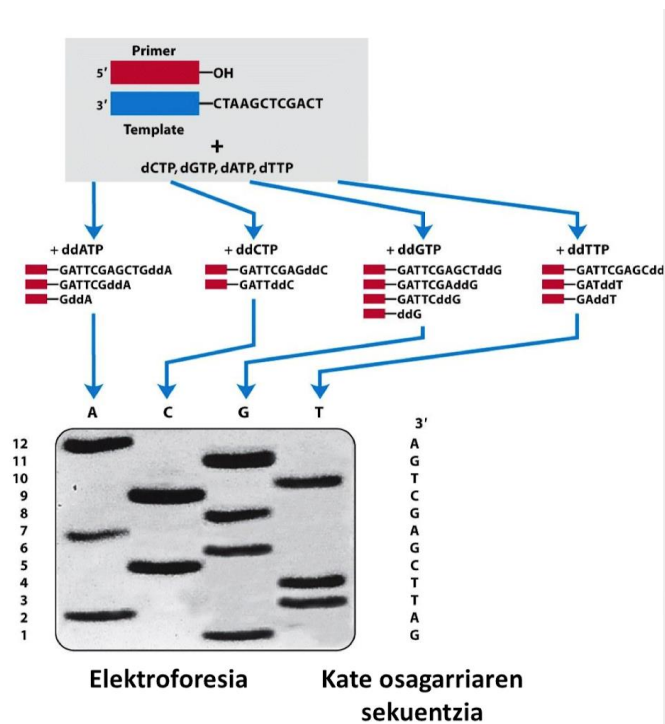


**Prozedura:**

- Hasle bat diseinatu behar dugu, DNA polimerasa ez baita gai DNA hasieratik kopiatzeko. DNA polimerasak haslea luzatuko du. DNA molekula bakarra sekuentziatzeko 4 tutu prestatzen dira, eta bakoitzean sekuentziatzeko behar diren osagai guztiak gehitzen dira: moldea, polimerasa, lau dNTP-ak eta ddNTP bakar bat, tutu bakoitzean didesoxinukleotido jakin bat.

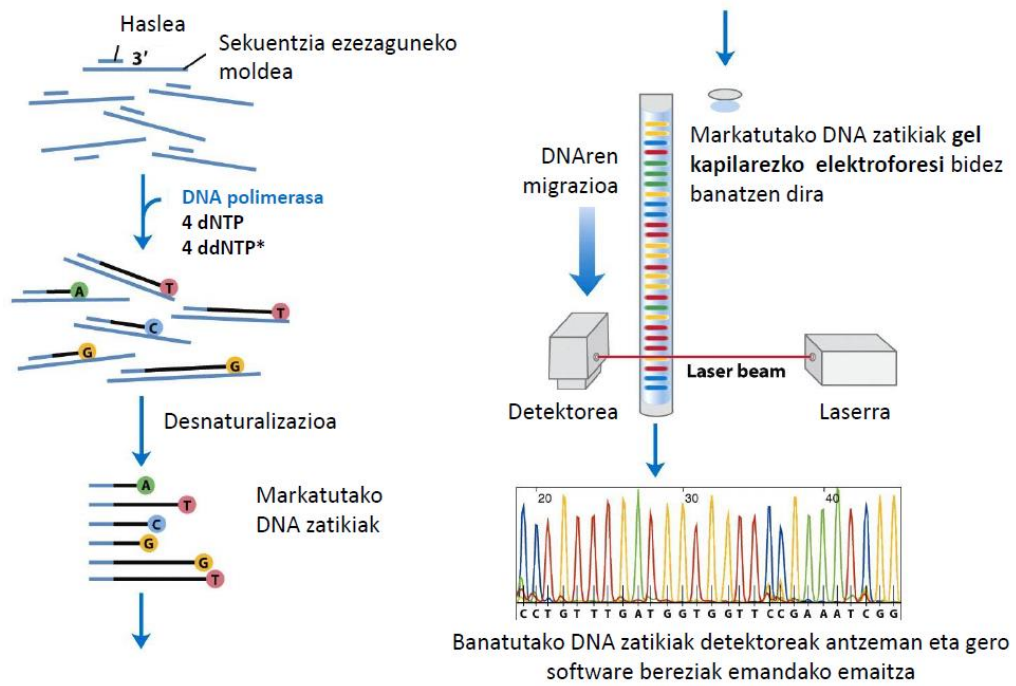
Adibidez, tutu batean bi adenina egongo dira: bata normala eta bestea didesoxi adenian. A sartu behar duenean bietako bat sartuko du, ddA sartzen badu katearen luzapena amaitzen da eta aldiz A sartzen badu jarraitu egingo du erreplikazioak. Ondorioz, luzera desberdinetako kateak izango ditugu, baina beti amaieran ddA egongo da. Hau da, sartu duzun dd aren arabera dd horrekin amaituko da katea.

Ondoren, PCR produktuak elektroforesi bidez banatzean nukleotido bakar baten bereizten diren DNA zatikiak bereizten dira. Azken nukleotidoa zein den badakigunez, tamaina desberdinetakoak ordenean jarritz kate osagarriaren sekuentzia ondoriozta daiteke.

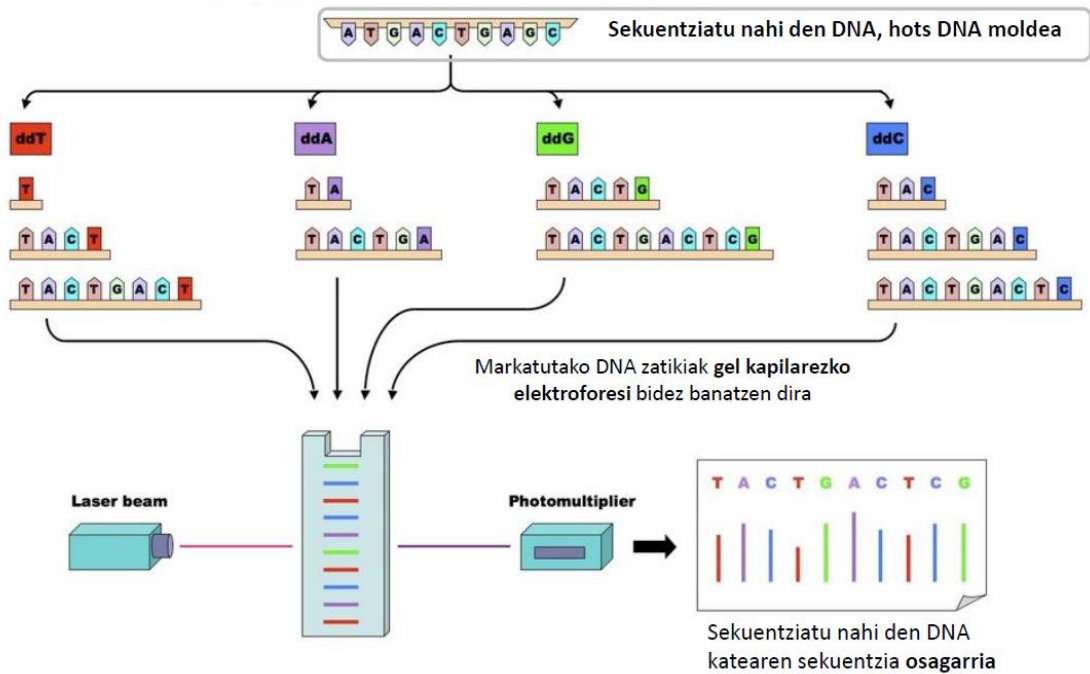


Gaur egun Sanger metodo automatizatu erabiltzen da. Teknikaren bariazio honetan, dd bakoitzak kolore bat izango du, fluoroforo ezberdinekin markatuta egongo direlako, eta ondorioz, guztiak bateratu daitezke, ez dira 4 tutu desberdin behar. Agarosazko gel batean migratu beharrean markatutako DNA zatiak gel kapilarrezko elektroforesi bidez banatzen dira. Kolore desberdinak aztertuta, DNAaren sekuentziaren osagarria zein den jakingo dugu. Koloreen azterketa egiteko detektoreak erabiltzen dira, eta gero hauek software bereziak erabiliz interpretatuko dira.

Fluoroforo ezberdinarekin markatutako ddNTPak erabili (guztiak batera gehitu daitezke)



PCR gauzatzen da fluorescenteki markatutako ddNTPen presentzian



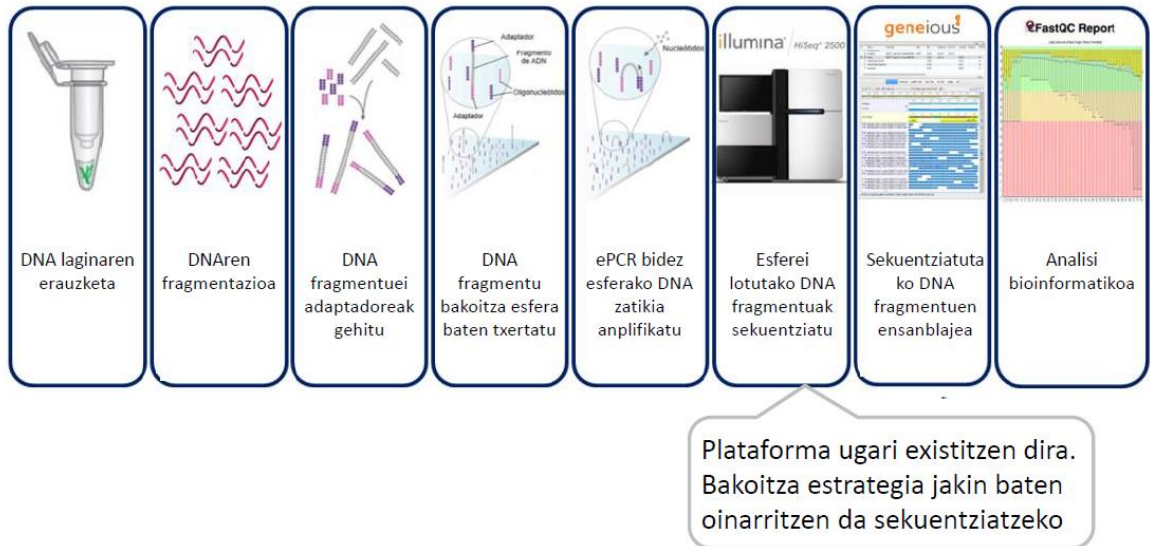
2. Hurrengo belaunaldiko sekuentziazioa (Next generation sequencing: **NGS**):

Prozesuaren pausuak:

- DNA laginaren erazketa.
- DNA-ren fragmentazioa.
- DNA fragmentuei adaptadoreak gehitu.

- DNA fragmentu bakoitza esfera baten txertatu (emulsio PCR-tan moduan).
- ePCR bidez esferako DNA zatikia anplifikatu.
- Esferari lotutako DNA fragmentuak sekuentziatu. Honetarako plataforma ugari existitzen dira. Bakoitza estrategia konkretu batean oinarritzen da sekuentziaziorako.
- Sekuentziazitako DNA fragmentuen ensanblajea.
- Analisi bioinformatikoa.

Prozedura:

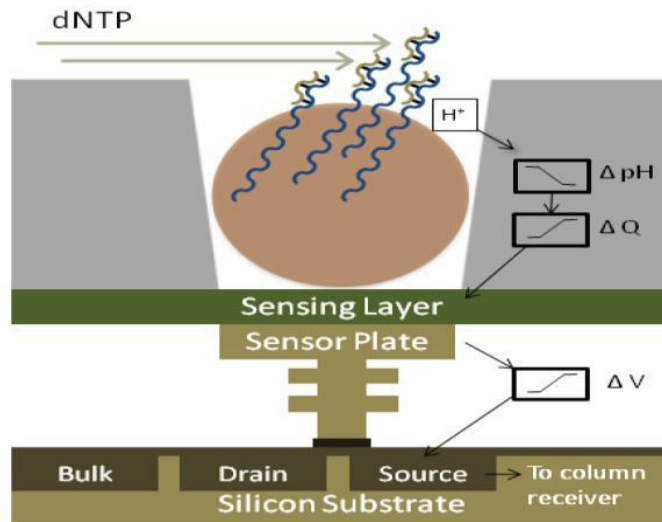


NSG metodo batzuk:

- loi erdi eroalea:** txip bat daukagu milaka zulotxokoa. Zulotxo bakoitzean bolita bat sartzen da, milaka aldiz anplifikatutako fragmentu batekin. Luzatzen dagoen katean dNTP bat sartzen da eta katearen osagarria baldin bada dNTP jakin hori, H-lotura sortuko da eta orduan protoi bat askatuko da, pH-an aldaketa txiki bat sortuz. Txiparen azpian dagoen tresneriak detektatuko du pH aldaketa hau. Ondoren, katearen luzapenarekin jarraitzeko, beste dNTP desberdin bat gehituko da. DNA polimerasak katea luzatzen jarraituko du. Baina bertan dagoen nukleotidoaren osagarria ez bada orain gehitutako dNTP-a, bertan ez da H-loturarik emango, eta beraz, makinak ez du pH aldaketarik hautemango. Horrela jarraituko du nukleotido desberdinen inkorporazio jarraia eginez kate osagarria sortu arte.

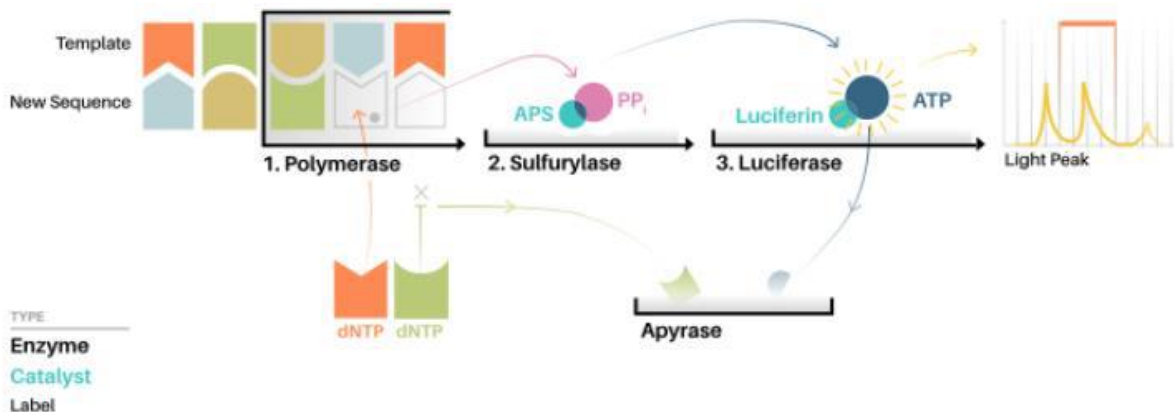
Bideoa: <https://www.youtube.com/watch?v=WYBzbxlfuKs>



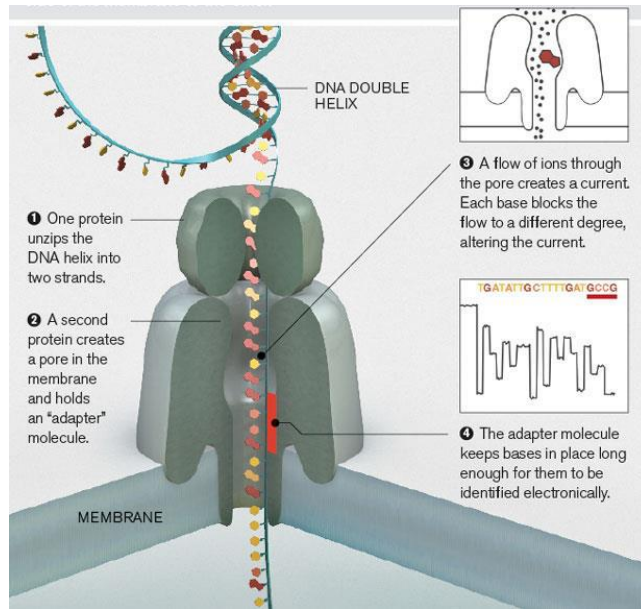


- b. **Pirosekuentziak:** 4 entzimek (polimerasa, sulfurilasa, luziferasa eta apirasa) hartzen dute parte. Sistemak nukleotidoa gehitzen du eta luzatzen ari den katekoaren osagarria baldin bada pirofosfatoa askatzen da bi nukleotidoen elkarketa ematen denean (trifosforalitatutik monofosforilatura igarotzean). Sulfurilasa sistemaren bitartez ATPa lortzen da pirofosfato horretatik abiatuta eta azkenik, luziferasak ATPa argia bilakatzen du. Beraz, nukleotido bat gehitzean argia badago, nukleotido hori doa jarraian, aldiz ez bada gehitzen ez da argirik egongo eta badakigu ez doala nukleotido hori. Apirasa entzima lotu ez diren nukleotidoak garbitzeaz arduratzen da.

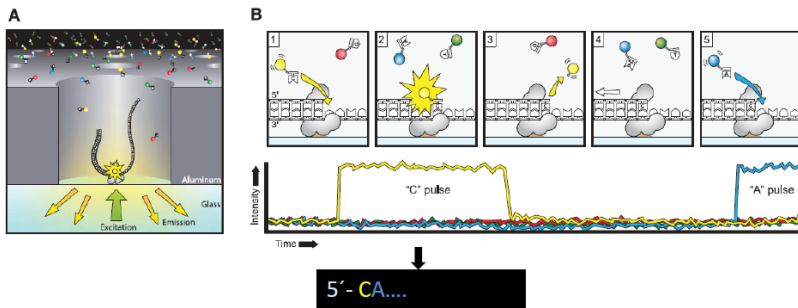
Bideoa: <https://www.youtube.com/watch?v=nFfgWGFe0aA>



- c. **Nanoporo bidezko sekuentziak:** guk sekuentziatu nahi duguna hartzen da, desnaturalizatzen da, eta harizpia nanoporotik (proteina bat, kanal funtzioa duena) pasatzen da. Nanoporotik ioi-korrente bat pasatzen da eta, hartaz, DNA-k poroa zeharkatzen duenean perturbazioak sortzen ditu, nukleotido bakoitzak perturbazio desberdina. Kasu honetan poro honetatik pasako den DNA-k ze perturbazio sortzen duen neurtzen da, ondoren DNA-ren sekuentzia ondorioztatzeko.



- d. **Zero-mode waveguide sekuentziakzioa:** txip bat daukagu, zulo txo askorekin. Zulo txo bakoitzean sekuentziatu nahi den DNA izango dugu. Gehitzen den nukleotido bakoitzak fluoroforo desberdin bat izango du. Orduan, polimerasak nukleotido bat inkorporatzen duen bakoitzean luzatzen dagoen katean, nukleotidoak fluoroforoa askatuko du (nukleotido bakoitzak desberdin bat). dNTP-rik ez bada askatzen, nukleotidorik gehitu ez den seinale izango da. Kasu honetan ere harizpi osagarriaren informazioa jasoko dugu.





