

Genetika, zelulen, molekulen eta eboluzioaren biologiaren esparru barneko esperimentazioaren hastapena

7. Gaia: Emaidza esperimentalak



Gogoratu dezagun objektibo espezifikoak hurrengoak direla:

- 1.- MC1R-n gertatzen diren mutazioak proteinaren kokapen zelularrean nola eragiten duten ebaluatzea.
- 2.- MC1R-n dauden mutazioak melaninaren sintesiaren bidezidorrean alterazioak eragiten dituen testatzea.
 - 2.1.- Melaninaren sintesiaren bidezidorrean parte hartzen duten geneen adierazpen diferentziala aztertu WT bertsioa eta MC1R bertsio mutatua duten zeluletan.
 - 2.2.- MC1R bertsio mutantea eta WT bertsioa duten zeluletan melaninaren sintesia analizatu.
- 3.- MC1R-en mutazioak zelulen zatiketean eragiten duen testatu.
- 4.- MC1R-ren polimorfismo desberdinen maiztasunak giza espezie desberdinetan aztertu eta hautespen moduren baten pean dauden testatu
- 5.- Zeintzuk zonalde geografiko/populazioetan melanomaren intzidentzia handiagoa/txikiagos espero daitekeen aurrean.

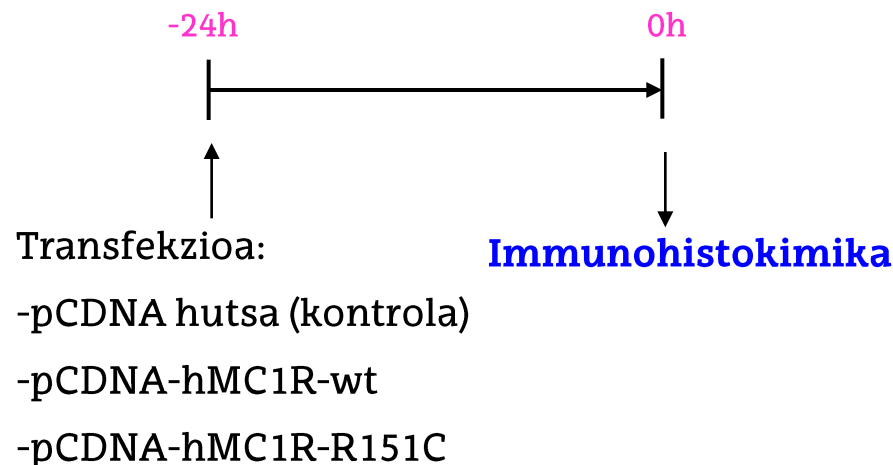


Zelulen Biologia eta Molekuleren Genetika

1. Helburua: MC1R-n gertatzen diren mutazioak (bereziki R151C mutazioa) proteinaren kokapen zelularrean nola eragiten duten ebaluatzea.

Esperimentua: B16-F10 arratoien melanozitoak giza arbasoaren MC1R genea (hMC1R-wt) daraman eta R151C polimorfismoa daraman (hMC1R-R151C) eta MC1R gainadierazten duten bektoreekin (pCDNA) transfektatu eta MC1R exogenoaren kokapena aztertu immunohistokimika bitartez.

