



Gradu Amaierako Lana
Biologiako Gradua

Bularreko minbiziaren prebentziorako *BRCA1* gene mutatuaren edizioa CRISPR/Cas9 teknikaren bidez

Egilea:
Iria Arrese Muñoz
Zuzendaria:
Ainhoa Iglesias Ara

© 2018, Iria Arrese Muñoz

AURKIBIDEA

1. LABURPENAK	2
1.1. Abstract	2
1.2. Laburpena	3
2. SARRERA	4
2.1. Bular minbiziaren maiztasunak Espainia eta Euskal Autonomia Erkidegoan	4
2.2. Gaixotasunaren kausak eta arrisku faktoreak	5
2.3. Inplikaturako geneak	6
3. <i>BRCA1</i> GENEA ETA 5382 ins C MUTAZIOA	7
4. BESTE MINBIZI MOTA BATZUEKIN EGINDAKOA	8
5. HELBURU OROKORRA ETA HELBURU ZEHATZAK	10
6. METODO ESPERIMENTALA	11
6.1. Lerro zelularren hautaketa	11
6.2. Sekuentzia mutatuaren edizioa CRISPR/Cas9 sistema erabilita	11
6.3. Edizioaren frogapen genotipikoa	16
6.4. Edizioaren fenotipoaren azterketa	17
7. ONDORIOAK, ESPEROTAKO EMAITZAK ETA PROIEKTUAREN ONURAK	19
8. BIBLIOGRAFIA	20

1. LABURPENAK

1.1. Abstract

Nowadays, a large amount of cancer cases are diagnosed every year, of which 23% correspond to breast cancer. In addition, breast cancer is the main cause (14%) of death among women and, therefore, many studies have been accomplished in it. Those studies have proven that two genes are mainly related to breast cancer, namely *BRCA1* and *BRCA2*. In this project we are going to focus on one of these two genes, the *BRCA1* gene, which in humans is found in chromosome 17 (17q21), because some of the mutations of this gene are common among breast cancer patients and among the people from the same family. This gene encodes for a tumor-suppressor protein, known as p220. This protein has a key role in the control of cell cycle, as it interacts with other key proteins that regulate cell cycle, like p53. Moreover, when mutations in the *BRCA1* gene appear, cell cycle control is inhibited, and an over-proliferation of cells occurs. This can lead to the developing of a breast or ovarian cancer. Among the mutations described in this gene, two are those that prevail: the 2-nucleotide deletion in exon 2, 187delAG, and the insertion of a nucleotide in exon 19, 5382insC. Because of the high risk of developing cancer in carriers of this latest mutation (67%), *BRCA1* 5382insC has been addressed in the present work. Here we propose that editing this mutation would have an impact in reducing the risk of developing cancer. Thus, as a proof of principle, the following pilot project is proposed. We will use HCC 1937 mutated cell line, which is homozygous for *BRCA1* 5382insC mutation, as an experimental *in vitro* model. It is proposed to perform the edition using the CRISPR/Cas9 edition-system in order to make the mutated cell line become wild-type. To conduct the edition, we will transfect HCC 1937 cells with 2 plasmids: one co-expressing a guide-RNA to the mutant sequence and Cas9 nuclease; and another one, providing the donor DNA wild-type for *BRCA1* to facilitate the repair of the cleaved DNA by the cells. In order to test the outcome of the edition, we will analyse the proliferative index and the sensitivity to chemotherapy in edited HCC 1937 cells.