Sanger sekuentziazioa vs NGS

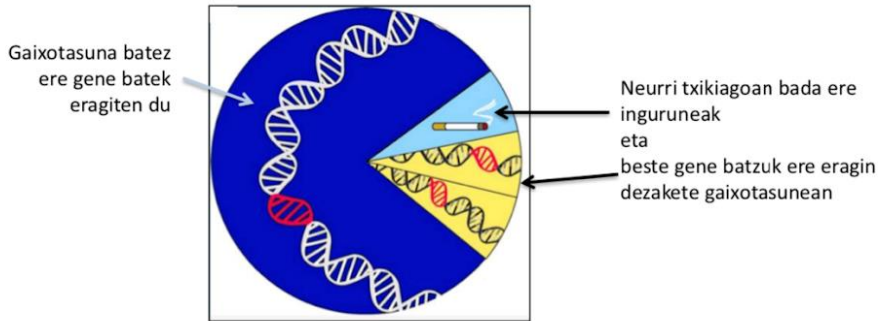
	<b>Sanger sekuentziazioa</b>	<b>NGS</b>
<i>Laginaren prestaketa</i>	Erraza	Konplexua
<i>Sekuentziazioaren DNA zatikien tamaina</i>	~ 1 Kb	30-400 bp ondorioz, lan handia sekuentzia guztiak ensanblatzeko
<i>Akatsen maiztasuna</i>	< % 0,001	% 0,5-1 ondorioz, DNA fragmentu bera hainbat aldiz sekuentziazioa da
<i>Bizkortasuna</i>	Oso motela	Oso azkarra (ordu gutxi/genoma)
<i>Kostu erlatiboa</i>	Oso altua	Oso baxua
<i>Metagenomika* egiteko..</i>	Ez	Bai

\*Metagenomika: Ingurugiroko lagin bateko DNAk sekuentziazioa, bertan dauden espezieak identifikatzea

# 11. GAIA: GAIXOTASUN GENETIKOAK

## 1. Gaixotasun monogenikoak

Gaixotasun monogenikoak, mutazioa gene bakar batean dutenak dira.

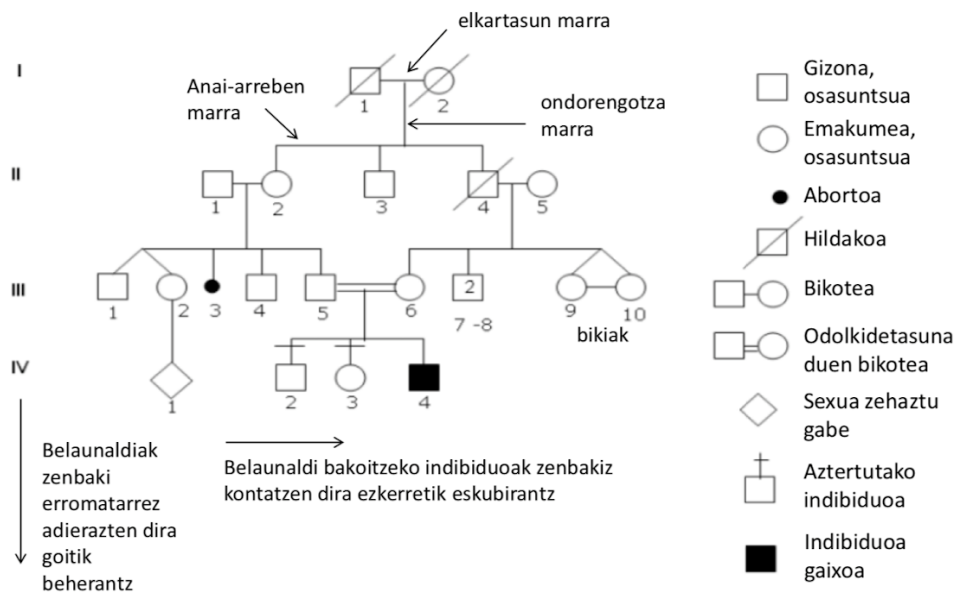


6.000 gaixotasun monogeniko baino gehiago deskribatu dira. Gaixotasun hauek herentzia mendeliarra jarraitzen dute:

- Autosomiko gainartzailea: mutaturako alelo bat nahikoa denean gaixotasuna azaleratzeko.
- Autosomiko azpirakorra: bi aleloak mutatura izan behar ditu gaixotasuna azaleratzeko.
- X kromosomari lotutakoa eta gainartzailea.
- X kromosomari lotutakoa eta azpirakorra.

Autosomikoak sexu zelulei lotuta ez dauden beste edozein kromosomari eragiten die.

Pedigree-n interpretazioa:



Karratuen bidez gizonezkoak adierazten dira, borobilekin, aldiz, emakumezkoak. Sexua ez denean ezagutzen errobo bat jartzen da.

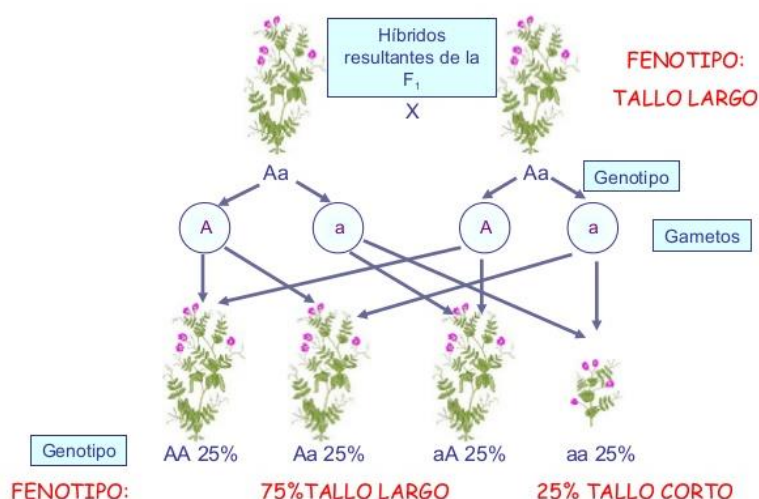
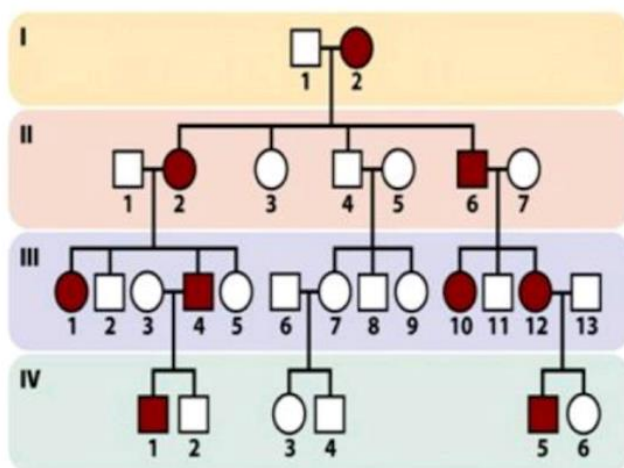
Tatxatuta (/) agertzen bada, hilda dagoela esan nahi du.

Karratu bat beltzituta edo borobila beltzituta pertsonak gaixotasuna duela esan nahi du.

Herentzia mendeliarra

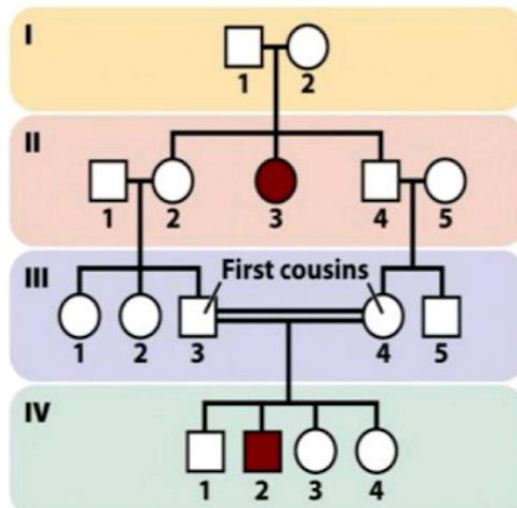
- **Gaixotasun autosomiko gainartzailea:** Berdin eragiten die gizonezkoei zein emakumezkoei. Gaixotasuna gainartzailea denez belaunaldi guztietan agertuko dira gaixotasuna duten pertsonak.

Pertsona gaixo guztiek guraso gaixoak dituzte, bietako bat gutxienez. Gaixoak normalean heterozigotoak izaten direnez, bikote osasuntsu betekin edukitako ondorengoak gaixoak izateko probabilitatea %50koa da.

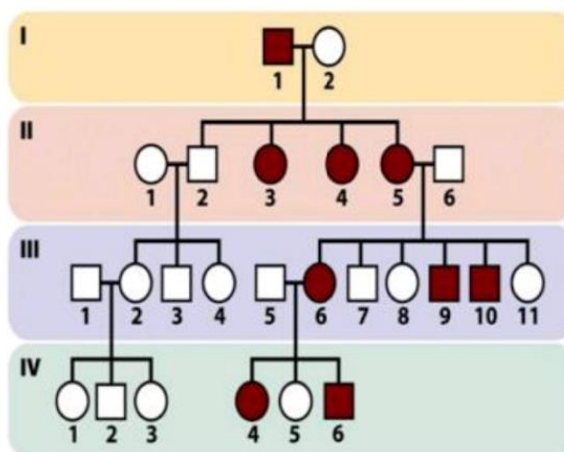


- **Gaixotasun autosomiko azpirakorra:** Berdin eragiten die gizonezkoei zein emakumezkoei. Belaunaldi batzuetan ez da gaixotasuna duen pertsonarik egongo, hau da, gaixotasuna ez da belaunaldi guztietan azaleratuko. Gaixotasuna indibiduo batek alelo mutatuaren bi kopiak dituenean azaleratzen da, hau da, mutazioarekiko

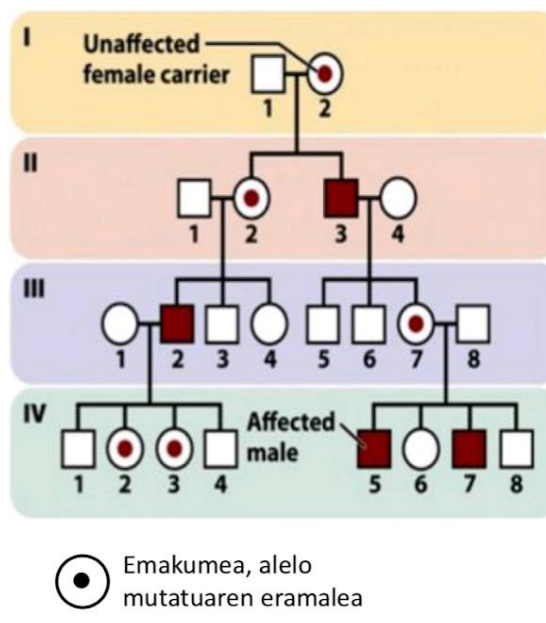
homozigotoa denean. Gaixoen gurasoak osasuntsuak izan daitezke, baina alelo mutatuaren eramaileak izango dira, hots, heterozigotoak izango dira. Guraso eramaileek ondorengo gaixo bat izateko probabilitatea %25ekoa da.



- **X kromosomari lotutakoa eta gainartzailea:** belaunaldi guztietan agertuko da gaixotasuna (gizonak XY direlako eta emakumeak XX). Emakumezkoetan arruntagoa izango da, emakumeek X kromosoma mutatua aitarengandik eta amarengandik jaso dezaketelako. Horregatik, gizonezko gaixoen alaba guztiek garatuko dute gaixotasuna.



- **X kromosomari lotutakoa eta azpirakorra:** belaunaldi batzuetan ez dira gaixoak egongo. Gaixoak batez ere gizonezkoak dira (emakumeak bi X ditugunez, 2ak mutatu beharko dira, aldiz gizonek bakarrik dutenez X mutatua izanik pertsona gaixoa izango da).



## 2. Gaixotasun poligenikoak eta multifaktorialak

Gaixotasun konplexuak dira. Gene ezberdinetan mutazio ezberdinak gertatzen dira. Ingurune baldintzek ere pisu handia daukate (kutsadura, elikadura, kirola egitea...). Oso zaila da aurreikustea zein izango den ondorengoaren genetika eta gaixotasun hauek pairatzeko izango duen probabilitatea.

Adibidez, diabetesa, hiperkolesterolemia, alzheimerra, minbizia...

- Gene batek kromosoman duen kokapen zehatz eta finkoa [Locus]
- Izaki batean beha daitezkeen karaktere-multzoa, bere genotipoak eta inguruneak baldintzatutakoa [Fenotipoa]
- Gene bereko bi aleloak berdinak dituen [Homozigoto]
- Locus bereko gen baten aldaerak [Alelo]
- Locus pluralean [Loci]
- Kromosoma bakoitzaren bi kopia dituztenak [Zelula diploidea k (2n)]

- Organismo baten konstituzio genetiko edo hereditarioa; kanpoko itxuraren ezaugarri-multzoa baldintzatzen duena. [Genotipoa]
- Kromosoma bakoitzaren kopia bakarra dutenak [Zelula haploide (n)]
- Gene bereko bi aleloak ezberdinak dituenak [Heterozigoto]

**Bakarkako 9. jarduera "Pedigree-n interpretazioa**



# 12. GAIA: DNA ERREKONBINATUAREN TEKNOLOGIA

## 1. Gertakari gako batzuk

- 1950's: DNA-ren egitura eta metabolismoaren aurkikuntza.
- 1970: murrizketa endonukleasen aurkikuntza. Hauek, DNA errekonbinantearen teknologiarako ezinbesteko osagaiak izango dira.
- 1972: Birusaren DNA, bakteriatan DNA-n txertatzea.
- 1977: DNA-ren sekuentziazioa (Sanger). Normalean DNA errekonbinantea sortzen denean ondoren sekuentziatu egiten da benetan sortu dugun DNA guk nahi dugun moduan errekonbinatu dugula ziurtatzeko.
- 1981: Sagu transgenikoa: transgenikoa organismo bati berarekin sexualki konpatiblea ez den organismo baten gene bat txertatzea da.
- 1982: E.coli bakterioan intsulinaren sintesia. Gizakietatik isolatu zen intsulina sortzen zuen genea eta honen DNA sekuentzia bakterioetan sartu zen milaka aldiz erreplikatu eta guk nahi genuen proteina, kasu honetan intsulina, sintetizatzen.
- 1983: Landare transgenikoa.
- 1985: PCR-aren asmakizuna.
- 1997: Nukleo transferentzia bidez animalia osoaren klonazioa: Dolly ardia. Animalia heldu batetik bere klon sortu zen.

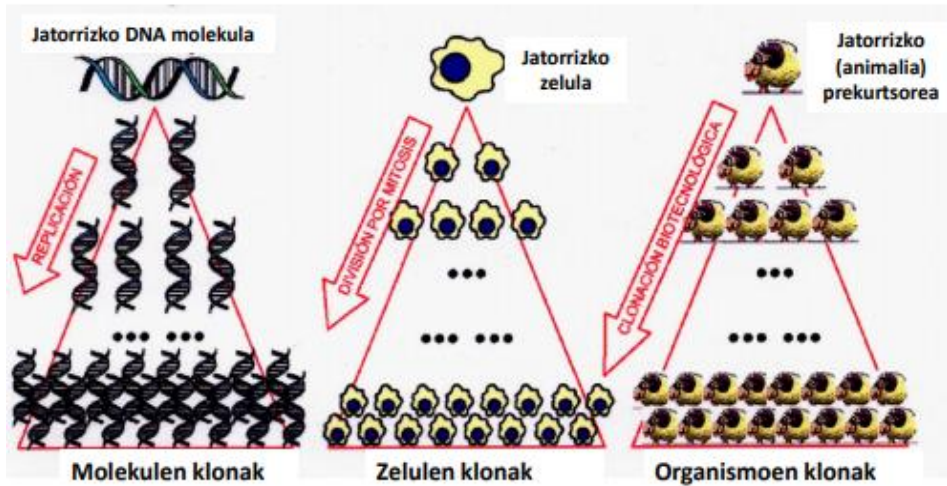
Gai honetan klonazioaz hitz egiten dugunean ez diogu Dolly ardiaren klonazio motari erreferentzia egingo.

## 2. Klonazioa

Klona=genetikoki kopia identikoa. Beraz, gauza askoren klonazioa egin daiteke. Guk irakasgai honetan molekulen klonazioaz arituko gara.

Klonazio desberdinak:

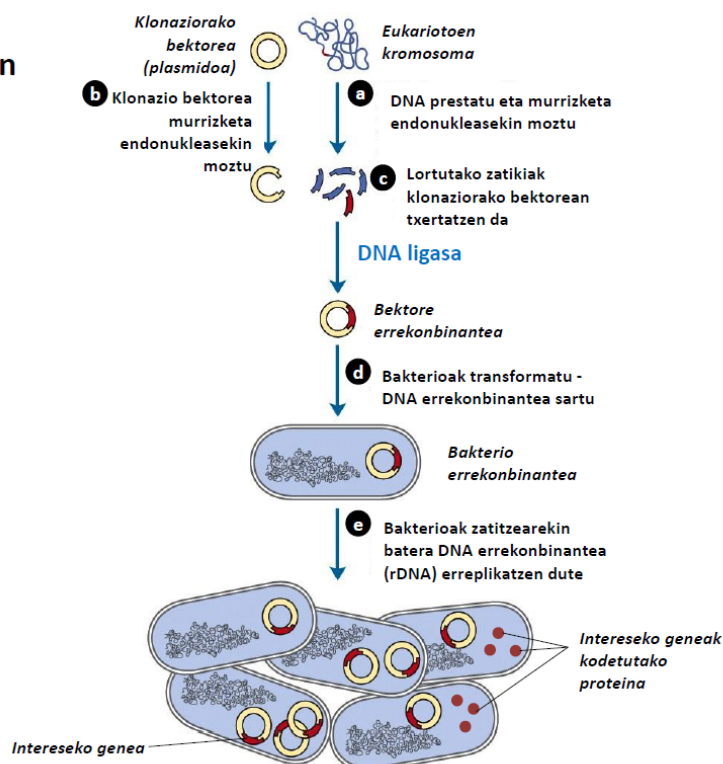
- *In vitro* molekulen klonazioa: PCR.
- *In vivo* zelulen klonazioa: material genetiko bera daukaten zelulen erreplikazioa (mitosia).
- *In vitro* organismoen klonazioa: nukleo transferentzia. Ondorengoaren genoma jatorrizkoaren bera.



Bakterioak erabiltzen ditugu DNA errekonbinantearen (guk sortutakoaren) milaka kopia egiteko. Nola egiten da?

Adibidez: guk gene bat isolatu nahi dugu eta ondoren honen milaka kopia egin nahi ditugu.