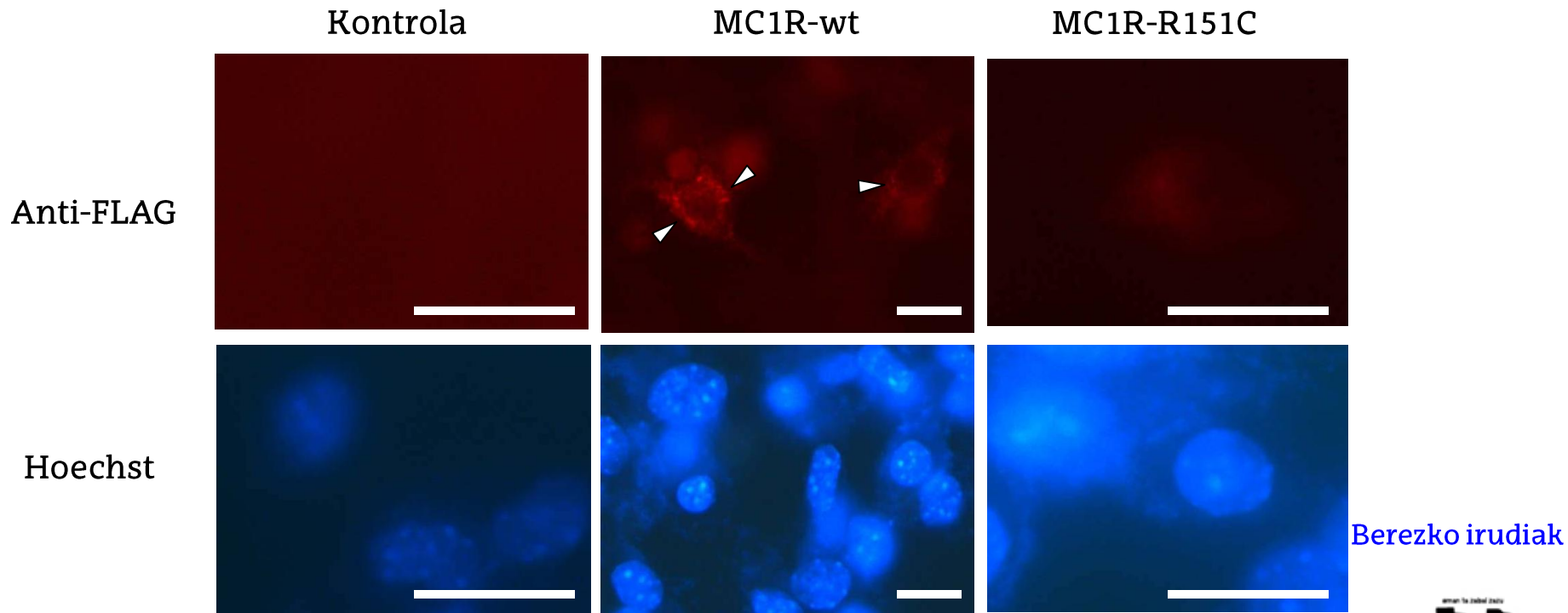
Eperimentuaren eskema:



Zelulen Biologia eta Molekula Genetika

1. Helburua: MC1R-n gertatzen diren mutazioak (bereziki R151C mutazioa) proteinaren kokapen zelularrean nola eragiten duten ebaluatzea.

Immunohistokimikaren emaitza:



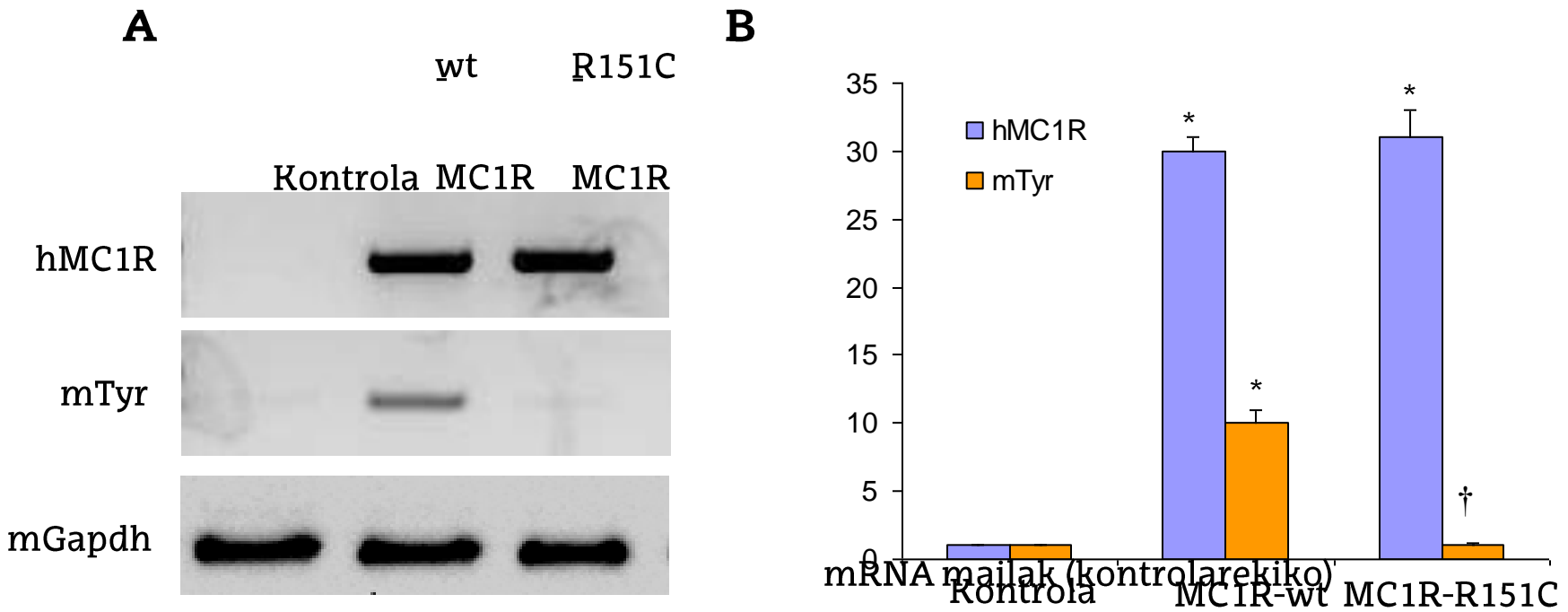
MC1R-ren immunohistokimikaren mikroskopiako argazkia (goiko lerroa) eta DNA-rako Hoechst tindaketa (beheko lerroa) adierazitako bektoreak transfektatutako B16-F10 zeluletan. Triangelu zuriek MC1R-ren presentzia adierazten du mintz plasmaticoan. Eskala-marra = 25 μ m.



Molekulan Genetika

2.1. Helburua: Melaninaren sintesiaren bidezidorrean parte hartzen duten geneen adierazpen diferentzian R151C mutazioak eraginik duen aztertu.

RT-PCR emaitzak:



A irudian adierazitako bektoreekin transfektatutako B16-F10 zeluletatik isolaturiko RNAtik lorturiko adierazpen geniko emaitzak azaltzen dira (Gapdh kontrol endogeno gisa erabili da). B irudiak A irudiko emaitzen kuantifikazioa azaltzen du. 3 esperimentuetan burututako adierazpen baloreen batazbestekoak azaltzen dira kontrol endogenoarekiko normalizatuak eta hutsik dagoen bektoreekin transfektatutako zelulekiko erlatibizatuak. Errore-marrek desbidazio estandarra adierazten dute. Emaitzak Student-en T testa aplikatuz konparatzen dira. *p < 0.002 vs kontrola; p < 0.002 vs MC1R-wt.