Key words: Breast cancer, *BRCA1*, 5382insC, HCC 1937, gene edition, CRISPR/Cas9

1.2. Laburpena

Gaur egungo gizartean gero eta minbizi kasu gehiago diagnostikatzen dira urtero, eta horien artean % 23a bular-minbiziari dagokio. Gainera, minbizi mota hori nagusienetakoa da emakumeen heriotza kausen artean, % 14a alegia. Hori dela eta, azterketa asko egin izan dira bular minbiziaren inguruan eta bi gene dira, nagusiki, bular minbiziarekin lotu direnak, *BRCA1* eta *BRCA2*, hain zuzen. Lan honetan bi hauetako bat aztertuko da, *BRCA1* genea, gizakiotan 17. kromosoman kokatzen dena (17q21), gene honen zenbait mutazio komunak direlako bular-minbizia duten gaixoen artean eta baita familia berekoen artean ere. Gene honek tumore-supresorea den p220 proteina kondetzen du eta bere ziklo zelularraren kontrolean funtsezko papera betetzen du. Izan ere, zelulen zikloko zenbait bidezidor konplexutan parte hartzen du, beste proteina batzuekin elkar eraginez, p53 proteinarekin adibidez. *BRCA1* genean mutazioak gertatzean, baina, ziklo zelularraren kontrola inhibitu egiten da eta zelulen gehiegizko ugaritzea gertatzen da, bular zein obario minbizia dakarrena. Gene honetan deskribatutako mutazioen artean bi dira nagusitzen direnak: 2. exonean ematen den 2 nukleotidotako delezioa, 187delAG, eta 19. exonean ematen den nukleotido baten insertzioa, 5382insC. Lan honetan azken mutazio hau landu da, handia baita mutazio honengatik bular-minbizia garatzeko arriskua (% 67). Lan honetan, beraz, proposatzen dugu mutazio honen edizioak bular-minbizia garatzeko arriskua murriztuko duela. Hortaz, oinarrien-froga moduan hurrengo proiektu pilotua proposatzen da. Mutatutako HCC 1937 lerro zelularra erabiliko dugu, *in vitro* modelo esperimental moduan. Mutatua *BRCA1* 5382insC mutaziorako homozigotoa da. Mutatutako zelulak basati bihurtzeko helburuarekin, proposatzen da CRISPR/Cas9 edizio-sistema erabiltzea edizioa aurrera eramateko. . Horrela, edizioa zuzentzeko, HCC 1937 zelulak transfektatuko dira 2 plasmido erabilita: bat RNA gidaren eta Cas9 nukleasaren ko-adierazpenerako, eta bestea DNA-emaiaren eramailea, *BRCA1* generako basatia dena eta DNAREN konponketa faboratuko duena., ugaritze-HCC 1937 zelula editatuetan, indizea eta kimioterapiarekiko sentikortasuna analizatuko dira, edizioaren ondorioak aztertzeko.

Hitz gakoak: Bular-minbizia, *BRCA1*, 5382insC, HCC 1937, gene-edizioa, CRISPR/Cas9

2. SARRERA

2.1. Bular minbiziaren maiztasunak Espainia eta Euskal Autonomia Erkidegoan

Minbizia deritzo, zelula anomalo bat kontrol gabe bikoizten hasten denean eta alboko ehunak inbaditzeko gaitasuna hartzen duenean sortzen deneko gaixotasunari, minbizi-institutu nazionalaren (NCI) arabera, osasun institutu nazionalaren (NIH) barne dagoena. Gainera, zelula hauek alboko ehunak inbaditu ditzakete, baina ez hori bakarrik, gorputz guztira zabaldu daitezke odol sistema edo sistema linfatikoa garraio bide dutelarik. Bestalde, kontuan izan behar da baita minbizi mota bat baino gehiago daudela: kartzinoma, zelula epitelialez osatutako tumore gaiztoa; sarkoma, mesenkimako zelulek eratutako tumore gaiztoa; leuzemia, hezur muinean hazi eta odol zelula anomaloak eraentzen dituen; eta linfomak eta mielomak immunitate sistemako zeluletan eragina dutenak. Dagoen aniztasuna dela eta, beraz, modu anitzean eragin dezakete eta, horren ondorioz, tratamenduak ere ezberdinak izango dira minbizi mota bakoizterako.

Gaixotasun honek duen gorputz-sakabanaketa eta konplexutasuna direla eta, historian zehar gaixotasuna bera ulertzeko zailtasunak egon dira. Gainera, minbiziaren intzidentzia-tasa oso altua da mundu guztian zehar. Diagnosiari dagokiola, mundu-mailan detektatzen diren minbizi kasuen % 23a bularrekoak dira eta, horien artean, emakumeetan minbiziaren ondorioz hiltzen direnen % 14 kausa honengatik da (Sharma *et al.*, 2018). Hori dela eta, azkenengo urteetan ikerkuntza ugari bideratu dira gaixotasun honi aurre egiteko tratamendu baten bila eta gaur egun, kimioterapia da tratamendurik erabiliena. Tratamendu honen helburua da zatiketa-tasa altua duten zelulak hiltzea, baina aurkako efektu modura, kalteak sortzen ditu beste zenbait zeluletan. Ondorioz, espezifikoagoak diren tratamenduen beharra ikusten da. Egia da, baina, kimioterapia baino espezifikoagoak diren tratamenduak badaudela, bideratutako terapiak hain zuzen. Azken hauek aurrera eramaten dira itu-molekula bat izango duten farmako edo drogen bidez. Bular minbiziaren kasuan, askotan itu-molekula hori HER2/neu proteina izaten da, eta beraz, HER2 proteinarako positiboak diren kasuetan, proteina horren kontra egingo duten farmakoak erabiltzen dira. Hala ere, tratamendu hauek ez dira espero bezain eraginkorrak. Izan ere, bular-minbizi kasu guztietan ez da proteina hau agertzen, hau da, pertsona batzuk HER2 proteinarako negatibo izango dira eta hortaz, ezin izango da erabili proteina hori ezagutzen duen drogarik erabili.