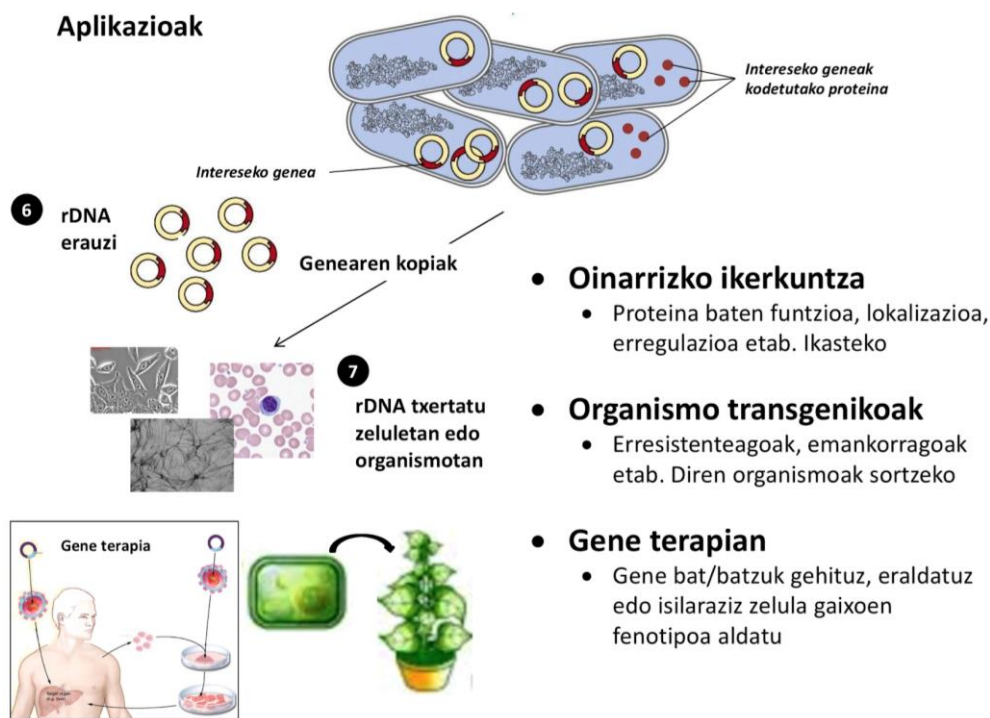
### DNA errekonbinantearen teknologia & klonazioa



Klonazioan, **bektorea** beti agertzen den osagai bat da. Normalean, plasmidoa erabiltzen da horretarako. DNA zirkularra da, zeinetan guk nahi dugun DNA zatiki bat txertatzen dugun. Honetarako, ezinbestekoa da murrizketa endonukleasa baten bitartez DNA zirkularra moztea, zabaltzeko. Plasmidoaren muturra eta klonatu nahi dugun fragmentuaren muturra osagarriak izan behar dira. Gorriz irudikatzen da guk klonatu nahi dugun fragmentua. DNA ligasaren laguntzaz lotzen dira jatorri desberdineko bi DNA fragmentuak. Behin lotuta daudela, DNA errekonbinantea dugula esan daiteke. Behin DNA errekonbinantea daukagula, guri

interesatzen zaiguna honen milaka kopia egitea da, bakterioak ugalduz (eta ez PCR bidez). Beraz, bektore errekonbinantea bakterioan sartu beharko dugu, bakterio errekonbinantea sortuz. Ondoren, ugaltu egingo dira hauek. Oso azkar hazten eta ugaltzen dira. Eta bakterio bakoitzak bere burua bikoizten duenean bere material genetikoa ere bikoizten du. Hori dela-eta, DNA errekonbinantea ere milaka aldiz bikoiztuko da.

DNA errekonbinantearen aplikazioak:



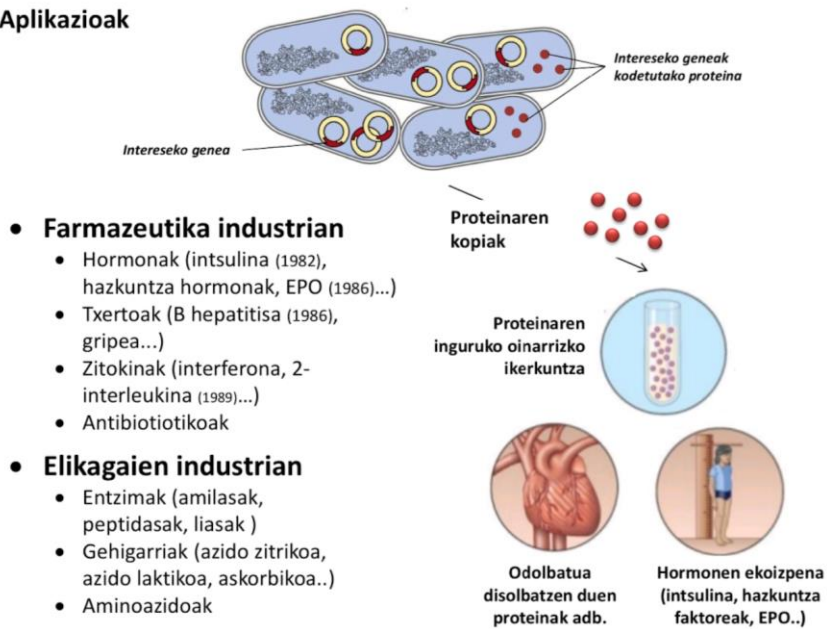
DNA errekonbinantea bakterioetatik erauzten da giza zeluletan sartzeko (baina ez organismo mailan, kultibo mailan baizik). Oinarrizko ikerkuntzan asko egiten da hau, proteina baten funtzioa, lokalizazioa, erregulazioa... ikertzeko.

Nekazaritzan DNA errekonbinantearen teknologia uztan hobekuntzak lortzeko erabiltzen da. Guk lortu nahi dugun fenotipoa lortzeko, interesatzen zaigun genea zein den jakin behar dugu, eta ondoren klonazioa egin.

Gene terapian ere erabili ohi da, gene bat edo batzuk gehituz, eraldatuz edo isilaraziz zelulen fenotipoa aldatzeko.

Inmunoterapia norberak sistema immunologikoa suspertzean datza. Minbizian hau asko egiten da. Kontua da minbizi zeluletan, sistema immunologikoko zelulak inaktibatuta daudela minbizi zelulak botatzen dituzten zitokinen ondorioz. Orduan, gaixoaren tumore zelula bat gorputzetik ateratzen zaio eta bertatik immuno zelulak isolatzen dira. Hauek aktibatu eta era masiboan ugaltzen dira. Azkenik, berriz ere gaixoari txertatuko zaizkio zelula aktibatu hauek, eta hein batean minbizi zelulei aurre egingo dio gaixoak.

**Aplikazioak**



• **Farmazeutika industrian**

- Hormonak (intulina (1982), hazkuntza hormonak, EPO (1986)...)
  - Txertoak (B hepatitis (1986), gripea...)
  - Zitokinak (interferona, 2-interleukina (1989)...)
    - Antibiototikoak

• **Elikagaien industrian**

- Entzimak (amilasak, peptidasak, liasak )
- Gehigarriak (azido zitrikoa, azido laktikoa, askorbikoa..)
- Aminoazidoak

Hortaz gain, askotan erabiltzen dira bakterioak guk nahi dugun produktua eskuratzeko. DNA errekonbinantearen bidez egiten da hau, DNA isolatu eta bakteriora sartzen da erreplikatu ahal izateko. Adibidez, hormonak (intulina), txertoak (B hepatitis), zitokinak (interferona, 2 interleukina), antibiototikoak... lortzeko erabiltzen da.

2.1 Klonazioaren osagaiak:

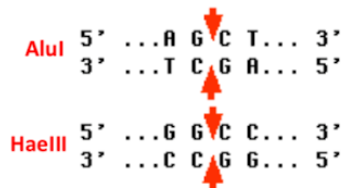
- **Murrizketa endonukleasak:** sekuentzia palindromikoak ezagutzen dituzte, itu sekuentziak ezagutzen dituzte ondoren beraiek mozteko.

Bi motatako murrizketa endonukleasak daude:

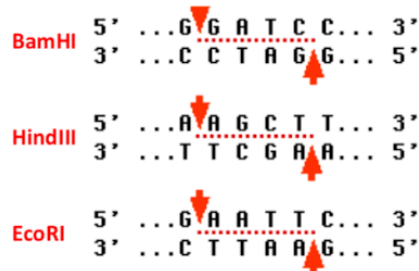
- Mutur kamutsak uzten dituztenak.
- Mutur itsaskorrek uztertzen dituztenak.

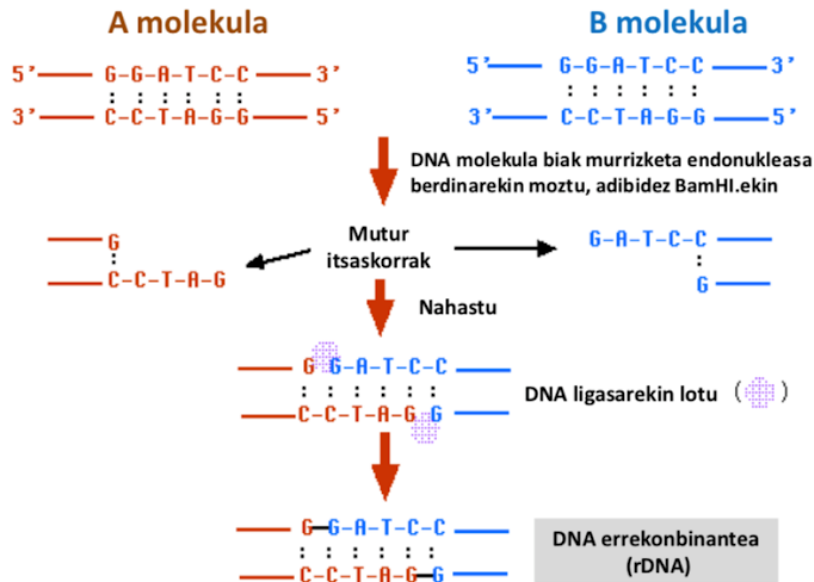
Bi muturrak murrizketa endonukleasa berak mozten baditu ez da arazorik egongo, bi muturrak osagarriak izango dira. Murrizketa endonukleasak DNA errekonbinantea eraikitzeko erabiltzen dira.

*Mutur kamutsak uzten dituztenak*



*Mutur itsaskorrek uztertzen dituztenak*

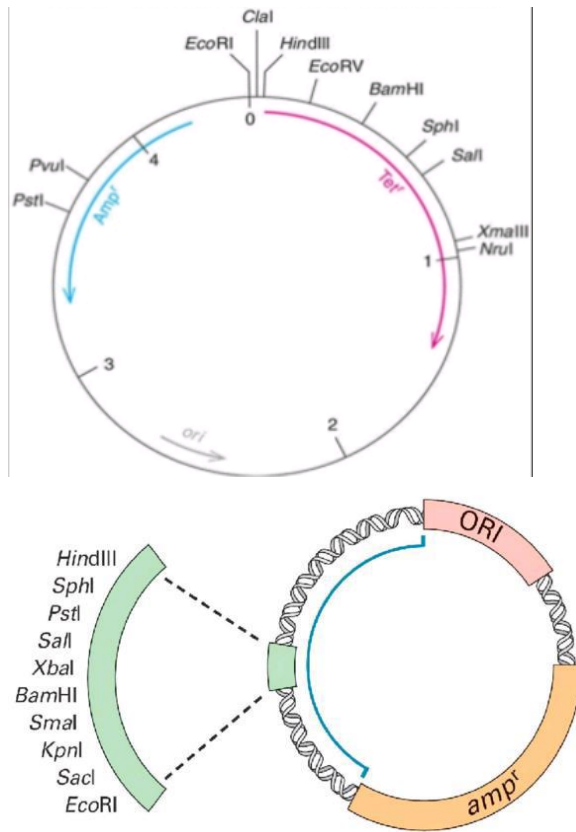




- **Bektoreak:**

Harizpi bikoitzeko DNA zirkularrak dira. Modu autonomoan erreplikatzeko gaitasuna dute, hau da, nahiz eta bakterioa ez zatitu erreplikatu egin daitezke. Isolatzeo errazak dira, txikiak baitira (plasmidoak dira txikiak). Gutxienez, oinarriko hiru osagai dituzte guztiek:

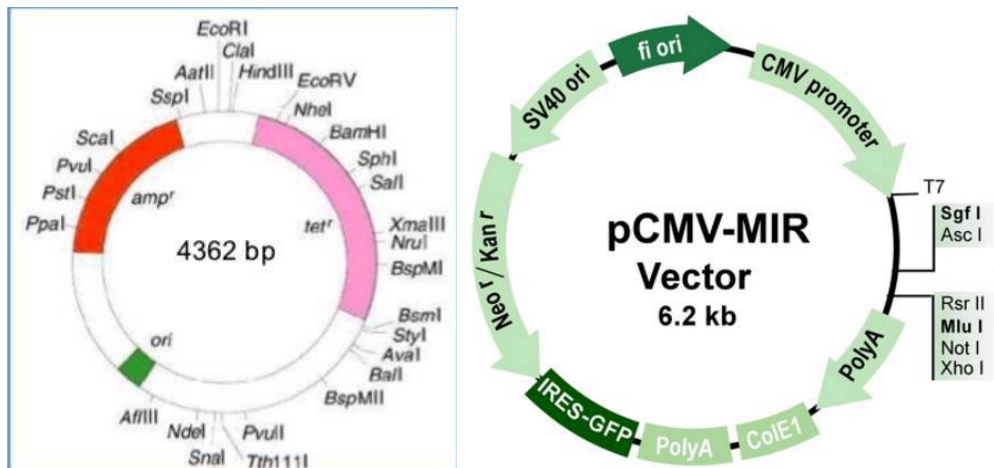
- **OriC gunea:** bakterioen errepikazioaren hasiera gunea. Ezinbestekoa da gunea hau egotea, molekula erreplikatzeko.
- **Hautatuak izateko markak:** bektoreetan tipikoki antibiotikoarekiko erresistentzia ematen dion genea egon behar da, zein bakterioak eskuratzen duen bektorea jakin ahal izateko. Adibidez, nire bektoreak anplizilina antibiotikoarekiko erresistentzia badauka, antibiotikoa dagoen medioan hazteko gaitasuna edukiko du. Hartaz, kultibo medioan anplizilina jarritz, hazteko gaitasuna duten bakterioak bektoredunak izango dira. Horrela, bektoreak barneratu dituzten bakterioak identifikatuko ditugu. Honetarako erabiltzen diren geneen zenbait adibide: anplizilinarekiko erresistentzia genea Amp<sup>R</sup> edo tetraziklinarekiko erresistentzia genea Tet<sup>R</sup>.
- 
- **Murrizketa endonukleasak mozteko lekuak** (“multiple cloning site” (MCS) edo “polylinker site”): Bektoreak, murrizketa endonukleasak moztu dezaketen sekuentzia asko dituen gunea bat izango dute. Murrizketa endonukleasa bakoitzak ordea, sekuentzia bakar bat moztuko du.



Bektore mota desberdinak daude:

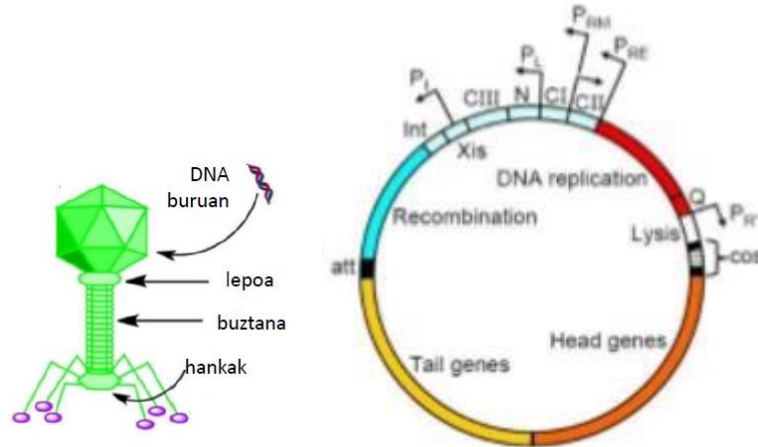
- Plasmidoak:

Bakterioek izaten dituzten harizpi bikoitzeko DNA molekula zirkularrak dira. Bektorerik txikienak dira, kb gutxi izaten baitituzte (100 kb bitarteko tamaina). Plasmidotan 10 kb-rainoko DNA zatikiak txertatu daitezke. Bakterioak zatitu ahala plasmidoa ere zatitu egiten da, eta plasmidoak erraz eskuratu daitezke bakterioak lisatuz eta DNA purifikatuz. Plasmidodun bakterioak glizeroletan -70°C-tan gorde daitezke betiko plasmidoa kaltetu gabe.

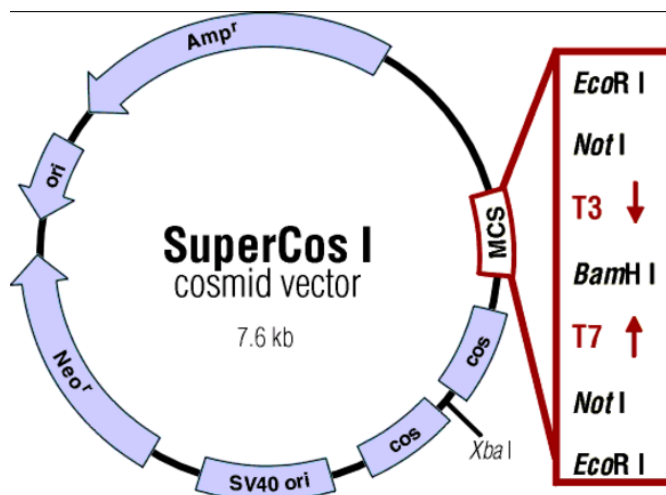




- Bakteriofagoen bektoreak: Lambda fagoaren bektorea da ohikoena. Bakterioak infektatzen ditu. Fagoaren genomaren 60% beharrezkoa da eta beharrezkoak ez diren zatikiak intereseko DNA-rengatik ordezkatzeko dira. Plasmidoak baino 1000 aldiz eraginkorragoak dira bakterioetan txertatzeko, baina kontu handiagoarekin ibili beharko dugu. 23 kb-rainoko DNA zatikiak txertatu daitezke bektore mota hauetan, handiagoak direlako.



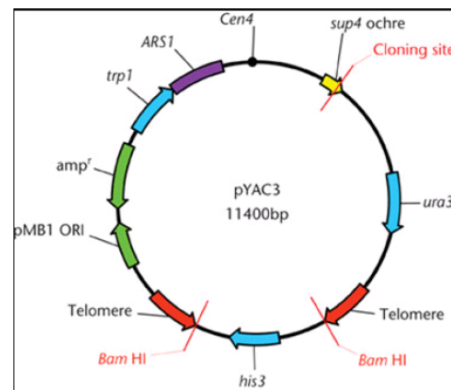
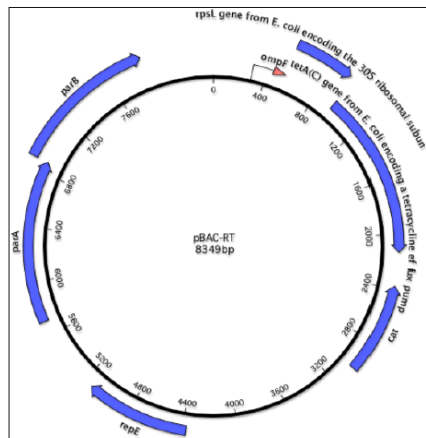
- Kosmidoak: Plasmidoen eta lambda fagoen ezaugarriak uztartzen dituen bektorea da. Bi bektoreen ezaugarriak izango ditu:
  - Alde batetik, OriC lekua eta antibiotikoenganako erresistentea den genea izango ditu (plasmidoen ezaugarria). Gainera, plasmidoak bezala berreskuratu eta gorde daitezke.
  - Lambda fagoaren Cos sekuentzia izango du, eta honek emango dio forma zirkularra. Horretaz gain, Lambda fagoaren bidez txertatzen da bakteriotan. Dena den, kosmidoak ez ditu fagoaren proteinak kodetuko. 30-46 kb bitarteko DNA zatikiak txertatu daitezke bertan, orain arte ikusi dugun kantitate handiena.



