BIOTXIPEN ERABILERA DIAGNOSTIKO KLINIKOAN

Maria Razquin

Urte gutxi batzuetan, DNA-mikroarrayak, DNA–txipak edo biotxipak orainaldia eta datozen urteetarako perspektibak irauli dituzte, bai diagnostiko klinikoan bai ikerkuntzan ere.

Berriztapen nagusiena da lagin bateko milaka gene aztertzen direla prozedura analitiko bakar batean, orain arte PCR teknikak eskaini digunaren kontra: lagin askotan gene bakarra aztertzea.

Analisi genetikoen beharrak handitu dira, alde batetik gene berriak aurkitu direlako, gaixotasun desberdinetan nahastuta daudenak, eta beste aldetik, eta gainera, giza genomaren sekuentziazioak informazio galanta agerian utzi duelako. Jakingarri hau azaldu behar dugu, geneei funtzioa eman eta genetikaren aldakuntzak ezagutu, gaixotasun genetikoen jatorria deduzitzeko.

Material genetikoa ikasteko, alde batetik DNA dugu, nukleotido isolatuaren polimorfismoari buruz (SNPak, aldaketak, delezioak edo intserzioak) informatuko duena. Eta beste aldetik ikasiko da RNA, espresio genetikoaren desberdintasunak identifikatzeko.

DNA Array-aren teknologia berri eta tresna indartsu bat da, ikerkuntzan abiadura handitzea eta biologia molekularra klinikan aplikatzea onartu duena. Zer da DNA txipa ala DNA Array bat? Labur esanda, DNAzko zunda batzuk dira, luzera aldakorrekoak, euskarri solido bati lotuak, antolamendu ezagun batean. Hibridazioaren dentsitateak eta erabiltzeko euskarri desberdinak karakterizatuko ditu txip motak:

- Makroarrayak
- cDNA mikroarrayak
- Oligonukleotido mikroarrayak
- Proteina mikroarrayak

Arrayek eskaintzen dituzten datuak asko dira. Agertzen den informazioa errentabilizatzeko premiazkoa da alde batetik fabrikazio zuzen bat egitea eta bestetik txiparen behar bezalako erabilera, erdiko pauso guztiak ondo emanez:

A. TXIPAREN FABRIKAZIOA

- DISEINUA
  - Izaera
  - Kopurua
  - Zundaren antolamendua
- ZUNDAREN LORPENA
  - PCR bi kateko DNA
  - Oligoen diseinua
    - *-in vitro*
    - *-in situ*
  - Proteinak
- EUSKARRIAN ZUNDAK ROBOTIZATUZ INPRIMATZEA

B. TXIPAREN ERABILERA

- LAGINAREN LORPENA
- DNA edo RNAren ERAUZKETA ETA MARKAKETA
- HIBRIDAZIOA
- IRAKURKETA
- DATUEN ANALISIA

A. TXIPAREN FABRIK

Arraiaren diseinua z
zunda-mota desbero
PCR zatiak edo prote

ZUNDA
OLIGONUKLEOTIDOAK
PCR zatia
PROTEINA (antigorputzak)
PROTEINA (substratua)

*** Zundaren pilatzea**

- Inprimatzea
  an ipintzen
  daka batzu
  batzuetan a
  berdinak ba
  berregintasu
  erreplikatue
  beste algori
  rena inprim
  klinikoan be
- *In situ* sinte
  karri gainea
  dira, berreg
  oligonukleo
  Fotolitograf
  400.000 sek
  bere sintesi
  nika hau er
  handientzat
  ematen due
  da, hainbes

A. TXIPAREN FABRIKAZIOA

Arraiaren diseinua zer estudiatu nahi den, horren menpean dago. Erabiliko den zunda-mota desberdina da, zer aplikazio eman nahi den kontu: oligonukleotidoak, PCR zatiak edo proteinak:

ZUNDA	LAGINA	APLIKAZIOAK
OLIGONUKLEOTIDOAK	DNA genomikoa cDNA	Genotipatu fina (SNP), birsekuentziazioa Transkriptoma
PCR zatia	DNA genomikoa Proteinara erretikulatutako DNA cDNA (oligo dT) cDNA (mRNA polisomala) cDNA (zebadore zorizkoak) RNA *in vitro* markatua RNA *in vivo* markatua	Genotipatu "lodia" Proteinaren elkartzeko tokiak aurkitu mRNA poliadenilatutaren transkriptoma Proteoma ez-zuzena Transkriptoma "osoa" Transkriptoma "osoa" Transkripzioaren tasak
PROTEINA (antigorputzak)	Proteinak	Proteoma
PROTEINA (substratua)	Entzimak	Saiakuntza entzimatiko anizkuna

* **Zundaren pilatzea** bi modutara egiten da aukeratutako euskarrian:

- Inprimatzea: Biomolekula aurrez-eginak (oligoak edo PCR zatiak) gainazalean ipintzen dira robotizatuz (25-50 mikroi, 0.2-0.5 ng). Teknika honek ehundaka batzuetatik milaraino sekuentzia batera ikastea onartzen du. Egun batzuetan array berriak egin daitezke. Mikroinprintina egiteko teknika desberdinak badaude: punta mikrodispentsadoreak, eta abar. Teknika honen berregintasuna *in situ* sintesia baino txikiagoa den arren, arazo hau puntu erreplikatuekin zuzendu daiteke, kolore askotako fluoreszentziarekin, eta beste algoritmo bereziekin detektatuz. Orduan esan daiteke teknika hoberena inprimatzea dela, bere flexibilitate eta baliagarritasunagatik, aplikazio klinikoan bezala baita ikerkuntzan ere.
- *In situ* sintesia: Oligonukleotido bakoitza sekuentzia aukeratu batekin euskarri gainean ipintzea baimentzen du. Txipen artean aldakuntzak txikiagoak dira, berregintasuna eta zundaren dentsitate handiagoa uzten ditu. *In situ* oligonukleotidoak sintetizatzea uzten duen teknika bat **fotolitografia** da. Fotolitografiko ipintzeak oligoak basez base jartzen uzten digu, 40.000-400.000 sekuentziak ikastea onartzen ditu. Txip berriak diseinatu eta gero, bere sintesiak 1-2 urte beharko ditu. Affymetrixen® izenekoak genetxip teknika hau erabiltzen du. Garestia izanik ere, espresio genetikoaren estudio handientzat, bere sentikortasun eta berregintasunagatik informazio galanta ematen duelako, hau da teknikarik onena. Beste teknologia tintaren txorroa da, hainbeste erabiltzen ez dena.

Zundak jartzen diren **euskarriak** izan daitezke:

- Nylon: karga positiboarekin. Makrotxipetan erabiltzen dira.
- Beira-talde erreaktiboekin (aminosilano, polilisina edo aldehido taldeak), mikrotxipetan erabiliak.
- Polimeroak, estreptabidinarekin deribatizatuak.

B.TXIPAREN ERABILERA

LAGINAREN LORPENA: Puntu honetan garrantzitsuena kirurgialariaren eta patologoaren lankidetza da, laginaren ateratze eta kontserbazio egokiena lortzeko.

DNA edo RNAren ERAUZKETA ETA MARKAKETA: DNA, RNA edo mRNA ateratzea ohizko metodologiarekin egiten da. Lagina ez ba da nahikoa, handitzeko teknika, PCR erabiltzen da. Markaketa izan daiteke:

- Erradiaktiboa: sentikorragoa eta zehatzagoa da, baina laginaren markaketa diferentzialik ezin da egin, eta gainera erradioaktibitatea erabiltzea desabantaila handi bat da. Isotopo erradiaktibo batekin markatutako nukleotidoa (P^{33}) gaineratzen da, bakarrik makrotxipetan
- Fluorokromoak. Fluoreszentziarekin markatzeak abantaila handi bat du: mostraren markaketa diferentziala egiten uzten du, eta gainera bere erabilera ez da arriskutsua. Gaineratzen ditugun fluoroforoak Cy2, Cy3, Cy5, Cy5.5, etab. izaten dira.