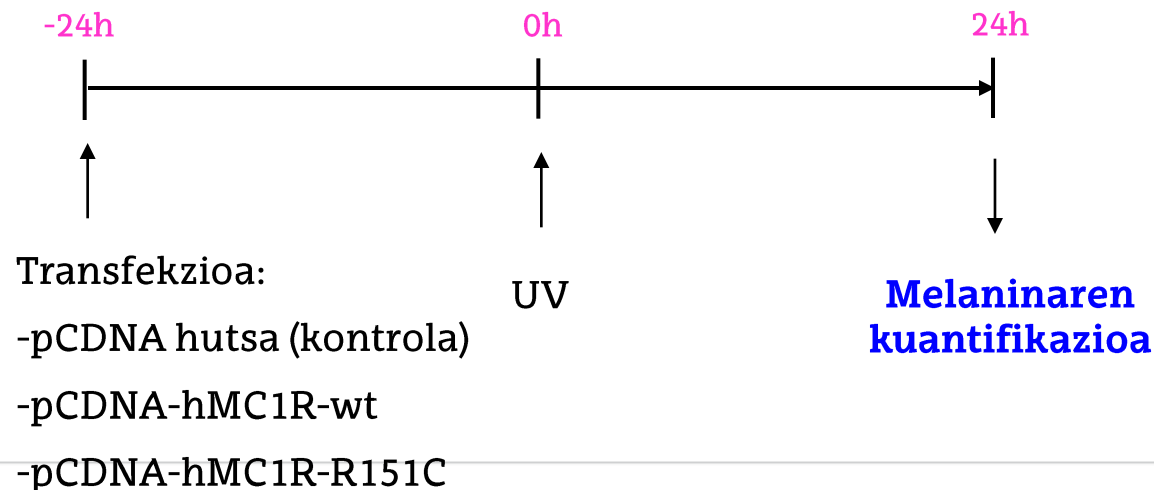


Zelulen Biologia eta Molekuleren Genetika

2.2. Helburua: MC1R-ren R151C mutazioak melanina kopuruan eragiten duen testatu.

Esperimentua: B16-F10 arratoien melanozitoak giza arbasoaren MC1R genea (hMC1R-wt) daraman eta R151C polimorfismoa daraman (hMC1R-R151C) eta MC1R gainadierazten duten bektoreekin (pCDNA) transfektatu, melaninaren sintesia UV argiarekin aktibatu eta melanina kuantifikatu

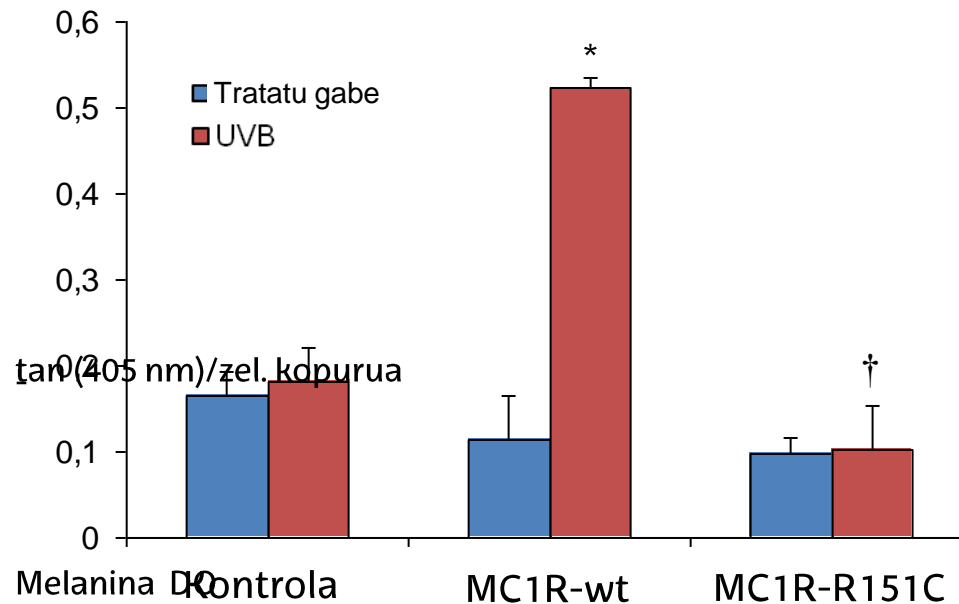
Esperimentuaren eskema:



Zelulen Biologia eta Molekulu Genetika

2.2. Helburua: MC1R-ren R151C mutazioak melanina kopuruan eragiten duen testatu.

Melaninaren kuantifikazioaren emaitza:



Irudiak melanina-kopurua (UVB pean adierazitako bektoreekin transfektatutako B16-10 zeluletako absorbantzia gisa) erakusten du. Tratatu gabeko zelulak transfektatuak izan ziren baina ez ziren UVB pean jarri. Emaitzek 3 esperimentuen absorbantzien batzbestekoak erakusten dituzte. Errore-marrek desbidazio estandarra adierazten dute. * $p < 0.002$ vs kontrola UVB; † $p < 0.002$ vs MC1R-wt UVB.