- Kromosoma artifizialak:  
Bi motatakoak daude:
  - BAC (bacterial artificial chromosome): 300 kb-rainoko DNA zatikiak txertatu daitezke bertan.
  - YAC (yeast artificial chromosome): 2 Mb-rainoko DNA zatiak txertatu daitezke bertan.

**BAC, bacterial artificial chromosome**      **YAC, yeast artificial chromosome**

- 300 kb.rainoko DNA zatikiak txertatu daitezke bertan
- 2 Mb.rainoko DNA zatikiak txertatu daitezke bertan



Giza genoma proiektua (2003): giza genoma zatiak moztu eta zati bakoitza BACetan ordezkatu eta sekuentziatu ziren. Ondoren programa informatikoen bitartez zatiak ensanblatu egin ziren (hau da, puzzlea egin). Hau honela egin zen oraindik ez zeudelako NGSak (second generation sequencing).

**Azido nukleikoak:**

Klonazioaren helburuaren arabera, bektorean txertatzen den azido nukleikoa mota batekoa edo bestekoa izango da. Klonatu nahi den azido nukleiko motaren arabera, honen prestaketa prozesua ezberdina da. (2.2.a atalean ikusiko dugu).

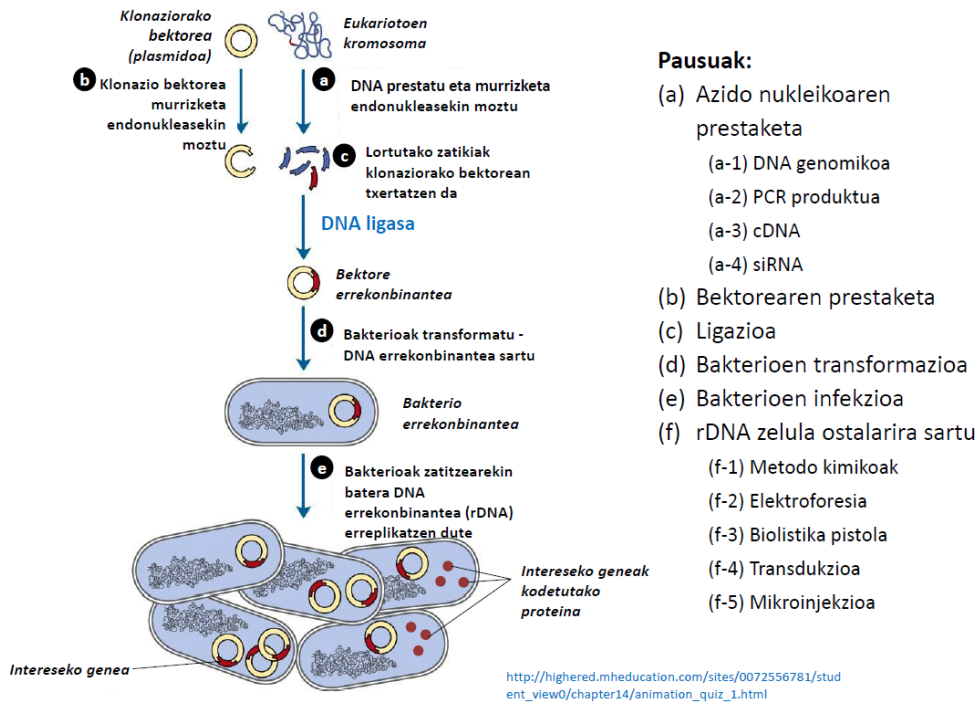
Helburua	Klonatu nahi den azido nukleiko mota
Genoteka bat eraiki	1.1. DNA genomiko osoa
Adb. Sustatzaile baten erregulazioa ikastea	1.2. PCR produktua
Proteina bat kodetzen duen gene bat adieraztea zeluletan	1.3. cDNA
Proteina endogeno bat isilaraztea	1.4. siRNA

Klonatu nahi den azido nukleikoa:

- DNA genomikoa: zeluletatik erauzi eta purifikatutako DNA.
- cDNA: mRNAren alderantzizko transkripzio bidez, cDNA ekoizten da eta hau klonatzen dugu RT- PCR baten bidez, ondorioz zeluletara sartu dezakegu.
- Anplifikatutako DNA: PCR bidez lortutakoa.
- siRNA: oligoen hibridazioaren bidez lortutakoa.

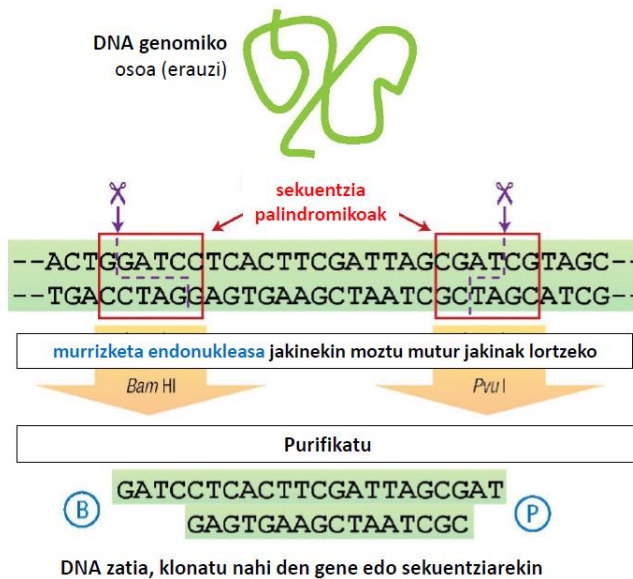
2.2 Klonazio prozesua:

Eskema orokorra:



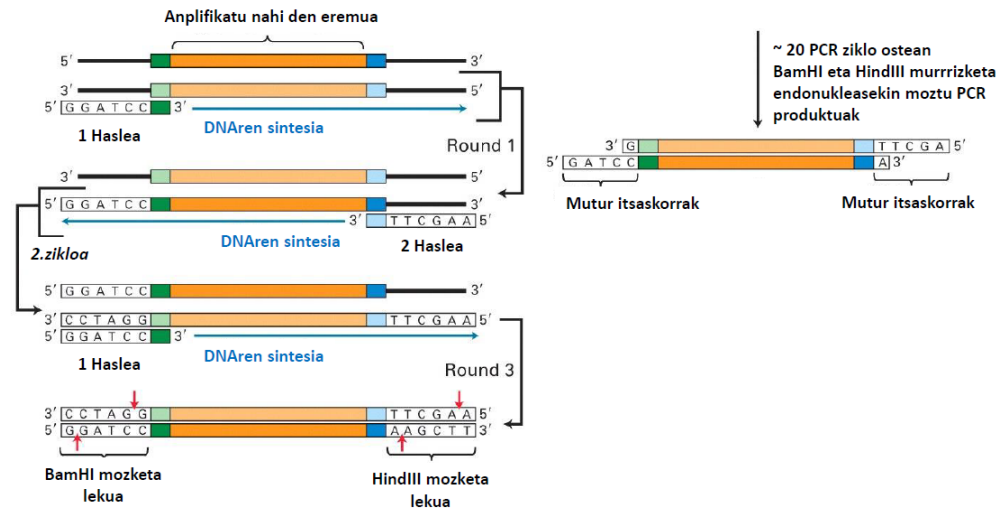
1. Azido nukleikoaren prestaketa:

- DNA genomiko osoa: Genoma bat ordezkatu behar badugu BACetan ondoren (genoma osoa osatzeko), DNA zatiak moztu egiten dira, murrizketa endonukleasaren bidez.

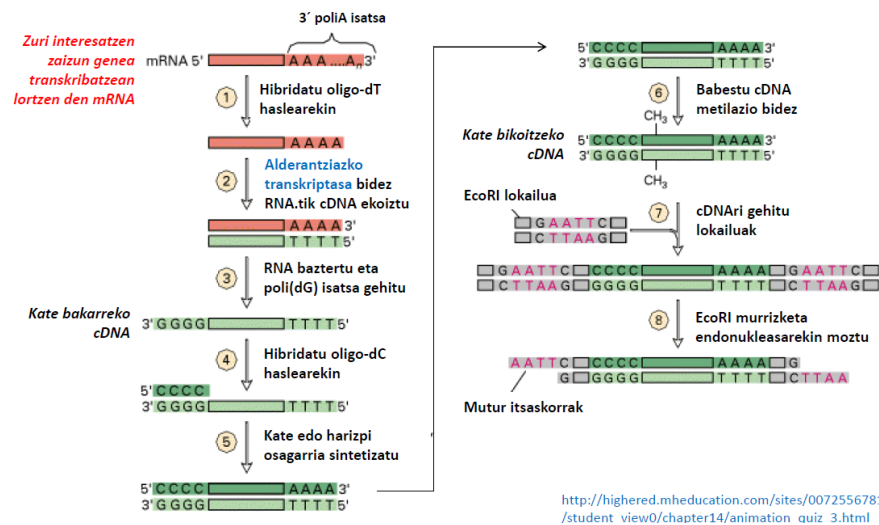


- PCR produktuen klonazioa: klonatu nahi den DNA zatikia PCR bidez anplifikatzen da. Hasleen muturretan murrizketa endonukleasen iturri sekuentziak daude. Hasleen diseinua beti bezala egiten da baina murrizketa endonukleasa batek moztuko duen sekuentzia bat izango du. Anplikoia

baditugu, moztu egingo ditugu murrizketa endonukleasa horrekin eta bektorea ere murrizketa endonukleasa berarekin tratatuko dugu.



- cDNA: alderantzizko transkriptasaren bidez mRNA cDNA bihurtzen da. Zuri interesatzen zaizun genea transkribatzean lortzen den mRNA-tik abiatuta cDNA sortu behar da lehenengo. Ondoren, hibridatutako haslearen bidez kate osagarria sortuko da. Azken produktu hon ertzetan kasete edo lokailuak lotzen zaizkie eta hauek moztu egin daitezke murrizketa endonukleasaren bitartez. Bektorea ere honela moztuko dugu. Pausu hau beharrezkoa da, izan ere, bakterioak ez dira gai introiak ezabatu eta exoiak irakurtzeko. Hori dela eta, gure gene bat "tal cual" bakterioari txertatzen badiogu, ez du ezertarako balioko.



- siRNA-ren klonazioa: siRNA diseinatzeko baliabide informatiboak erabiltzen dira. Hau harizpi bakarreko hasle nukleiko bat denez, ezin da ez erauzi, ez PCR bidez anplifikatu. Gene bat isilarazi nahi baduzu, gene hori isilarazten

duen siRNA diseinatzen duzu baliabide informatiko baten bitartez. mRNAtik cDNA atera eta ondoren, cDNA sartu eta programak siRNA sekuentzia onenak ematen dizkizu, baita klonaziorako bektore mota eta murrizketa endonukleasa egokiak ere.

Ondoren oligoak sortuko dira siRNA eta sekuentzia osagarria Loop batekin lotuz. Ostean, hibridatuko egingo dira harizpi bikoitza eratuz. Azken honek Pri. mRNA baten itxura izango du eta zelulak berea bezala hartuko du, prozesua aurrera eramanez.

Gero, aukeratutako murrizketa endonukleasekin moztu eta, azkenik, bektorean txertatuko dira.

Adib: *InvivoGene siRNA Wizard Software.*

Hairpin inserts for **psiRNA-DUO (cloning sites: Acc65I/HindIII)** expression vector

Construct siRNA #0 siRNA GC%: 47.62 Position: 187

Oligo 1

5' GTACCTTGAAGGCCATGAAGCAGTACTA CAAGAG TAGTACTGCTTCATGGCCTCTTTTGGAAA 3'

Isilarazi nahi dugun geneo mRNA-ra lotuko dena      loop      Sekuentzia osagarria

Oligo 2

5' AGCTTTTCCAAAA GAAGGCCATGAAGCAGTACTA TCTTGTGA TAGTACTGCTTCATGGCCTCTGAG 3'

BamHlekin moztuz gero geratuko liratekeen mutur itsaskorrek

BamHI

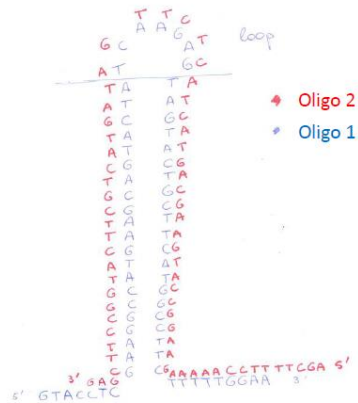
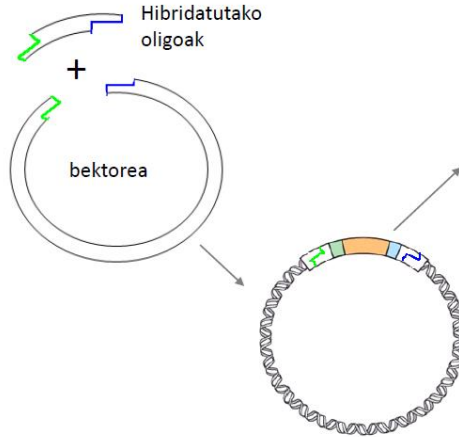
5'... GGATCC... 3'  
3'... CCTAGG... 5'

Oligoak hibridatu,

3' GAGCTTCCGGTACTTCGTCATGATAGTTTCTCATCATGACGAAGTACCGGAAGAAAAACCTTTTTCGA 5'  
 5' GTACCTCGAAGGCCATGAAGCAGTACTATCAAGAGTAGTACTGCTTCATGGCCTTCTTTTGGAA 3'

Eta aukeratutako bektorean klonatu

zeluletan transkribatzean siRNA-k hartuko duen itxura

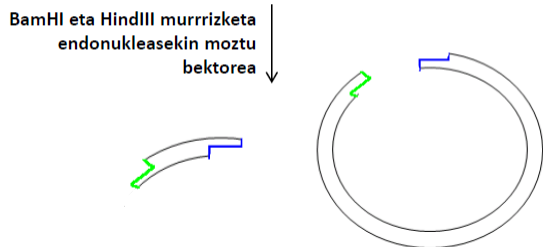
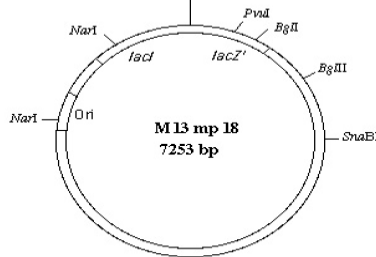
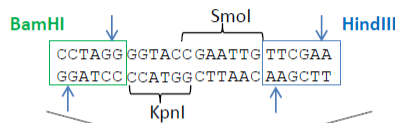


2. Bektoreen prestaketa:

Oso garrantzitsua da bektorearen eta bertan txertatu behar den DNA zatikiaren muturrak bateragarriak izatea, izan ere, horrela ez bada, gure DNA zatia ez da bektorean atxikituko eta hor ez da ezer gertatuko (gure DNArekin). Hori dela-eta, maiz murrizketa endonukleasa berdinekin mozten dira biak. Horretaz gain, kontuz erabaki behar da ze entzimarekin moztu behar diren intsertoa eta bektorea, batez ere, intsertoa bektorean zein zentzutan txertatzen den garrantzitsua bada. Horregatik, oso garrantzitsua da gure helburua presente izatea (eta argi).

Klonaziorako erabili nahi den bektorea

Bektorean txertatu nahi den DNA zatikia (intsertoa)



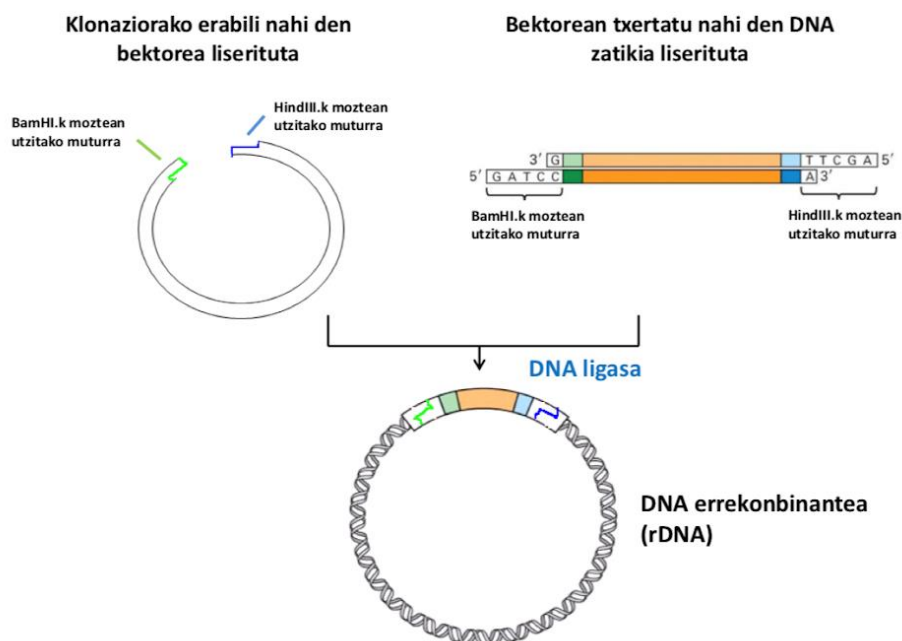
Bektorearen eta bertan txertatu behar den DNA zatikiaren muturrak **bateragarriak** izan behar dira.

- Maiz murrizketa endonukleasa berdinekin mozten dira
- Tentuz erabaki behar da ze entzimarekin moztu behar dira bektore eta intsertoak, batez ere, intsertoa bektorean zein zentzutan txertatzen den garrantzitsua bada (adb. intserto hori zeluletan transkribatu et adierazi nahi delako)



3. Azido nukleiko eta bektorearen arteko ligazioa:

Behin gure insertoa eta bektorea ditugula, ingurune berdinean jarri eta DNA ligasaren bitartez txertaketa emango da. Kontuz ibili behar gara bektorea lotu eta DNA zatia bereganatzen ez duela ez gertatzeko, askotan gertatzen baita hori. Hori gertatzen ez dela ziurtatzeko, teknika desberdinak erabiliko ditugu (hau identifikatzeko).