HIBRIDAZIOA:Laginaren markatutako azido nukleikoen zuntzak txipan inmobilizatutako zunda konplementarioekin egindako erreakzio osagarria da. Prozesu honek ematen dituen pausoak hauek dira:

- Aurre-tratamendua: "background" gutxitzeko aurre-baldintzak.
- Aurre-hibridazioa: gainean DNArik ez dagoen azalera blokeatu.
- Hibridazioa zehazki esana: oso garrantzitsua da erreakzioa tenperatura konstantean edukitzea.
- Garbiketa, lotu ez den markatutako lagina eta hibridazio ez-espezifikoa kentzeko.

TXIPAREN IRAKURKETA: Makro eta mikrotxiparen irakurtzeko moduak eta beharrak desberdinak dira:

- Makrotxipak ekorketa-laser batekin (Fosforimager®) irakurtzen dira, fotoestimulatutako pantaila irakurriz.
- Mikrotxipek erresoluzio handi baten beharra dute puntuen neurriarengatik eta gainera sistemak modu uniformean area zabal bat (2x6 cm) denbora gutxian eskaneatu behar du. Desberdindu behar da era berean bi fluoroforo espektroren artean. Bi modutara irakurtzen dira:

A-Fotodetekzio
Erabiltzen di
tzat, area txi
duen fotoie
sekuentzialki
handiagoa d

B- Argitasuna:
optiko desb
Erresoluzio g

DATUEN ANALISA:
da, txiparen diseinu
ipini daitezke modu
tuak erabiliz. Softw
bat sintesiaren eta
zunda zehatzarekin

Datuen prozes
gaiaren bariazioa,
hau dena beharrez

Ikusten den b
tzeko, eta baita ere
grama hauen erab
informatikako prog
handi bat eskaintz
eta mikrotxiparen
garri hau errentag

Espresio gene
arabera egin daite

1. BI IZATE PAREKA

Adibidez bot
estudiatzen da:

- Zelula trat
- Zelula trat

Bi RNA mark
nerrean eta azaltz
mikoa emango za
ten dira zenbat g
mitzen diren, esta

A- Fotodetekzioa: izan daiteke baita ere irakurketa konfokal edo ez konfokala. Erabiltzen dira λ berezi batekin eszitazioko laserrak fluoroforo bakoitzarentzat, area txiki bat argitzen dutenak. Molekularen % 50 eszitatzea lortzen duen fotoien fluxua da eszitaziorik onena. Bi fluorofororen irakurketa sekuentzialki ala aldi berean egin daiteke. CCD kamerak baino erresoluzio handiagoa du.

B- Argitasuna: CCD kamerarekin, espektro handiko xenoi lanparak dira. Filtro optiko desberdinak erabiltzen dira eszitazioko espektro desberdinentzat. Erresoluzio gutxiago eskaintzen dute, baina azkarragoak dira.

DATUEN ANALISA: Bioinformatika mikroarrayaren teknologian osagai garrantzitsua da, txiparen diseinutik emaitzaren interpretazio sofistikatua lortu arte. Biomolekulak ipini daitezke modu zehatz batean aurrez mugatutako tokietan robot konputerizatuak erabiliz. Software espezialitatuak baieztatzen du laginaren identifikazio zuzen bat sintesiaren eta datuen erabilera bitartean, azkar korrelazionatzeko seinale bat zunda zehatzarekin.

Datuen prozesatuak normalizazioa ekartzen du, hau da, biologikoa ez den osagaiaren bariazioa, espresio genetikoaren maila neurriari afektatzen dienei, kentzea, hau dena beharrezkoa da esperimentu desberdinak parekatzeko.

Ikusten den bezala software indartsu bat behar da artefaktu egokia detektatzeko, eta baita ere mikroarrayaren informazio osoa jakiteko. Edozein modutan programa hauen erabiltzaileek seguru aski bere kabuz moldatu egin beharko dituzte informatikako programak bere premien arabera. Mikrotxipek aurkezten duten arazo handi bat eskaintzen duten informazio galanta erabiltzea da. Hau da azterlanaren eta mikrotxiparen diseinu egoki baten garrantziaren arrazoia, gero informazio izugarri hau errentagarri egiteko.