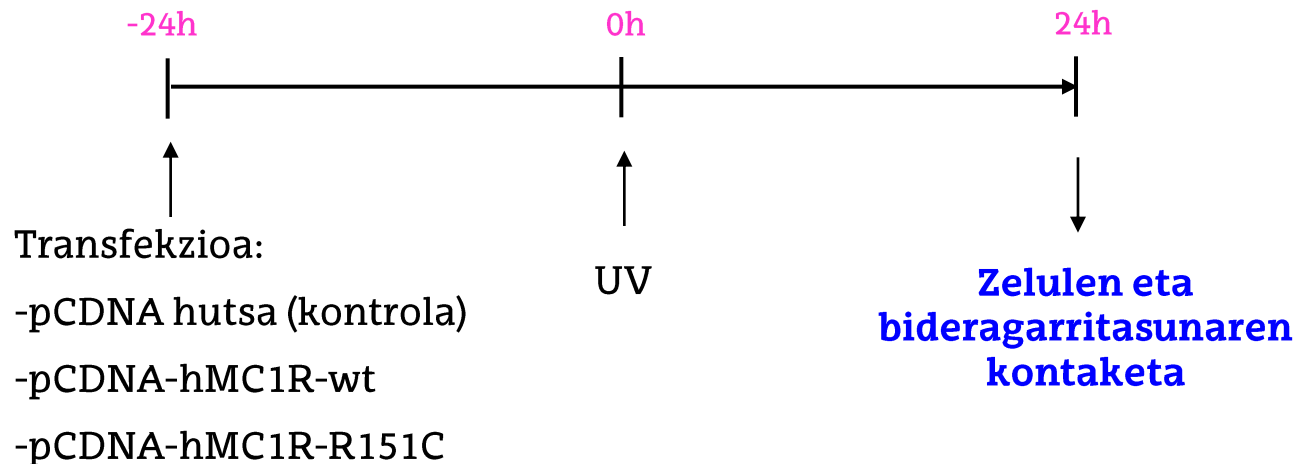


Zelulen Biologia eta Molekuleren genetika

3. Helburua: MC1R-en mutazioak zelulen zatiketan eragiten duen testatu

Experimento: B16-F10 arratoien melanozitoak giza arbasoaren MC1R genea (hMC1R-wt) daraman eta R151C polimorfismoa daraman (hMC1R-R151C) eta MC1R gainadierazten duten bektoreekin (pCDNA) transfektatu, melaninaren sintesia UV argiarekin aktibatu eta zelulen hazkuntza eta bideragarritasun kurba bat egin.