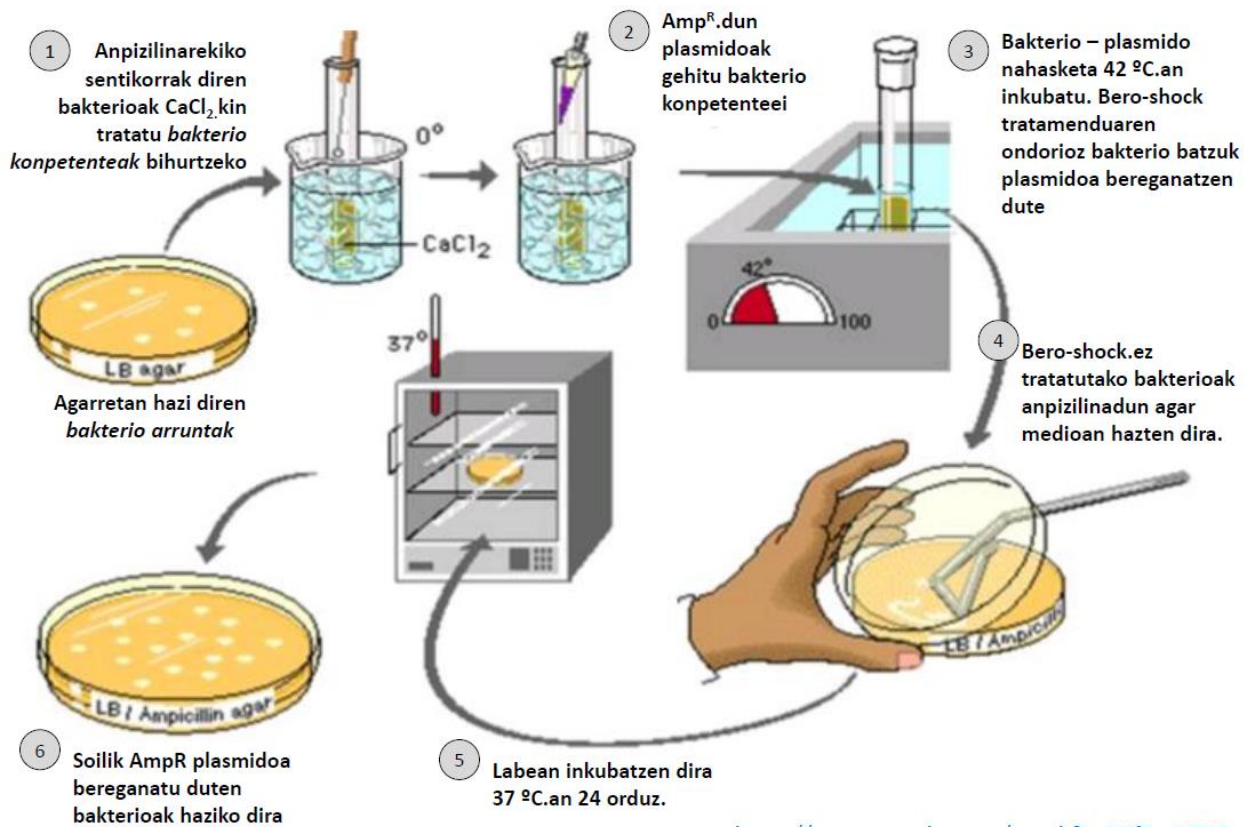


4. Bakterioen transformazioa:

Behin DNA errekonbinantea izanda, milaka kopia lortzeko bakterioak erabiltzen dira PCR baten ordean. Bektorea bakteriora sartzeari **transformazioa** deitzen zaio. Lehenengo bakterioa konpetente bilakatu behar da, hau da, prestatu egin behar da bektorea bertara modu eraginkorrean sartzeko, mintza ahulduz.

DNA errekonbinantea eta bakterioak saihodi batean sartzen dira eta uezko bainuan 42 gradutan 30s edukitzen ditugu. Hortik zuzenean izotzetara sartuko dugu. Tenperatura aldaketak (giro tenperaturatik 42 gradutara), mintzean porotxoak sortzen ditu eta DNA errekonbinantea sartzen da. Ondoren, izotzetan jartzean itxi egiten dira bakterioak, mintza uzkuritu egiten delako. Behin bakterioek DNA errekonbinantea eta bakterioak elkartu direla, prozesuaren etekina %100-ekoa ez denez, DNA bereganatu ez duten bakterioak baztertu behar ditugu. Horretarako, DNA errekonbinantea bereganatu duten bakterioak antibiotikoei erresistentzia izaten dutenez, bakterioak antibiotiko hori duen agar medioan hazten dira. DNA errekonbinanteak ez dutenak ez dute erresistentzia izango eta beraz soilik DNA errekonbinanteak dutenak haziko dira.

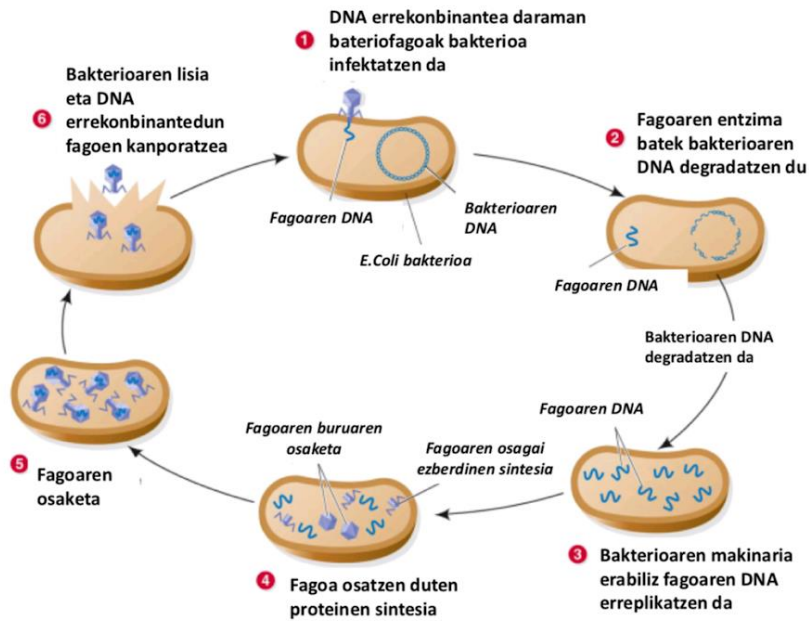
Behin hau guztia konprobatuta, labe batean sartzen dira inkubatuz eta koloniak sortzen dira. Hortik lagin bat hartu eta bakterioak erreplikatzeko dituen medio batean jarriko ditugu milaka kopia izateko.



- Bakterioen infekzioa (bakteriofagoen bektoreekin):

Guk sortutako DNA errekonbinantea duen bakteriofagoak bakterio bat infektatuko du. Bakterioak bere burua era masiboan erreplikatu ordez, bakterioaren DNA degradatu egingo da. Horren ordez, bakterioaren makinaria erabiliz, fagoaren DNA erreplikatuko da.

Milaka aldiz erreplikatuta daukagun DNA errekonbinantea, bakterioetatik era masiboan lortu duguna zelula eukariotikoetan sartuko dugu, baina hau zailagoa da. Metodo hau aurrekoa baino efizienteagoa da, baina baita arriskutsuagoa ere.

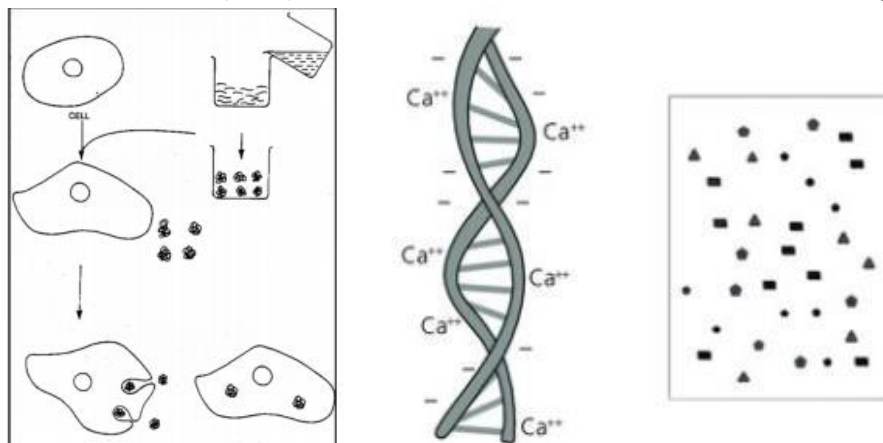


- rDNA zelula ostalarira sartu:

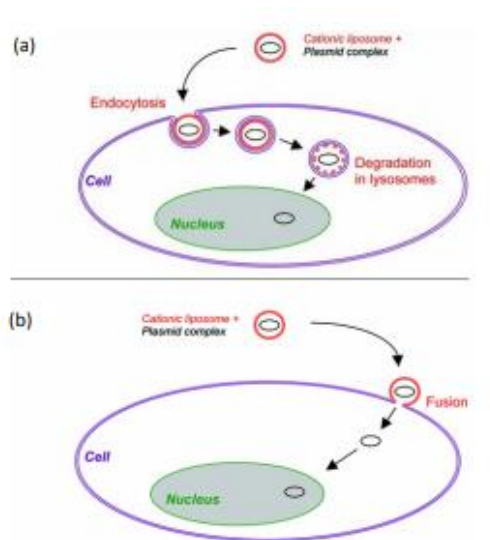
Behin DNA errekonbinantea izanda, helburu desberdinak izan ditzakegu. Adibidez, zelula eukariotoetan sartzea. DNA hori zelula eukariotoetan sartzeari transfektatzea deritzo.

**Metodo kimikoak** transfektatzeko errazak diren zeluletan erabiltzen dira, merkeenak dira eta plasmido txikiak transfektatzeko erabiltzen dira.

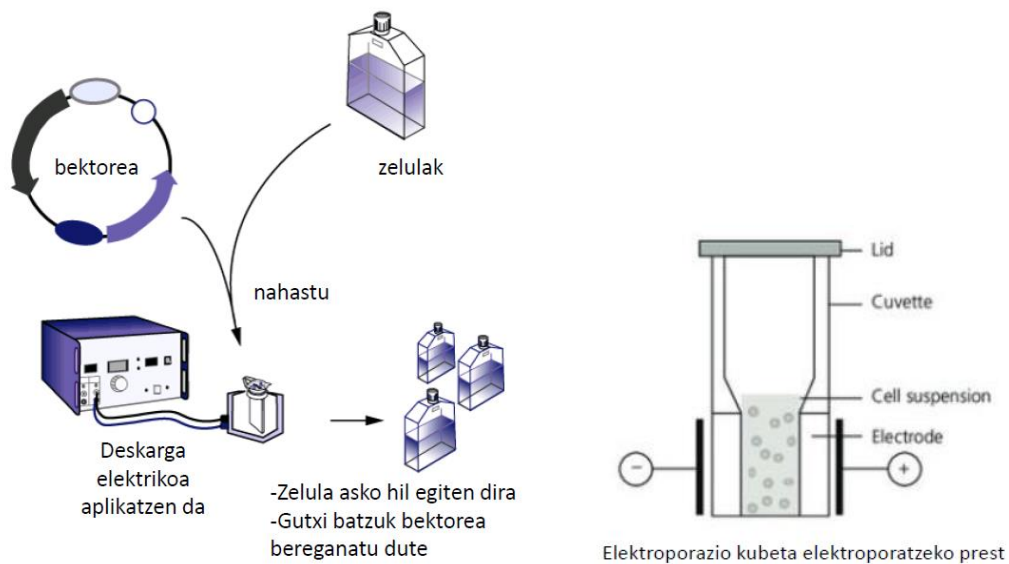
- Kaltzio fosfato bidezko DNAREN prezipitazio metodoa: Kaltzio fosfato disoluzio batean sartzen da DNA errekonbinantea eta disoluzio hauetan kristalak sortzen dira, hau prezipitatu eta zelulak, kristal hauek barneratzeko gai dira.



- Lipofekzioa: lipidoz egindako egitura baten barruan sartuko da DNA. Behin egitura hau izanda, zelulak endozitosiz (edo zelula bakoitzak bere modura) bereganatuko du. Behin zelula barnean egonda, lipidozko egitura desegin eta gure DNA zelulan solte geldituko da. Teknika hau nahiko garestia da.



**Elektroporazioa** transfektatzeko zailak diren zeluletan erabiltzen da, linfzitoetan esaterako. Plasmido handiak transfektatzeko balio du. Guk sortutako DNA errekonbinantea eta zelulak Ependorff batean jartzen ditugu. Segundo batean deskarga elektrikoa ematen da, linfzitoen mintzetan zulotxo txiki-txiki batzuk eratuz segundo batez, DNA errekonbinantea bertatik sartu dadin. Zelulen gehiengoa hil egiten da (kixkaldu egiten dira), gutxi batzuk soilik bereganatuko dute bektorea; dena den, normalean esperimientua aurrera eramateko nahikoa da zelula gutxi horiek erabiltzea.

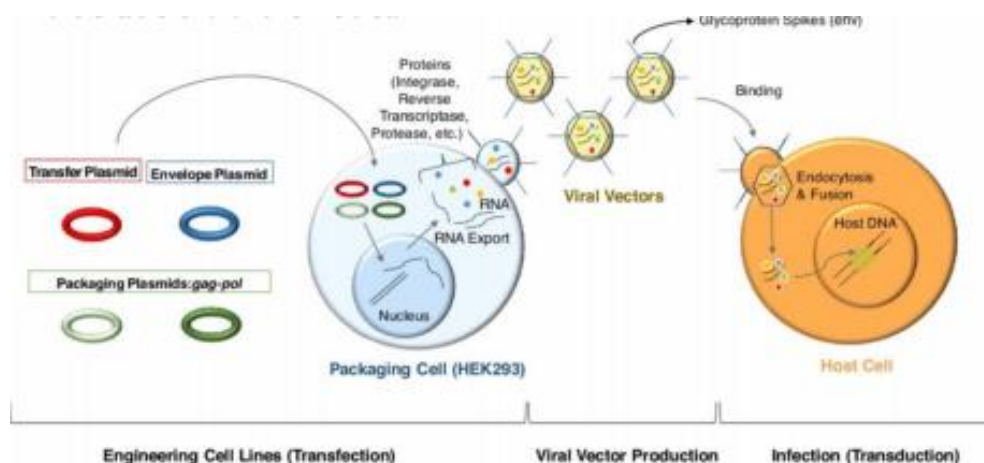


**Biolistika pistola:** urre edo beste metal batzuekin estaltzen da DNA errekonbinantea eta DNA hau bonbardeatu egiten da guk nahi dugun zelula edo ehunera pistolaren bitartez. Zelula primarioekin (neuronak) edo kultibo organotipikoetan erabiltzen da teknika hau, eta organo bat simulatzeko erabiltzen dira zelula multzo hauek. Zelula desberdinak daudenez (mintz desberdinak dituztenak), zailtasun desberdina izango dute DNA bereganatzeko. Horregatik erabiltzen da pistola.



**Birus bidezko infekzioa (transdukzioa):** birusak erabiltzen dira zelula eukariotoak infektatzeko. Zelulak egonkorki transfektatu nahi direnean erabiltzen dira birusak, hau da, DNA errekonbinantea betirako txertatu nahi bada. Izan ere birusak bere genoma balitz bezala tratatuko du DNA errekonbinantea. Bi fasetan egiten da:

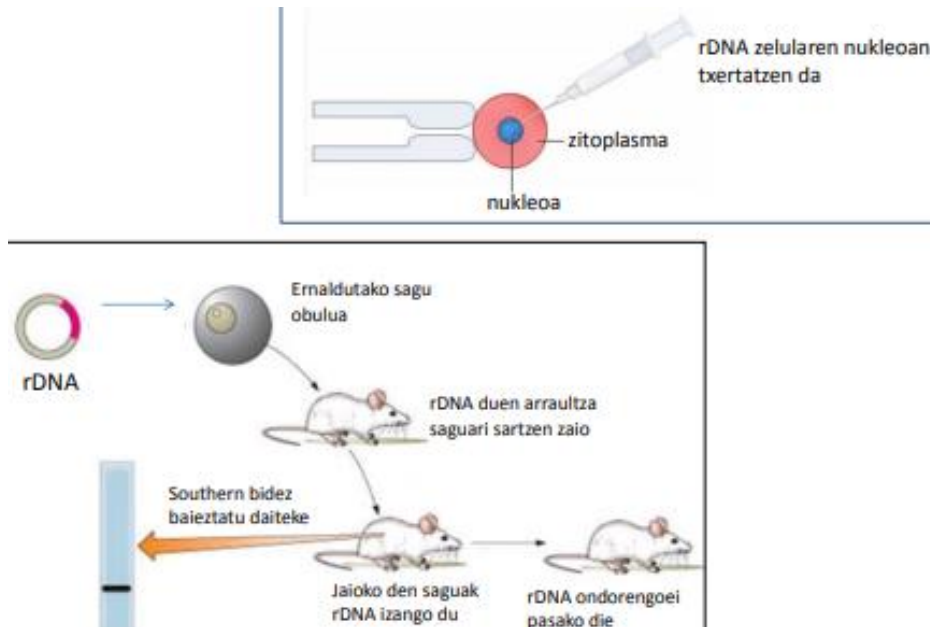
- Lehenengo fasea: birusa eraikitzeke behar diren plasmidoak, eta guk sortutako DNA errekonbinantea, denak batera, lerro zelular batean transfektatuko dira. Denbora pasatakoan, birus pila bat ekoiztea eta hauek gure DNA errekonbinantea edukitzea lortuko dugu.
- Bigarren fasea: eratutako birus guztiak hartu eta transdukzio bidez gure itu zelula infektatzeko erabiliko dira. Birus batek zelula bat infektatzen duenean bere material genetiko guztia txertatzen du.



Bakteriofagoak ere erabiltzen dira prozesu honetan.

**Mikroinjekzioa:** Guk sortu dugun DNA errekonbinantea organismo batean sartzea nahi badugu, bere zelula guztietan sartu beharko dugu. Horretarako, ernaldutako obulu batean sartzen da DNA errekonbinantea eta hau ondoren ernaldu eta organismoa sortzean, zelula guztiek izango dute DNA errekonbinantea.

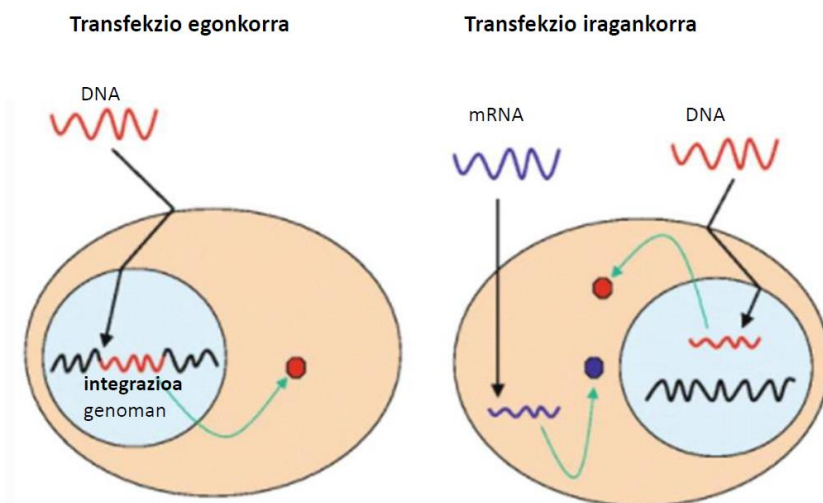




DNA errekonbinantea zelula batean sartzean bi helburu izan ditzakegu:

- Transfekzio egonkorra: gure DNA errekonbinanteak zeluletan epe luzera begira izan dezaketen eraginak aztertzea.
- Transfekzio iragankorra: transfekzioa egin eta asko jota 96 ordutara desagertu egingo da DNA hau.