Espresio genetikoaren azterlanetan, emaitzaren analisia bi planteamenduren arabera egin daiteke:

1. BI IZATE PAREKATZEA:

Adibidez botika baten ondorea espresio genetiko osoa zelula-mota batean estudiatzen da:

- Zelula tratamenduarekin ⇒ RNA markatuta fluoroforo R-rekin
- Zelula tratamendurik gabe ⇒ RNA markatuta fluoroforo G-rekin

Bi RNA markatuak nahastu eta gero, hibridatzen da txipa, irakurtzen dira eskanerrean eta azaltzen dira data bipilak, gero normalizatu eta errepresentazio logaritmikoa emango zaie, kodigoekin estatistika-adierazpenaren arabera. Eta horrela ikusten dira zenbat gene induzitzen diren, zenbat ez diren aldatzen eta zenbat erreprimitzen diren, estatistika-adierazpenarekin.

2. KONDIZIO UGARI PAREKATZEA: CLUSTERING

Estudiatzen dira kondizio desberdin batzuk (denborazko sortak, dosi desberdinak, eta abar). Erreplikatzen da lehen ikusi den prozesua kondizio bakoitzarentzat, erreferentziaren lagin berdina erabiliz kasu denetan. Balore erlatibo batzuk kondizio bakoitzarentzat lortzen dira (denbora, dosia, fenotipoa eta abar), espresioaren patroi berezia gene bakoitzarentzat ondorioztatzen da. Gene desberdinak espresio-patroi berdina badaukate kondizio desberdinen menpean estudiatu eta gero, izan daiteke funtzio biologiko bera betetzen dutelako.

Mikroarrayen saiakuntzak izanarazi dute data ugari, baina arazo handi bat "gold standard" gabe egotea izan da, datu hauek erakusteko eta gero elkar hartu-emanetan jartzeko. Microarray Gene Expression data (MGED) Society erakunde bat da, mikroarrayen datuak elkar trukatzeko norabidea sorrarazteko, genomika funtzionalean eta proteomikoan oinarrituta. Protokolo hauen artean MIAME (Minimum information About a Microarray Experiment) dago, eta bere adierazpenak nahitaez erabili behar dira (*Nature* eta beste aldizkarietan), mikroarrayaren datuak argitara emateko 2002ko abendutik aurrera. MIAME protokoloak atal hauen deskribapena barneratzen du:

- Diseinu esperimentala: hibridazioaren esperimentu-taldea.
- Txipen diseinua: Txip bakoitza erabilita eta txiparen elementu bakoitza (puntua, berezitasuna).
- Laginak: lagin erabiliak,erauzketa-bidea eta markaketak.
- Hibridazioak: jardunbide eta parametro erabiliak.
- Neurketak: irudiak, neurriak eta parametroak.
- Normalizazioa: kontrol-motak, baloreak eta zehazketak.

ARRAY MOTAK

a. MAKROARRAYAK

b. MIKROARRAYAK:

- cDNA
- oligo
- proteina

MAKROARRAYAK

Makrosortak edo makromatrizeak ere deitzen zaie. Erabiltzen den euskarria matrize makroskopikoak dira, nylon edo nitrozelulosazko mintzak, zundak lotzeko tokiak dira. Oinarrizko desberdintasuna zenbat zunda behar diren, 40 ng, eta lortuko den zunda dentsitatean dago, askoz gutxiago beste array motekin baino. Emaitzen irakurketa egingo da ekorketa-laser batekin (Fosforimager®). Eta gero egiten da deshibridazioa makroarrya berriz erabiltzeko.

Bere erabilera gene ezagunaren azterlanetara dago mugatuta eta ahalmen eskasa dute ikergaietan. Makroarraya gehien mugatzen duen berezitasuna mintzaren tamaina da, beharrezkoa izango den zundaren bolumena zedarritzen du eta, gehienez lagin gutxi daukagunean. Hau esan eta gero, mikroarrayak dira euskarri hoberenak array teknikentzat.