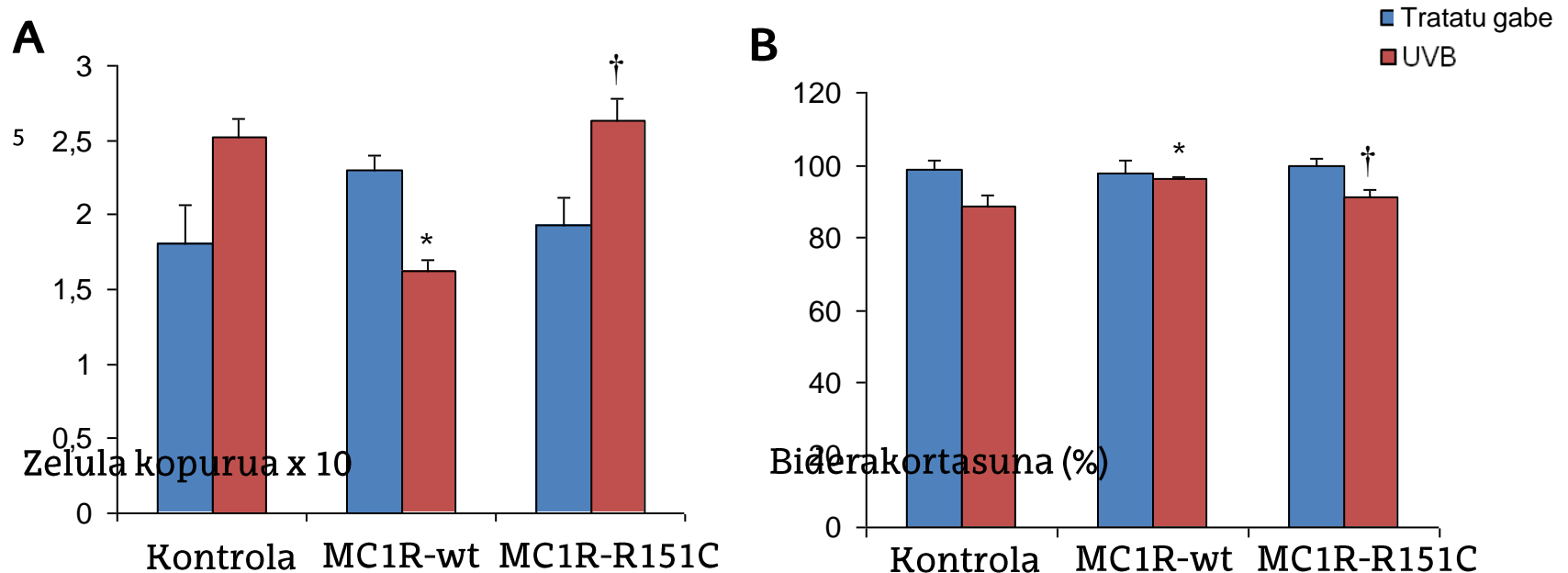
Esperimentuaren eskema:



Zelulen Biologia eta Molekulen Genetika

3. Helburua: MC1R-en mutazioak zelulen zatiketan eragiten duen testatu

Zelulen hazkuntza eta bideragarritasunaren kurba:



UVB pean adierazitako bektoreekin transfektatutako B16-10 zelulen proliferazioaren (A irudia) eta bideragarritasunaren (B irudia) emaitzak. Emaitzek batezbestekoak adierazten dituzte eta errore-marrek desbidazio estandarra. Tratatu gabeko zelulak transfektatuak izan ziren baina ez ziren UVB pean jarri. * $p < 0.002$ vs kontrola UVB; $p < 0.002$ vs MC1R-wt UVB.



Populazioen Genetika eta Bioinformatika

- 4. Helburua:** R151C-ren amiztasunak giza talde desberdinetan aztertu. Ikerketa MC1R locus guztiari zabaldu, aniztasun geniko guztia aztertzeko eta MC1R-n dauden mutazioak hautespen mota baten pean dauden testatzeko.
- 5. Helburua:** Zeintzuk zonalde geografiko/populazioetan melanomaren intzidentzia handiagoa/txikiagoa espero daitekeen auresan.

Lehendabizi MC1R genearen koordenatuak identifikatuko ditugu UCSB (UTR ez den zonalde kodifikatzailekoa) erabiliz, hots: **chr16:89985667-89986620**

Erreferentzia-sekuentziaren fitxategi, testu leun gisa gordetzen dugu (MC1R_refseq_hg19.txt).

Koordenatu hauek erabiliz, sekuentziaren polimorfismoen datuen bila goaz hurrengo populazioentzat AFR (Afrika: LWK, YRI y ASW), SEU (TSI y IBS) eta NEU (CEU, GBR, y FIN). Tutoretzak gogoratu: bi fitxategi sortu MC1R_POP_genotypes.txt y MC1R_POP_statistics.txt