(taula behean)



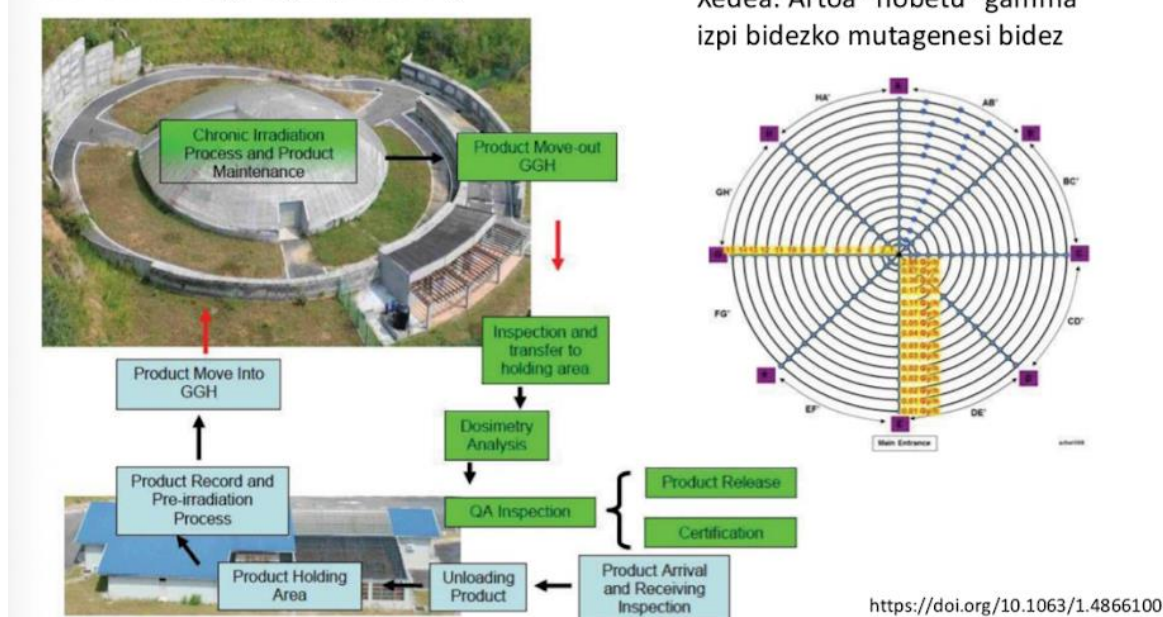


	Konstruktoaren espresio iragankorra	Konstruktoaren espresio egonkorra
Espresioaren iraupena	Gehienez 72h	Epe luzez (hilabeteak, edo urteak)
Transfekzioa metodoa	Kimikoa edo elektroporazioa	Kimikoa edo birusen bidezkoa eta ondoren, droga edo antibiotiko bidezko hautespena
Erabilgarria..	Geneen aktibitatea eta erregulazioa aztertzeko	Gene baten galderak edo gehiegizko adierazpenak epe luzean eragin ditzakeen efektuak aztertzeko
Transfektatutako DNA zelula ostalariaren DNAn txertatzen da	Ez	Bai, baina txertaketa ez espezifikoa da

#### 4. Mutagenesia

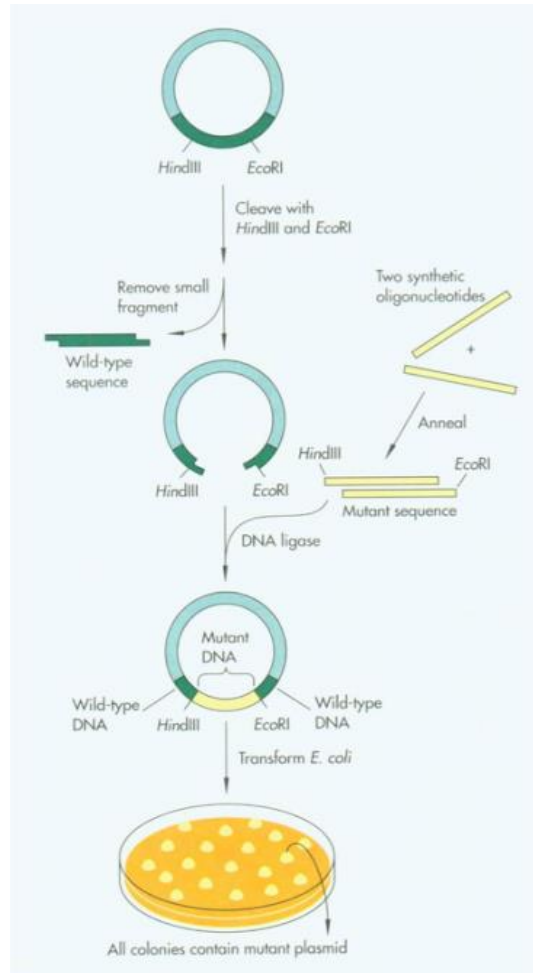
**Zorizko mutagenesia** mutageno fisiko edo kimikoak erabiltzearen ondoriozko mutazioak dira. Mutazioak edonon eta edonolakoak izan daitezke. Adib: gamma negutegia (malasian): honen helburua gamma izpi bidezko mutagenesi bidez artoa "hobetzea" da. Kasu honetan "ensayo error" moduko saiakera egiten da, eta mutazioaren ondoren, ez dugu zehazki jakiten gertatu den mutazioa nolakoa den.

Adb. Gamma negutegia (Malasian)

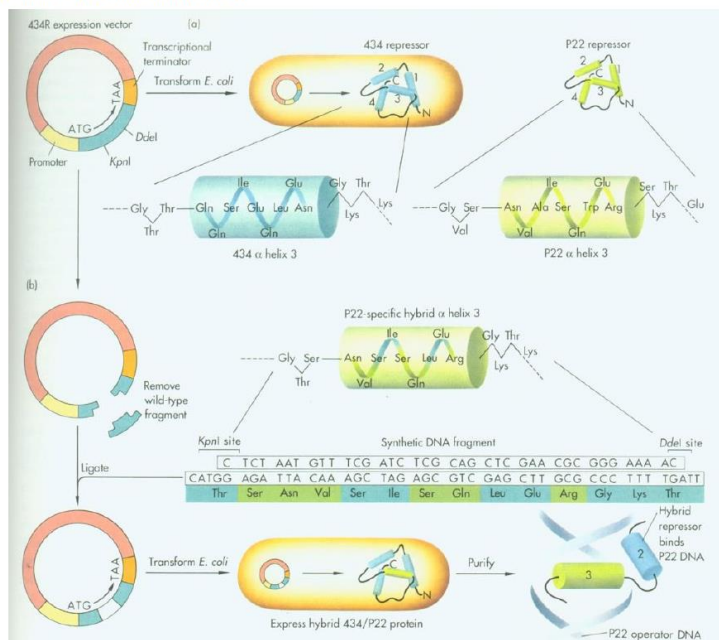


**Mutagenesi zuzendua** (edo site directed) bada, mutazioa leku konkretu zehatz batean egingo da, era kontrolatuan. Mutagenesi zuzendua kasete bidez, oligonukleotido bidez edo PCR bidez egiten da.

- Kaseten bidezkoa da errazena, baina ezin da beti egin. Lokalizatu egingo dugu mutatu nahi dugun sekuentzia eta murrizketa endonukleasen bidez kenduko dugu. Behin sekuentzia kenduta, sekuentzia horren bertsio mutatua sartuko dugu, DNA ligasez lotuko da.



Adb. Kasete bidezko mutazioa



- **Oligonukleotidoen bidezko mutagenesia:** Bektoreak harizpi bakarria izan behar du, hala ez bada, entzima berezi batzuek bihurtuko dute harizpi bakarrekia. Hasle bat diseinatuko dugu, ez du zertan %100 osagarria izan itu sekuentziarekiko (osagarritasun eza nukleotido gutxi batzuetakoa izango da), baina berdin berdinean jokatu du. Hala, harizpi bikoitzeko heteroduplexoa sortzen da (harizpi bakoitzak jatorri desberdina). DNA heteroduplexoa bakteriora sartzen da, bakterioak bikoiztu egingo du, bi molde desberdin izango ditugu, haslea ez baitzen berdinean, eta ondorioz bi DNA desberdin sortuko ditu, bat hasierako DNAREN berdinean izango dena (beheko argazkian morea) eta aldiz bestea mutatu (urdina, mutazioa gorri adierazita).

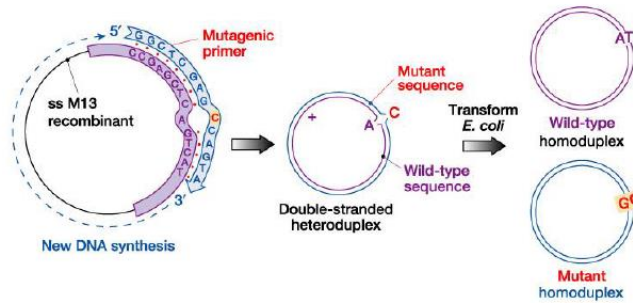
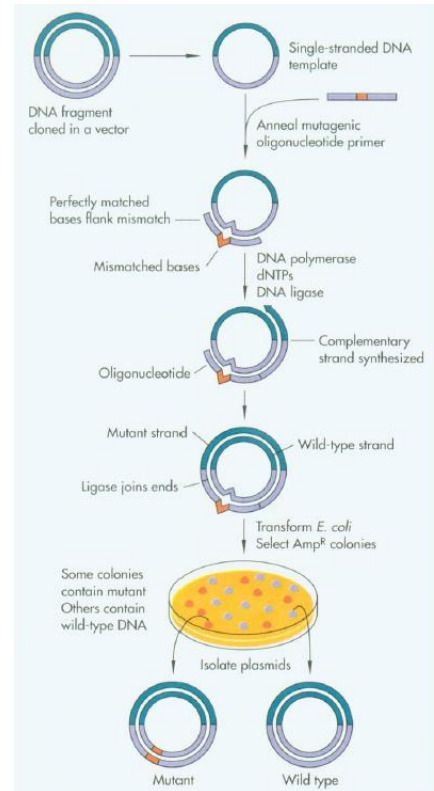
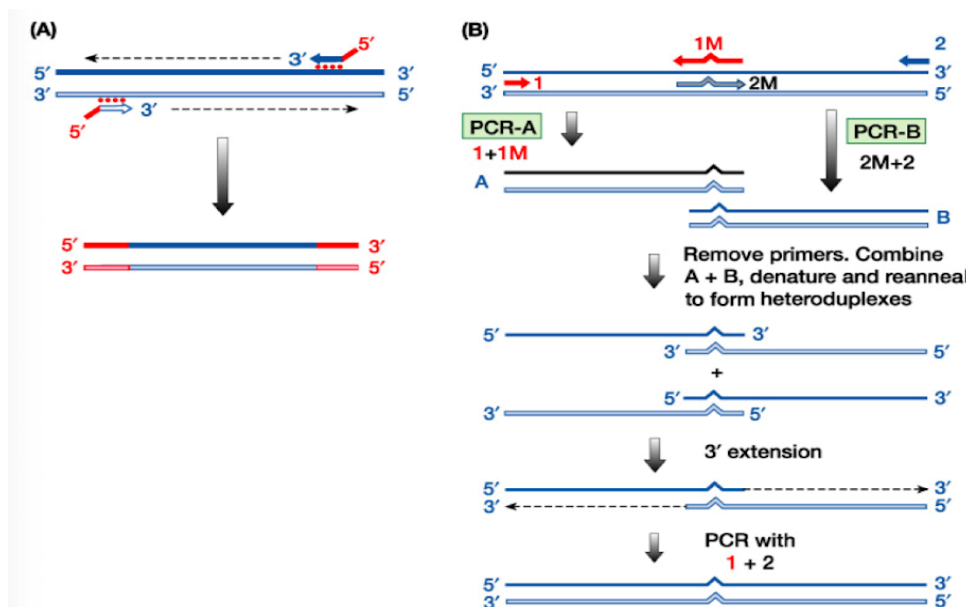


Figure 5-19 Human Molecular Genetics, 3/e. © Garland Science 2004

[https://www.youtube.com/watch?v=vynUiWhOQ\\_Y](https://www.youtube.com/watch?v=vynUiWhOQ_Y)



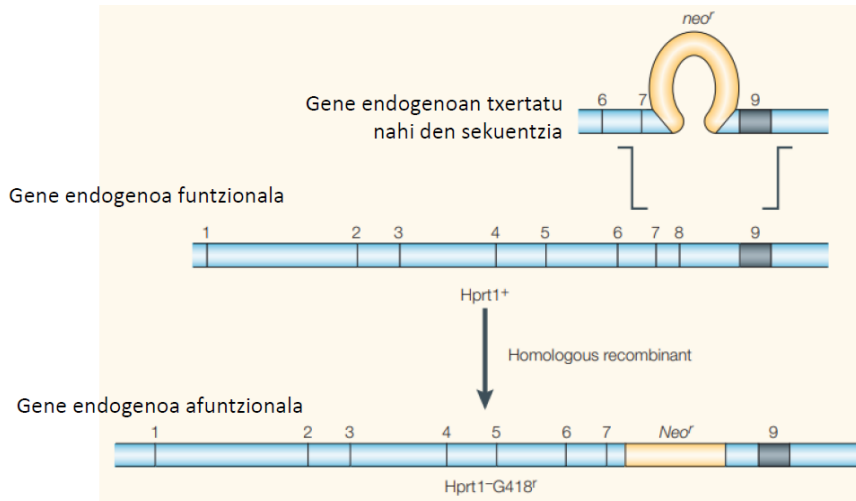
- **PCR bidezko mutagenesia:** Oligonukleotidoen bidezko mutagenesiaren oso antzekoa da baina heteroduplexoa bakterio batera sartu beharrean PCR baten bidez amplifikatuko dugu. Guk nahi dugun sekuentzia (5-8 nukleotido dituen) sar genezake haslearen 5' muturrean, guk nahi dugun mutazioa sortzeko. Honela, haslea ez da guztiz osagarria izango itu sekuentziarekiko baina bere funtzioa beti bezala beteko du, honela erreplikatzeko guk sartu nahi genuen sekuentzia gehituta izango du.



## 5. Genomaren edizioa

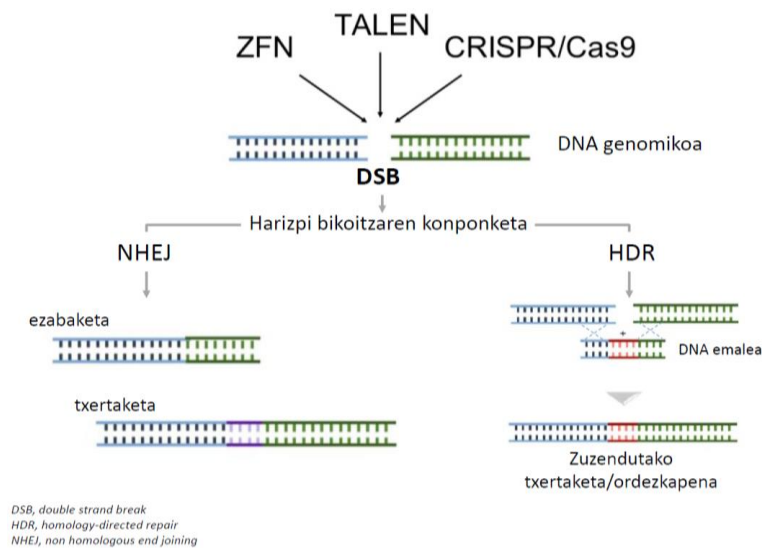
Organismo baten genoma eraldatu egin daiteke (txertaketa, ezabaketa edo ordezkapena) nukleasa bereziak erabiliz. Genomaren edizioa modu desberdinetan gauzatu daiteke:

- Birkonbinazio homologo bidezkoa:  
Homologoak diren sekuentzien artean birkonbinazioa emango da.  
Honako adibide honetan HPRT gene endogenoaren haustura eman da birkonbinazio homologo bidez ama zelula enbrionarioetan.



Hurrengo hiru tekniketetan, guk nahi dugun DNAREN eskualdean harizpi bikoitzeko haustura bat emango da. Ondoren, zelula, haustura hau konpontzeko gai izango da, bi mekanismo desberdinen bidez: birkonbinazio homologo bidezko konponketa edo birkonbinazio homologoa ez den beste mekanismo baten bitartez (muturrak lotu; zuzenean edo tartean zoriz nukleotido batzuk sartu eta ondoren elkartuta).

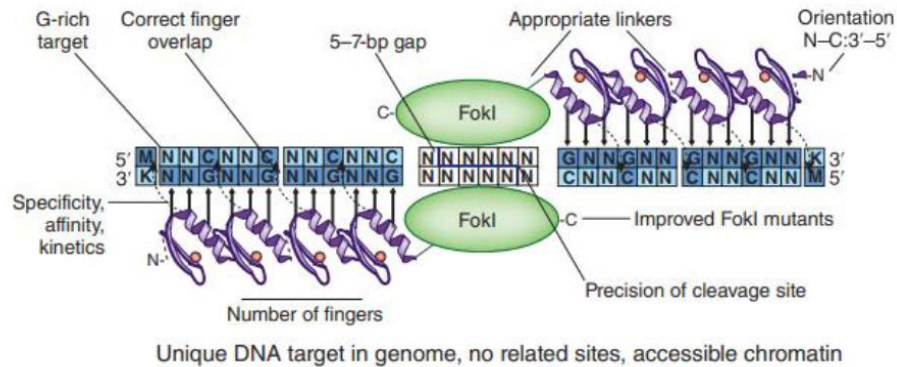
Teknika hauek erabili ondoren, amaierako DNAn mutaturako sekuentzia bat izango dugu.