Bular-minbiziaren intzidentziak ere agerian uzten ditu tratamenduek dituzten mugak. 2017. urtean 228.482 minbizi kasu berri detektatu dira, Espainiako Minbiziaren Kontrako Elkartearen arabera (AECC); ordea, duela 10 urtetako intzidentzia % 13,62 altuagoa zen, datuen arabera (197.361 kasu berri). Zehatzago begiratuta, lan honetan landuko den bular-minbiziaren 26.370 kasu berri hauteman dira 2017an, detektatutako kasuen % 11a. Gainera, bular-minbizia izan da emakumeetan eman diren minbizi kasuen % 29a, emakumeetan intzidentzia altuena duen minbizia mota izanik. 2017an bular-minbizia garatu zuten emakumeetatik % 24,7a hil egin zen. Datu hau duela 10 urtekoa baino % 1 baxuagoa da,

nahiz eta oraindik hilkortasun-tasa nahiko handia izan. Egia da, baina, bular minbiziaren diagnostia egin eta 5 urtetara, gaixoen %41a bizirauteko gai izan dela azkenengo urtean.

AEECC-k eta Estatistikako Institutu Nazionalak (INE) eskainitako Euskal Autonomia Erkidegoko (EAE) datuei erreparatuz, 2017-an honakoek pairatu dute bular-minbizia: Bizkaian emakumeen % 0,12, Gipuzkoan emakumeen % 0,11 eta Araban % 0,11ak. Horrez gain, aipatutako portzentaje hauetatik hil zireneko portzentajea honakoa da: Bizkaian % 26,7-a, Gipuzkoan % 20,5a eta Araban % 16,3a. Duela 10 urte intzidentzia hiru probintzietan antzekoa zen, heriotza-tasa, aldiz, egun baino altuagoa; beraz, esan daiteke, nolabaiteko onura izan dutela bular-minbiziaren prebentziorako osasun-zerbitzu publikoak eginiko kanpainak. Izan ere, Osakidetza bular-minbiziaren prebentzio aurreraturako programa bat jarri zuen martxan duela 23 urte (hots, 1995. urtean). Azken hau datza, 50-69 urte bitarteko emakumeei edota aurrekari familiarak dituzten 40-49 urte bitarteko emakumeei aldizkako azterketak egitean. Xedea da bular-minbizia diagnostikatu ahal izatea bere oldarkortasun-maila murriztuz dagoenean. Modu horretan, tratamendua ahalik eta bizkorren jasotzen dute gaixoen eta arazo larriagoak sortzea ekiditen da, minbizi-mota honek eragindako hilkortasun-maila murriztuz.

Aurreko datuei so eginda, argi dago bular-minbizia emakumeetan hilkortasun-faktore garrantzitsuenetarikoa dela gaur egingo gizarrean. Haatik, Minbizi Institutu Nazionalak (NCI) 2013an plazaratutako azterketa batek adierazte du 1990etik 2013ra arte bular minbiziak eragindako heriotza-tasa % 34an murriztu dela. Hobekuntza hau faktore askoren eragina izan daiteke, besteak beste: aurretik aipatutako detekzio goiztiarreko metodoak, obesitatearen kontrako kanpainak eta kimioterapia tratamenduen hobekuntza (Cope, 2013).