MIKROARRAYAK

Saiakuntzak den
aplikazioetan bai ike
naren kontzentrazioa
uzten dute prozesu a

Beste desberdint
aukeratzea da, plasti
garbiketa-pauso erra
da zundak ipintzea, p
dentsitate handiagoa
tzen dute kristal bat
fluoreszentziarik ez e

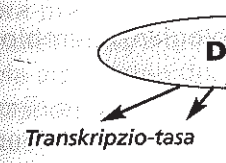
TXIP MOTA DESBERD

MOTA
Zenbat zunda/puntu
Zenbat lagin
Zundaren dentsitatea
Hibridazio-bolumena

MIKROARRAYAREN

Mikroarrayaren
kuntzako elkarteen
raketan, kalitate-kor
etorkizuneko gaixot
dearen kontrolean o

Teknologia hon
da Biologia Molekul



DNA

GENOTIPOA

Transkripzio-e

MIKROARRAYAK

Saiakuntzak denbora eta dirua murriztea begiratzen du, bai diagnostikorako aplikazioetan bai ikergaietan. Erreaktiboa bolumen gutxiagorekin lantzen da, laginaren kontzentrazioa handituz eta erreakzio zinetikoa hobetuz. Hobekuntza hauek uzten dute prozesu analitiko bakar batean ehun edo mila emaitza batera jakitea.

Beste desberdintasuna makro eta mikroarrayaren artean euskarri ez poroduna aukeratzea da, plastikoa,kristala edo silikona, hibridazio-zinetika azkarragoak eta garbiketa-pauso errazagoak uzten dutelako. Baita ere euskarri honetan errazagoa da zundak ipintzea, prozesua automatizatzea, eta horregatik lortzen ditu hibridazio-dentsitate handiagoak eta irudi-definiziorik hoberena. Mikroarray gehienek erabiltzen dute kristal bat euskarri bezala, bere abantailak dira gardentasuna eta autofluoreszentziarik ez edukitzea, eta horrela "background" oso gutxi dauka.

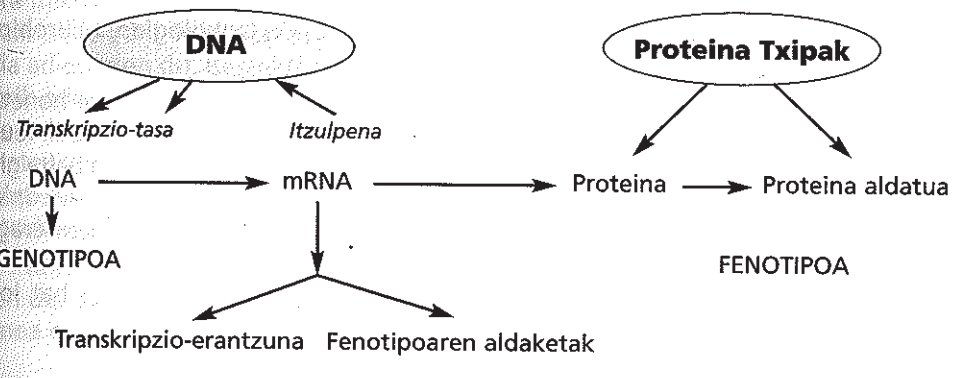
TXIP MOTA DESBERDINAK PAREKATZEA:

MOTA	MAKROA	cDNA MIKROA	OLIGO MIKROA
Zenbat zunda/puntu	40 ng	2,5 ng	10^6 –10^7oligo
Zenbat lagin	2 µg RNA	(0.05-20) µg RNA	(0.05-20) µg RNA
Zundaren dentsitatea	100/cm	3000/cm	60000/cm
Hibridazio-bolumena	5-20 mL	20-30 µL	200 µL

MIKROARRAYAREN TEKNOLOGIA KLINIKAKO APLIKAZIOETAN

Mikroarrayaren aplikazio medikoak itxaropen handi bat sortu dute biomedikuntzako elkarteen barruan. Bere erabilera, alde batetik, kontrako erreakzio aukeraketan, kalitate-kontrolean eta monitorizazioko farmaziagintzan eta beste aldetik, etorkizuneko gaixotasunen aurkikuntzan, gaixotasunen diagnostikoan eta sendabidearen kontrolean ohizkoa izango da.