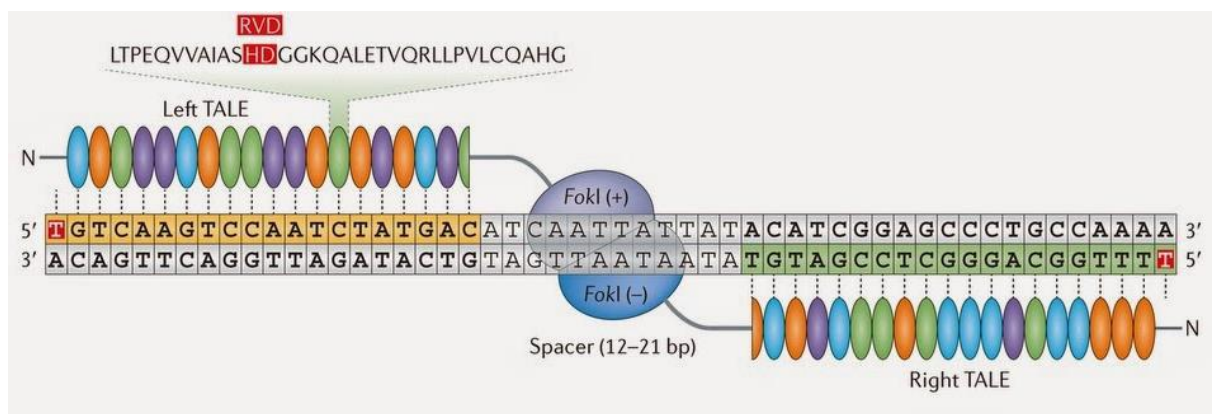


- Zink hatzdun nukleasa bidezkoa (ZFN, Zink Finger Nucleases): landareen eta ugaztunen genomak eraldatzeko diseinatutako nukleasak dira. Proteina bat sintetizatzen da, eta honek bi osagai izango ditu:
  - Zn hatza (30aa): DNA-ri lotzen diren domeinuak dira. Zn hatz bakoitzak 3 nukleotidorekin interakzionatzen du.
  - FokI: endonukleasa jarduera duen domeinua da, baina endonukleasa jarduera edukitzeko dimerizatuta egon behar du.

Diseinuan hainbat faktore hartu behar dira kontuan (beheko irudiari erreparatu):



- TALEN-s bidez (Transcription Activator-Like Effector Nucleases) bidez: Naturan aurkitzen diren proteinak ingeniari genetik bidez eraldatu eta DNA sekuentzia espezifikoetara batzen dira. TALEN-sek hurrengo osagaiak ditu:
  - **TALE**: 34 aminoazidoko egitura, DNArri lotzen dena (aa bakoitza nukleotido bati).
  - **FokI**: Endonukleasa jarduera duen domeinua da, baina funtzionala izateko dimerizatuta egon behar du.



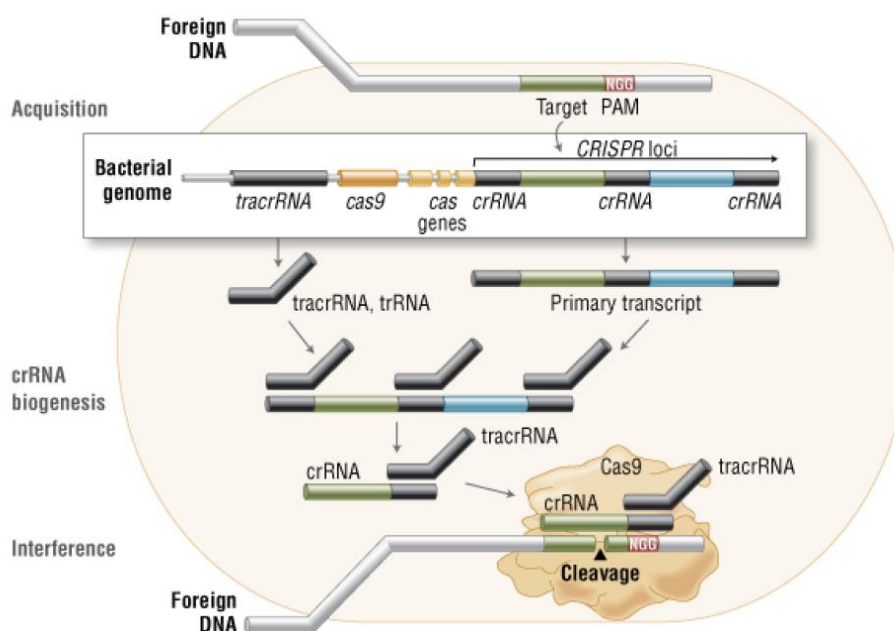
- CRISPR/Cas9 bidez (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats): Bakterioetan aurkitu zuten mekanismoa, eta mekanismo horretan oinarritzen den teknika bat garatu zuten. Sistema immunologikoan oinarritzen da (inmunitate espezifikoan). Bakterioak RNA molekula berezia sintetizatuko du, ondoren



patogenoaren DNA ezagutuko duena. Teknika honen helburua genomak mutazio puntualak eragitea izango da:

Guk eraldatu nahi dugun DNA-n PAM sekuentzia egongo da (Cas nukleasa bere itu sekuentziarekin lotzeko ezinbestekoa den sekuentzia da), ondoren Cas9 nukleasak detektatuko duena. RNA gidari (sgRNA) izeneko sekuentzia bat diseinatuko dugu, itu sekuentziara lotuko dena. Horretaz gain, RNA honek bi osagai izango ditu: tracrRNA eta crRNA. Euskarri hauen bidez, molekula hau askoz ere egonkorragoa izango da. RNA gidaria eraldatu nahi dugun DNA-ren sekuentzian lotuko da. Ondoren, Cas9 etorriko da, eta PAM sekuentziaz 3-4 nukleotido ur-goran mozketak bat egingo du. Mozketak hain konpontzerakoan akatsak egingo direnez, delezioak, aldaketak... guk nahi genuen puntuan mutazio bat sortu dugu.

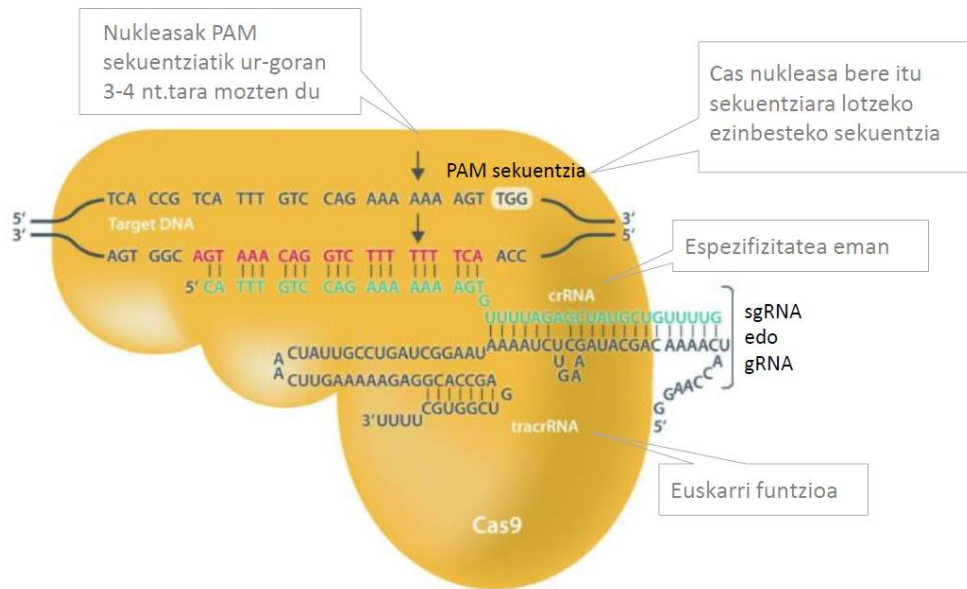
### CRISPR/Cas9 *in vivo*: Bakterioaren immunitate espezifikoa



Cas: CRISPR associated genes  
 crRNA: CRISPR RNA  
 tracrRNA, trRNA: trans-activating crRNA  
 PAM: protospacer adjacent motif

<https://www.youtube.com/watch?v=MbJ7Hnc2>

**CRISPR/Cas9 bidezko genomen edizioa (2013)**



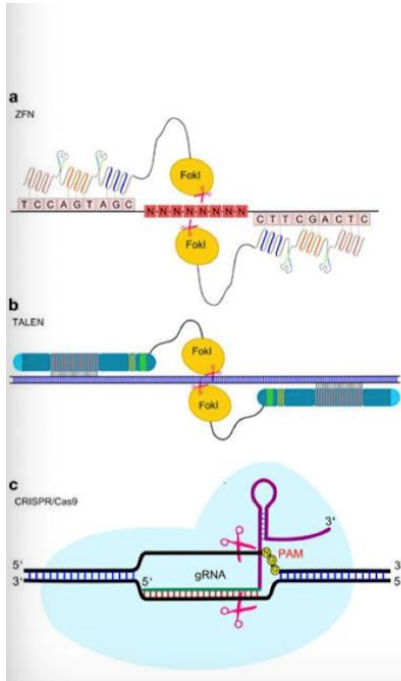
sgRNA, single guided RNA  
 crRNA: CRISPR RNA  
 tracrRNA: trans-activating crRNA  
 PAM: protospacer adjacent motif

<https://www.youtube.com/watch?v=4YKFw2KZA5o&t=10s>

**Laburpena:**

Multiplexing: DNAren puntu desberdinetan mutazioak sortzea.

Off-target: nahiz eta zuk leku espezifiko batean mutazioa gertatzeko diseinatu, gertatu daiteke zuk nahi ez duzun lekuan mutazioak sartzea. Hau da gaur egun CRISPR/Cas9 teknikaren inkonbeniente nagusia.



Itu bakoitzerako diseinatu	Ituaren ezagupena	Teknikoki & Kostua	Multiple xing	Off-target
Eraldatutako proteina berri bat – zailagoa ZFN diseinatzea TALEN baino	Proteina-DNA, iragartzeko zaila	Zaila & handia	Ez	CRISPR baino gutxiago
20 nt-ko sgRNA	RNA-DNA, iragartzeko erraza	Erraza & txikia	Bai	Asko

# 13. GAIA: GENE TERAPIA

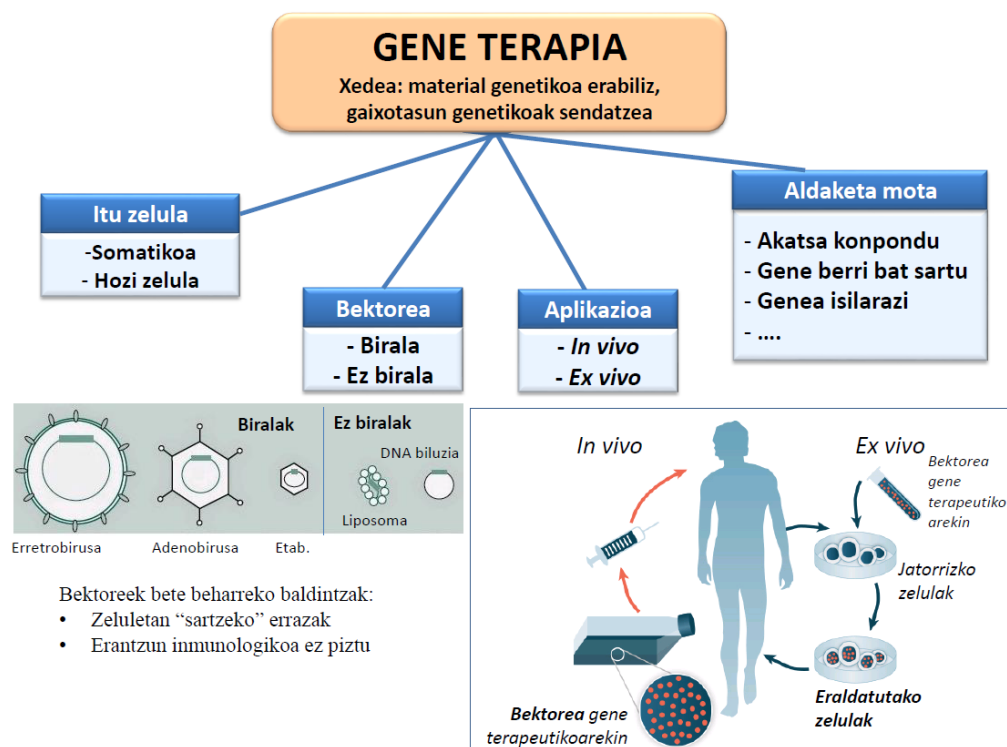
Gene terapiaren helburua material genetikoak erabiliz gaixotasun genetikoak sendatzea izango da. Itu zelula somatikoak edo hosi zelula (gametoak) izan daiteke; dena den, gene terapia zelula somatiko batera aplikatzen bada, konponketa ez zaio ondorengoari transmitituko, baina, errazagoa da zelula somatikoetan egitea.

Bektoreari dagokionez, birala edo ez birala izan daiteke. Birusak bektore oso erabilgarriak dira, izan ere, birusak oso trebeak dira beraien material genetikoak gure zeluletan txertatzen. Gainera, birusak zeluletan sartzeko nahiko errazak dira eta ez dute erantzun immunologikoa pizten.

Aplikazioak *in vivo* edo *ex vivo* izango dira.

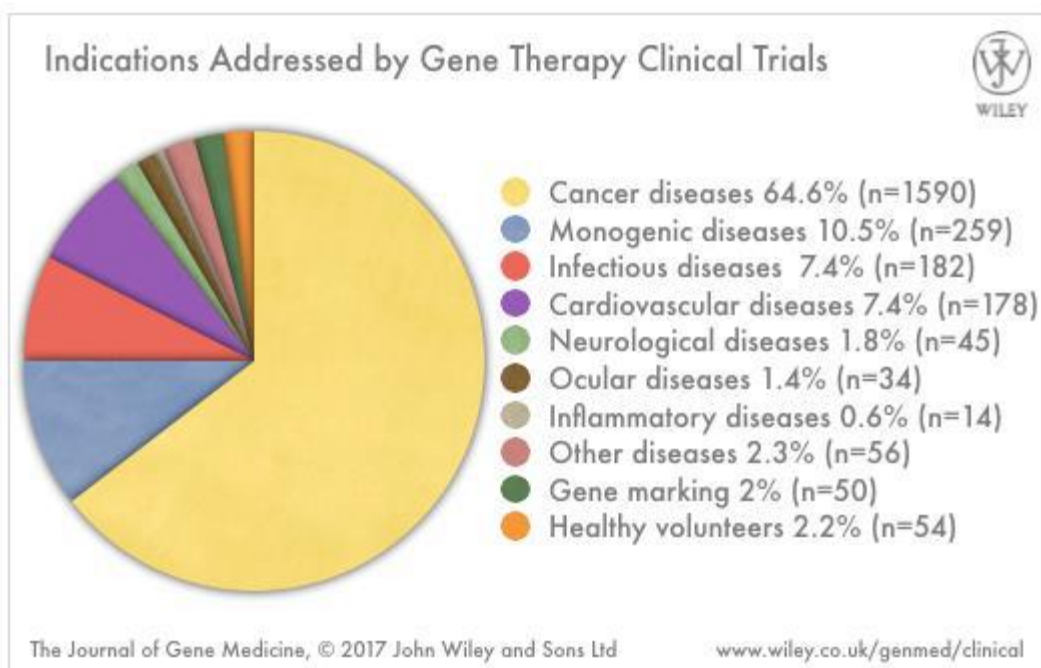
Aldaketa mota asko egin daitezke, akatsak konpondu, gene berri bat sartu, genea isilarazi...

Gene terapiaren ikuspegi orokorra:

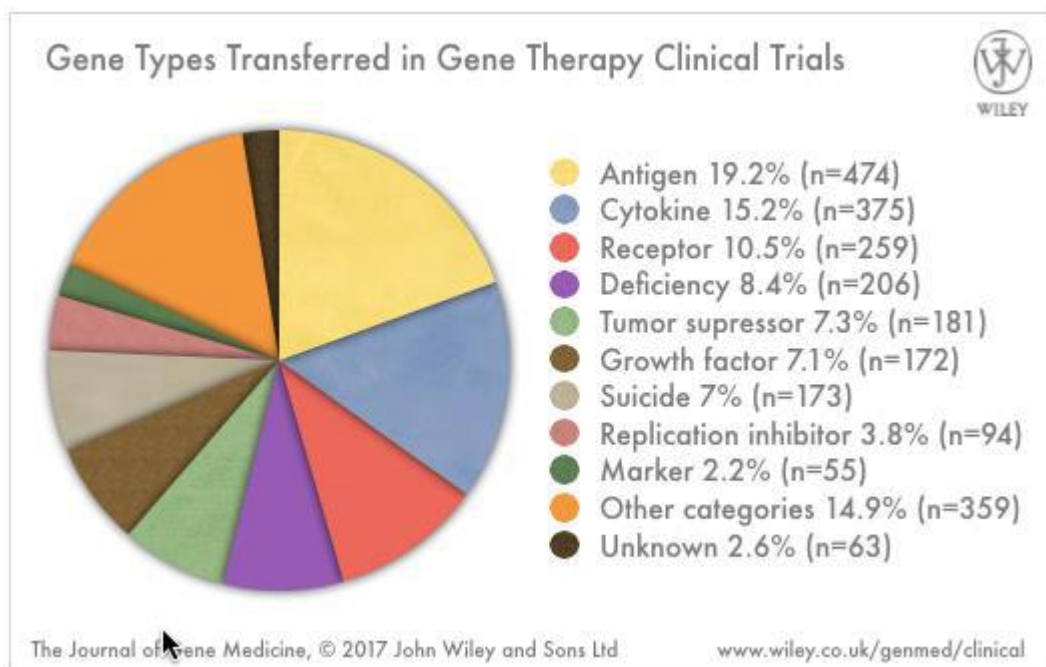


Gaixotasun monogenikoetan gene bakarra dagoenez mutaturik, tratatzea nahiko errazak izaten dira. Multigenikoetan aldiz, ez da hain erraza, mutazioan gene asko baitaude inplikaturik. Hori dela-eta, gene terapia gehienbat gaixotasun monogenikoak eta minbiziak tratatzeko erabiltzen dira gaur egun.

Gene terapiari buruzko ikuspegi erreala:



Gene terapian, batez ere antigenoak, zitokinak eta hartzaileak transferitzen dira.



Gaur egun, gene terapia gehienak fase klinikoan daude. Fase klinikoan, farmakoa lehenengo aldiz probatzen da gizakietan, eta hainbat fase bereiz daitezke:

- I fasea: Gizakietan egiten diren lehen ikerketak dira. Farmakoaren segurtasuna egiaztatzea eta administrazio-jarraibide egokienari buruzko informazioa jasotzea dute helburutzat. Gizabanako osasuntsuetan egiten da.

- II fasea: Farmakoaren eraginkortasunaren inguruko aurreneko informazioa biltzea eta dosi/erantzunaren arteko erlazioa aztertzea dute helburutzat, batez ere elkarrekintzak eta profil farmakozinetikoa. Gaixotasuna duten pertsonetan egiten den lehen proba da, hau da, pazienteetan egiten da. Pazienteen lagina txikia izaten da.
- III fasea: Aztergai den tratamendu esperimenteraren segurtasuna eta eraginkortasuna ebaluatzea da helburua, eta eskura dauden aukera terapeutikoekin alderatzea. Paziente-lagina handia izaten da.
- IV fasea: Farmakoaren komertzializazioaren ondoren egiten da. Farmakoak eguneroko erabilera klinikoan duen eraginkortasuna, segurtasuna eta indikazioz kanpoko erabilerarako baldintzak aztertzeko egiten dira. Hemen sartzen dira farmakozaintzaren ikerketak

Gaur egun terapia genikoaren teknika gehienak hasierako faseetan kokatzen dira, oso zaila baita teknika hauek garatzea. Honen arrazoietako bat gaixotasun monogeniko gehienak arraroak direla da, hau da, prebalentzia oso baxua dauka. Ondorioz, gehienak hirugarren fasean estankatuta gelditzen dira. Hortaz gain, ikerketaren finantziazioekin ere arazoak izaten dituzte maiz.