2.2. Gaixotasunaren kausak eta arrisku faktoreak

Bular-minbizia izanik emakumeen artean intzidentzia hain handia duen minbizia, azpimarratzekoa da zenbait arrisku faktorek eragina dutela bere garapenean. Hiru talde nagusitan sailka daitezke arrisku faktore horiek: (i) faktore psikologikoak, (ii) faktore sozialak eta (iii) faktore biologikoak (Özkan *et al.*, 2017). Faktore psikologikoei dagokiela, kontuan hartzekoak dira ekintza kaltegarriak eragiten dituzten bizitzako ekintza estresagarriak; erretzea eta edari alkoholikoen edatea, adibidez. Faktore sozialek ere eragina izan dezakete, hezkuntza, baldintza ekonomikoa eta estatus soziala beste batzuen artean. Faktore biologikoak, baina, izango dira funtsean garrantzia edo inpaktu handiena izango dutenak. Azken hauetan garrantzitsuenak 3 dira: adina, beste gaixotasunen presentzia gaixoen historia-medikuan eta minbizi-historia familiarra. Lan honetan azkena landuko da, zeren, indibiduo batek minbizia pairatzeko duen probabilitatea handiagotu egiten da bere familian aurrekariak badaude (Özkan *et al.*, 2017). Izan ere, bular minbizien % 10-30 bitartean faktore heredagarriak egozten zaie (Costa & Saldanha, 2017). Adina ere ez da ahaztu beharreko auzi bat, izan ere emakumeek 70 urtetik aurrera % 57ko arriskua daukate garatzeko *BRCA1* genearen mutazioekin lotutako bular-minbizia (Sharma *et al.*,

2018). Ikusita faktore biologikoen eragina, zenbait ikerlari horien garrantzia aztertzen aritu dira. Coignet eta bere lantaldeak 2017an, jatorri ezberdineko emakumeekin lan egin zuten, ugalketa-adinak bular minbizian duen eragina aztertu nahian. Beraien helburua menopausia goiztiar edo berantiarrak inolako eraginik duenentz determinatzea zen. Tamalez, ez zen inolako adierazgarritasunik agertu bi aldagaien artean, ez menopausia goiztiarraren kasuan ez eta berantiarrarenean; emaitza hau lagin-tamainari leporatu zioten.

2.3. Inplikaturako geneak

Esan bezala, bular minbiziaren arrisku faktore garrantzitsuenetariko bat historia familiarra da, hau da, mutazio bat gurasoengandik heredatzeagatik gaixotasuna garatzeko aukera. Hori dela eta, ikerketa anitz bideratu dira bular-minbiziarekin erlazionatuta egon daitezkeen geneak ikertzen. Gauzak horrela, hainbat gene proposatu dira bular minbiziaren eragile gisa.

Hauen artean, azken boladan aztertuenetarikoak *BRCA* geneak izan dira, bai *BRCA1* zein *BRCA2* geneak (Forat-Yazdi *et al.*, 2015; Neamatzadeh *et al.*, 2015). Azterketa desberdinetan aurkitu da, gene bi hauetan dauden zenbait mutazio komunak direla bular-minbizia duten gaixoen artean eta baita familia berekoen artean. Estimatu da 70 urte baino gazteagoak diren emakumeen kasuan, *BRCA1* mutantedun genotipoa dutenek, bular-minbizia garatzeko % 57-65eko arriskua daukatela (Chen *et al.*, 2007). Nahiz eta emakumeen artean bular minbiziaren prebalentzia gizonezkoena baino handiagoa izan, ez da ahaztu behar gizonen artean ere eman daitekeela. Izan ere, *BRCA1* gene mutatuak duten gizonezkoen artean bular-minbizia pairatzeko arriskua % 1,2koa da (Tai *et al.*, 2007). Gainera, onetsi da bular-minbizia heredagarrien kasuan % 25-28a *BRCA1* geneen mutazioek eragindakoak direla (Sharma *et al.*, 2018).