Teknologia honen bi aplikazio-eremu galantak ulertzeko gogoratu egin behar da Biologia Molekularren dogma:



1. DNA Txipak:

Txip genomikoak edo sekuentziaziokoak: gene presentzia, polimorfismoak eta mutazioak aurkitzen dituzte.

Espresioaren txipak: genearen espresioa zehazten dute eta RNA neurtzen dute.

2. Proteina-Txipak: Proteina kodifikatua zehazten eta neurtzen dute.

APLIKAZIO BIOMEDIKOAK

1. FARMAKOGENOMIKA

- Botika baten ekintza-bidea jakitea.
- Tratamenduaren eraginkortasuna aurresatea.
- Diana terapeutiko berriak ezagutu, geneek botikari erantzuten dietenean desberdin espresatzen direla jakinda.
- Patologiak klasifikatu, gero botika zentzuz aukeratzeko. Eraginkortasuna handiagotu eta toxikotasuna txikiagotu.
- Saiakuntza klinikoa.

2. TOXIKOGENOMIKA

Espresio genetikoaren eskakizuna, molekula bati erantzuterakoan konparatzea botika edo egintza ezaguneko toxikoaren kontrako erantzunaren espresio eskakizun bereziarekin. Aplikazioak:

- Molekulak baztertu, kontrako erreakzioak sortzeko duten erraztasunagatik.
- Molekulak lehenetsi.

ABANTAILAK: Animalietan probak egiteko premia gutxitzen da. Analizatzeko molekulen artean lehentasun-hurrenkera jartzen da. Botika berrien bilaketa merkatzen da.

3. PRONOSTIKO ETA DIAGNOSTIKOAREN BIDEAK

- Gaixotasun berezi bati elkartuak dauden geneen aldaketak identifikatu.
- DNA-txip batean gerta daitezkeen geneen aldaketa guztiak batera aztertu.
- RNA: geneen espresio desberdintasunak jakiteko.
- DNA: Nukleotido isolatuan polimorfismoak (SNPs), ordezpenak, delezioak, intserzioak, etab. estudiatu.

Espezialitate hauetan ari dira erabiltzen mikroarrayak: Onkologian, Mikrobiologian, Hematologian eta abar.

Euskadin badago enpresa garrantzitsu bat nazioarteko mailan sektore honetan, Medplant Genetics izenekoa hain zuzen ere. Enpresa honek baditu DNA-txipak leuzemiak eta linfomak sailkatzeko, hiperlipidemiak diagnostikatzeko txipak, eta baita gizaki, arratoi, sagu eta beste hainbat eredu biologikoren espresio txipak ere. Medplant Genetics-ek analisi farmakogenomikorako plataforma bat garatu du, botiken eraginkortasun eta toxikotasuna iragartzeko, gizakiaren eta arratoiaren genoma osoko txipetan oinarrituta, eta aurreko guztiaz gainera datu-base toxikogenomiko bat lortu dute.

MIKROBIO
IRAULTZA

Xabier Beristai

2025. urt
Beristain laneg
laborategia iz
erreferentziaz
Gaur egungo
dira. Zentro b
logikoak eta n
txipen sistema
Kasu hor
dauka ikertze
Emakume hau
Zentrora joan
85.000 kopia/
E. coli honek,
zeukan, bain
Retard partxe
ziren. Gernua
sita, Osasun Z
Donostia
medio kromo
medio bat era
Hurreng
kuntza egiazt
bera mikroor
analisiak ing
dela adierazt
ziorik edo er
bea omniflo
ematen du.
genea errep
batzuk agert
Mutazio
tzen du. Bate
genea ezartz