Phases of Gene Therapy Clinical Trials

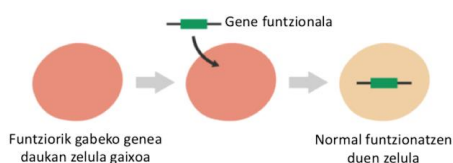


The Journal of Gene Medicine, © 2017 John Wiley and Sons Ltd

[www.wiley.co.uk/genmed/clinical](http://www.wiley.co.uk/genmed/clinical)

Gene terapian erabiltzen den material genetikoak mota desberdinetakoak izan daitezke:

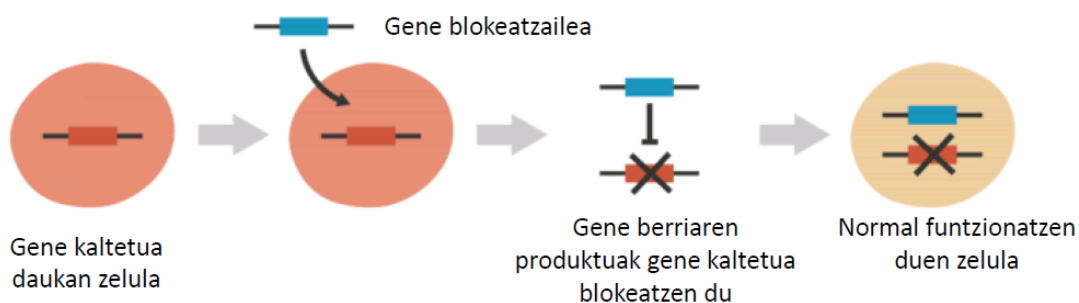
1. Kaltetutako genearen funtzioa betetzen duen genea. Adibidez, gene baten ondorioz proteina bat sintetizatzen duzu zeinak gaixotasun bat sortzen dizun. Hau konpontzeko kaltetutako genea ordezkatzeko duen genea sartzen da, gaixotasun hori ez izateko. Honetaz gain, erabilgarria da bere funtzioa betetzen ez duen genea ordezkatzeko.





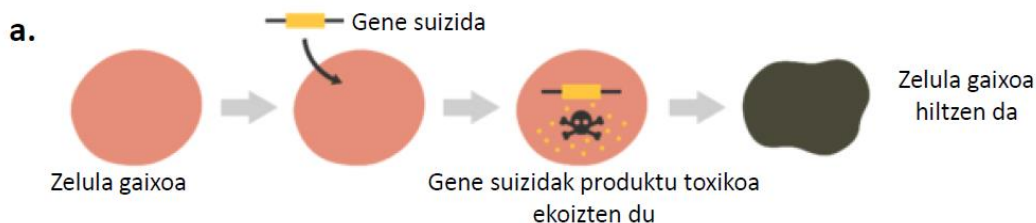
2. Gene inhibizio terapia:

Gene batek gaixotasun bat eragiten badu, gene hau isilarazi dezakegu. Honetarako gene blokeatzaile bat sartzen da eta gene kaltetua blokeatzen du. Hala, normal funtzionatuko duen zelula bat izango dugu, gene kaltetua isilarazita dagoelako.

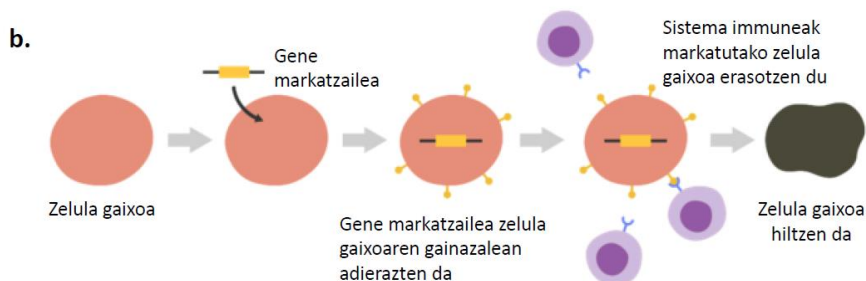


3. Zelula espezifikoaren heriotza eragiten dutenak:

- Gene suiziden bitartez: Gainazaleko proteinak markatzaile moduan erabiliz, zelula gaixoa identifikatu eta gene suizida bat sar daiteke zelula gaixoan, Gene suizidak produktu toxikoak askatuko ditu eta zelula gaixoa hilko da. Hau nahiko arriskutsua da, ondo egitea beharrezkoa delako (bestela zelula okerra hil ezkeru, ondorioa nahiko larria izan daiteke).

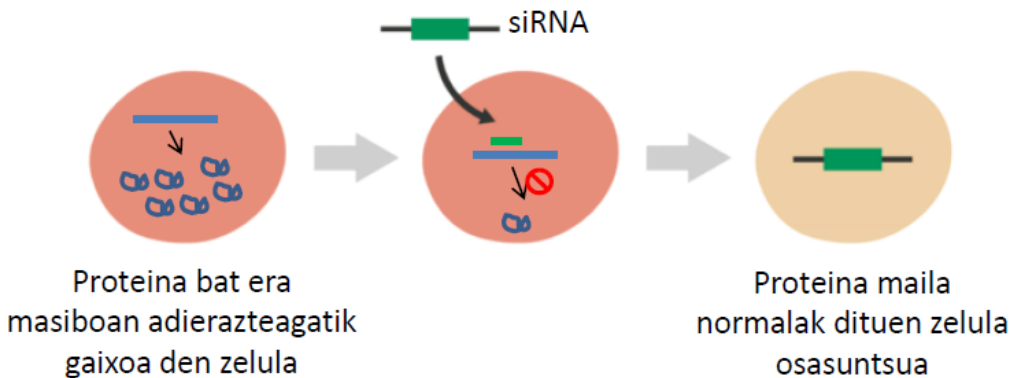


- Minbizi zelulek, mintzeko hartzaileak ezkutatu egiten dituzte eta ondorioz immunitate sistemak ezin ditu ezagutu eta hauen kontrako erantzuna eman. Hau konpontzeko, zelula gaixoari gene markatzaile bat sartzen zaio eta hau zelula gaixoaren gainazalean adierazten da. Ondorioz, sistema immuneak markatutako zelula gaixoa ezagutu dezake, erasotu egingo du, zelula gaixoa hiltzera behartuz.

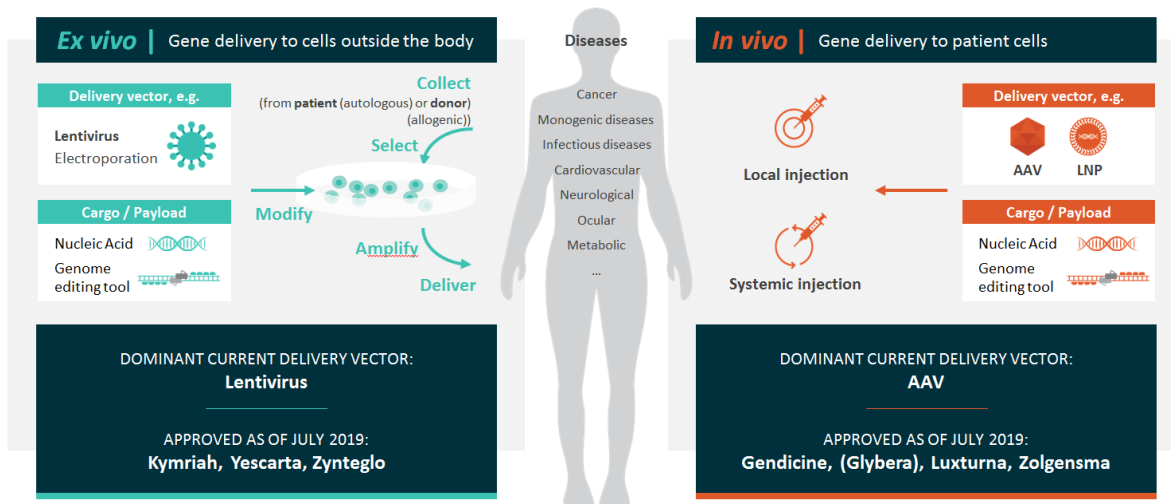


4. Gehiegi adierazten den genea isilarazten duen siRNA:

Proteina bat era masiboan adierazteagatik gaixoa den zeluletan erabiltzen da teknika da hau. siRNA bitartez, proteina hau kodetzen duen mRNA blokeatu/suntsitu eta modu horretan, proteina maila normaletan itzuliko da.

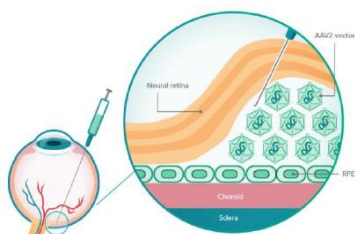


*In vivo* gene terapia baten adibidea (adibide hauek ez dira ikasi behar, adibide hauek guk ikasitakoa errealitatean aplikatzen dela oharrezko da):



**In vivo gene terapia baten adibidea**

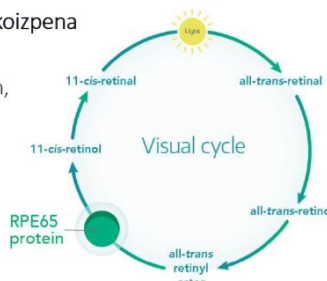
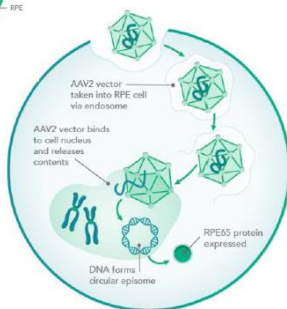
Izena	Gaitza	Efektua	Genea	Onartuta
Luxturna	Jaiotzetiko Leber amaurosia	Erretinaren distrofia, ikusmen arazoak, itsutasuna	RPE65	FDAk 2017an



(1) RPE65 genearen entrega  
Luxturna injekzio bidez administratzen da erretina azpian. AAC2 virus adeno-asoziatuaren bitartez, RPE65 genearen kopia funtzionala begiko RPE (retinal pigment epithelial) zeluletan txertatu

(2) RPE65 proteinaren ekoizpena

RPE65 genearen kopia funtzionala eskuratu ostean, zelulak RPE65 proteina ekoizten dute



(3) Ikusmenaren berreskurapena

RPE65 proteina funtzionalari esker, 11-cis-retinalak (ikusmen pigmentuen osagai garrantzitsua) ikusmen zikloa onbidertzen du

siRNA-n oinarritutako *in vivo* gene terapiak:

Izena	Gaitza	Kausa	siRNA-ren itua (mRNA)	FDA & EMAk onartua
Patisiran (Onpattro)	Amiloidosis heredagarria*	Transtirretinaren gehiegizko pilaketa	Transtirretina	2018
Givosiran (Givlaari)	porfiria hepatico akutua*	Porfirinaren gehiegizko pilaketa	Hemo taldearen sintesian parte hartzen duen entzima bat	2019
Lumasiran (Oxlumo)	1 motako hiperoxaluria*	Oxalatoaren gehiegizko pilaketa	Glikolato oxidasa (oxalatoaren sintesian parte hartu)	2020
	Hiperkolesterolemia	Kolesterolaren gehiegizko pilaketa	PCSK9 (kolesteroleko metaboslimoko entzima)	Antza 2020-2021

\*Gaixotasun arraroa

*Ex vivo* gene terapia baten adibidea:

### ***Ex vivo* gene terapia baten adibidea**

Izena	Gaitza	Efektua	Genea	Onartuta
Zynteglo	Transfusio mendeko beta-talasemina	Anemia bortitza, bizi osoko transfusioa beharrezkoa	HBB (T98Q)	EMA, 2019



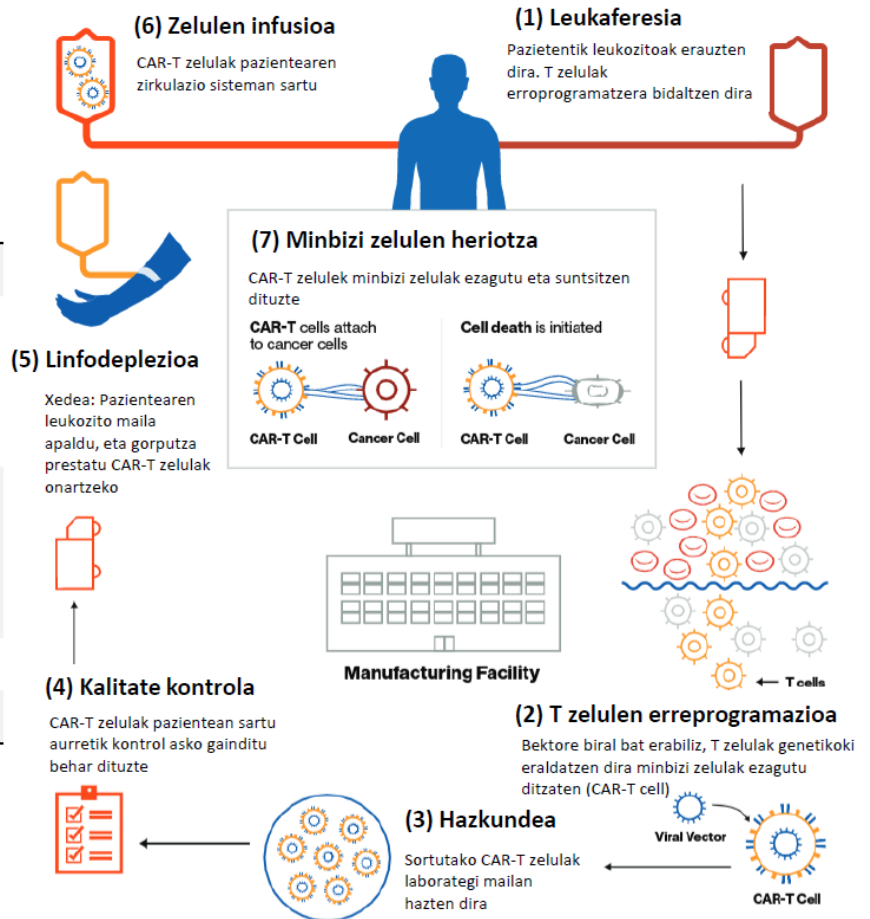
BB305 LVV lentibirusak  $\beta^{A-T87Q}$  globina genea darama ( $\beta$ -globina gene eraldatua)

Pazientetik erazitako ama zeluletan  $\beta^{A-T87Q}$  globina gene funtzionala txertatu *ex vivo* BB305 LVV bidezko transdukzio bidez

Eraldatutako ama zelulak pazientearen hezur muinean txertatzen dira Hb funtzionala ekoiztuko duten globulu gorriak ekoizteko

## Ex vivo gene terapia baten adibidea

<b>Izena</b>	Kymriah
<b>Gaitza</b>	B zelula bidezko leukemia linfoblastiko akutua
<b>Efektua</b>	Gutziz heldu Gabe dauden B zelulen kontrolik gabeko hazkuntza
<b>Genea</b>	Ugari
<b>Onartua</b>	FDA, 2017



Inmunoterapia: gaixoaren immunitate sistema kitzikatzen da minbiziari aurre egiteko

### Gene terapia:

Izena	Gaitza	Efektua	Genea	Onartuta
Kymriah	B zelula bidezko leukemia linfoblastiko akutua	Gutziz heldu Gabe dauden B zelulen kontrolik gabeko hazkuntza	Ugari	FDA, 2017
Yescarta	Zelula handitako B zelulen linfoma	B zelulen kontrolik gabeko hazkuntza	Ugari	FDA, 2017

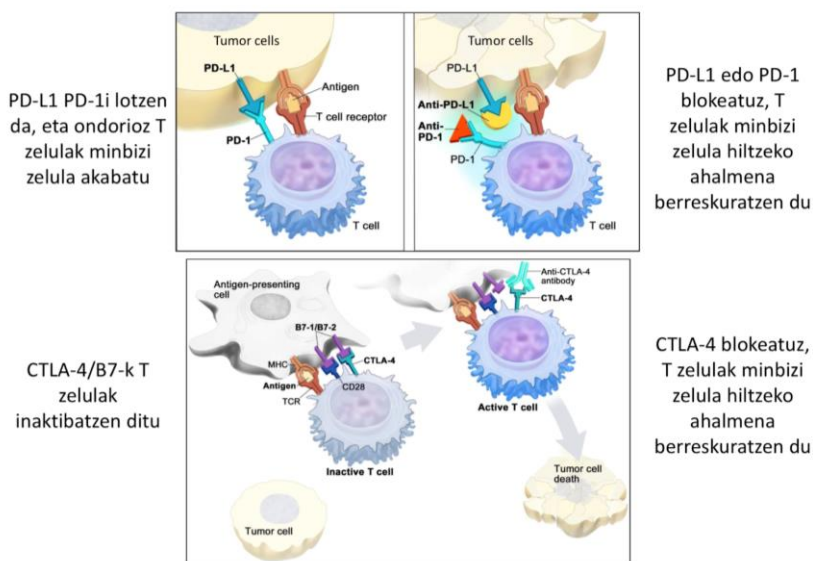
### Antigorputz monoklonalak:

Izena	Gaitza	Itua	Onartuta
Rituximab	Linfoma non-Hodkin	CD20	FDA, 1997
Alemtuzumab	B zelulen leukemia linfositiko kronikoa	CD52	FDA, 2001
Ofatumumab	B zelulen leukemia linfositiko kronikoa	CD20	FDA, 2009
Elotuzumab	Mieloma multiplea	SLAMF7	FDA, 2015

CD: zelulen gainazaleko proteinak.

Antigorputz monoklonalak: anti-PD-1/PD-L1 eta anti-CTLA-4:

Normalean, T zelulak bere hartzailearen (PD-1) bitartez antigenoa ezagutu eta zitokinen bitartez antigenoa suntsitzen saiatuko da. Baina batzuetan, tumore zelulak duen PD-L1 hartzailea T zelularen PD-1 hartzailera lotzen bada, T linfozitoak inabilitatuta geldituko dira. Ondorioz, bi hartzaileetako bat inaktibatuz ezker, T zelulek minbizi zelulak hiltzeko gaitasuna berreskuratuko dute.



Izena	Gaitza	Itua	FDAk onartuta
Ipilimumab	Puxikako minbizia	CTLA-4	2011
Nivolumab	Hainbat minbizi (giltzurrunetakoa, kolorektala, Hodgkin..)	PD-1	2014
Pembrolizumab	Hainbat minbizi (Merkel kartzinoma, birikitakoa, Hodgkin..)	PD-1	2014
Atezolizumab	Puxikako minbizia	PD-L1	2016
Avelumab	Merkel zelulen kartzinoma metastatikoa	PD-L1	2017
Durvalumab	Puxikako eta birikitakoa minbizia	PD-L1	2017