Baina hauek ez dira bular minbiziarekin erlazionatu diren gene bakarrak. Aurkitu da, *BCAT1* geneak ere bular-minbizi zelulen hazkuntza sustatzen duela, m-TOR-ean eragiten duen heinean, mitokondrio biogenesisia eta funtzioa hobetzen duelako (Zhang & Junqing, 2017). Topatu da, *GATA3* geneak ere bular-minbizian zerikusia duela. Zehazki, aztertu da genearen adierazpena azpi-erregulatuz *ZNF503/Zpo2* eramailea den bular-minbizi oldarkorraren bilakaera ematen dela (Shahi *et al.*, 2017). Beste saio batean, bular minbiziaren inbasioa kontrolatzen saiatu dira baita, *STAT3* genean erregulazioa eginda, beste hainbat minbizitan onkogene bezala jokatzen baitu, eta modu horretan minbiziaren inbasio eta metastasian gako den rol-a betetzen duelarik (McDaniel, 2017). Gainera, aurkitu da zenbait transkripzio-faktorek ere paper garrantzitsua jokatzen dutela. 2017an eginiko ikerketa batean, eragin positibo bat hauteman zen bular-minbizi zeluletan, prolaktina indutziailea den *STAT5* transkripzio faktorea erregulatuta, H1 histona eta HMG2 proteina kromosomikoen bidez (Schauwecker *et al.*, 2017). Beste minbizi mota askotan ezagunak diren p52 eta p100 proteinek ere bular minbizian ama-zelulen erregulazioan parte hartzen dute. Proteina hauek *Nfkb2* geneek ekoizten dituzte, beraz esan daiteke gene hauek ere paper garrantzitsua dutela minbizi zelulen erregulazioan (Yeo *et al.*, 2017).

Guztia kontuan izanda, nahiz eta gene desberdin ugarik bular-minbiziaren garapenean parte hartu, *BRCA* geneetako bat landuko da, *BRCA1* konkretuki, *BRCA* geneak direlako aztertuenetarikoa. Gene honetan emandako mutazioengatik eta honen herentziagatik jasotako bular-minbizia landuko da zehazki. Horretarako, aztertuko da bular-minbizia garatzeko % 67ko arriskua sortzen duen 5382insC mutazioa (Antoniou *et al.*, 2005), g.160921dup Human Genome Variation Society-aren (HGVS) arabera. Genearen eta mutazioaren ezaugarriak ezagututa, lan honetan planteatuko da lerro zelular mutatu batetatik, HCC 1937, mutazioa desagerrarazteko diseinua. Mutazio hau konpontzea lortzekotan, bular-minbizia garatzeko arrisku-maila ere murriztu egingo litzateke, proiektuaren helburu nagusiarekin bat eginez.

3. *BRCA1* GENEA ETA 5382 ins C MUTAZIOA:

BRCA1 genea 17. kromosomako beso luzean kokatuta dago (17q21). 23 exonez osatutako gene luzea da (1. Irudia), bi proteina ekoizten dituena. Bi proteinetatik ikertuena bere lehenengo isoforma da, p220 bezala ezaguna dena. Proteina hau, 1863 aminoazidoz osatua dago eta tumore-supresore bezala jokatzen du (Silver & Livingston, 2012). p220 proteina nukleoan kokatzen den fosfoproteina bat da, lau domeinu funtzionalez osatua dagoena: (i) N-terminalaren ondoan dagoen RING domeinua, zeinak *BRCA1* eta *BARD1* proteinen arteko lotura faboratzen duen, bai eta proteina-DNA interakzioa, (ii) 11. exonean kokatutako bi seinale peptido daude proteina nukleoan kokatzeko (iii) "SQ" kluster bat p.1280 eta p.1524 artean eta (iv) BRCT domeinu bat C-terminalean (Petrucci *et al.*, 2010). Gene honetan, Alu sekuentzien dentsitatea nahiko handia da (% 41,5) baina, sekuentzia errepikakorren dentsitatea nahiko baxua (% 4,8). Honetaz gain, behatu da *BRCA1* genean aurkitu den delezio/duplikazio ratio altua (% 42) Alu sekuentzien presentziagatik izan daitekeela (Karami & Mehdipour, 2013).

Tumore-supresorea izanagatik, bere funtzioa minbizietan ematen den zelulen zikloaren gain-aktibazioa inhibitzea da, zelulen hazkuntza eta ugartzea kontrolatuz. Izan ere, zelulen zikloko zenbait bidezidor konplexutan parte hartzen du beste proteina batzuekin elkar eraginez, p53-ekin besteak beste. Guzti honetaz gain, *BRCA1* geneak zelulen zikloko kontrol puntuetan harizpi bikoitzeko DNA konpontzeko funtzioa du, errekonbinazio homologoaren bidez (Hatchi *et al.*, 2015). Beraz, arduratzen da DNA kaltetuaren konponketaz, transkripzioaren erregulazioaz, genomaren osotasunaren mantenuaz, erreplikazioaz, errekonbinazioaz eta kromosomen kontrol hierarkikoaz (Sharma *et al.*, 2018). Obario- eta bular-minbizia izango dira gene honen mutazioen ondorioz emango diren minbizi ohikoenak. Izan ere, gene honen mutazioen eraginez, ematen da bular-minbizia heredagarriaren kasuen % 30a eta bular- eta obario-minbizi heredagarri kasuen % 80a (Apostolou & Fostira, 2013). Baina zenbait kasutan pankreako zein prostatako minbizia ere garatzea eragin dezake (Paul & Paul, 2014).

Proteina ez-funtzionala sortzearekin erlazionatutako mutazioak, *BRCA1* genearen sekuentzia kodetzaile guztian zehar aurkitu izan dira (Linger & Kruk, 2010). Mutazioaren eramaileek lerro

germinalean mutaturako kopia bat izango dute, heredatua izan dena, eta tumorean bigarren mutazio somatiko berri bat izango dute heterozigozitatea galduko delarik (Oluwabemiga *et al.*, 2012)

BRCA1 genearen mutazioak eskualdearen eta arrazaren arabera maiztasun ezberdinarekin agertzen dira. Ez hori bakarrik, gene hau oso heterogeneoa da eta mota askotako mutazioak aurkitu izan dira. Hala nola, *frameshift*, *missense*, *nonsense*, irakurtarauan eragina duten insertzio eta delezioak, moztitsasketan eragiten duten mutazioak, mutazio isilak eta transkribatzen ez diren eskualdeetako mutazioak (Linger & Kruk, 2010). Baina arazo gehienek sortzaileak *frameshift* eta *nonsense* motako mutazioak dira. Hauen eraginez *stop* kodon goiztiarra gehitzen da proteina ez-funtzional bat sortuz. Gainera, behatu da mutazioak genearen N edo C terminalean ematen badira, bular-minbiziaren garapen-probabilitatea handiagoa izango dela; ostera genearen erdialdean ematen bada, handiagoa izango da obarioetako minbiziaren garapen-probabilitatea (Rebbeck *et al.*, 2015). Anitzak izan arren, gene honetan aurki ditzakegun mutazioen artean bi dira prebalentzia handiena dutenak, 187delAG eta 5382insC (1. Irudia) (Petrucci *et al.*, 2010).



1. Irudia: *BRCA1* genearen eskema, intron eta exonen irudikapen grafikoa. 187delAG eta 5382insC mutazioen kokapena genean.

Lan honetan 5382insC mutazioa landuko da. Mutazio hau zitosina (C) nukleotido bakarraren insertzio bat da, *BRCA1* genearen 19. exonean ageri dena. Mutazioa Europar populazioetan zabalduena da, Asiar eta Amerikar populazioen artean aurkitu den arren, oso indibiduo gutxitan baitago deskribatua (Sharma *et al.*, 2018). Genearen 160921 posizioan C bikoiztu egiten da eta modu horretan genearen irakurtaraua aldatzen du. Horren ondorioz, proteina ez-funtzional bat sintetizatzen da; izan ere, 1829. kodonean *stop* seinale goiztiarra gehitzen da (Linger & Kruk, 2010). Izatez, gene honek kodetutako proteina tumore-supresorea izango da, baina insertzio honen eraginez funtzioa betetzea ekidin egiten da.

Ikusita gaur egun arte bular minbiziaren tratamendurako erabilitako metodoak ez direla nahikoa izan honen intzidentzia guztiz murrizteko, azken urteotan ingeniari genetikoak entzutetsu egiten ari da. Estrategia desberdin askorekin lan egiten ari dira animalia-modeloak edo lerro zelular eraldatuak sortuz giza-gaixotasunen aurka borrokatzeko (Cox, Platt & Zhang, 2015).

4. BESTE MINBIZI MOTA BATZUEKIN EGINDAKOA

2012an frogatu zen lehen aldiz CRISPR/Cas9 sistema eraginkorra zela giza zeluletako genoma editatzeko eta harrez geroztik, hainbat saiakuntza egin dira (Togashi *et al.*, 2015). Honi so eginda, edizio-

sistema hori proposatu izan da minbizi-moten terapiarako: biriketako minbizian (Cyranoski, 2016), kolon-ondesteko minbizian (Matano *et al.*, 2015), p53 genearekin erlazionatutako minbizietan (Wanzel *et al.*, 2016) eta zerebroko tumoreetan zerikusia duten gene mutatuak lantzeko (Mao *et al.*, 2016), besteak beste.

Txinako Lu You eta bere taldeak 2016an lehen aldiz CRISPR/Cas9 sistema erabilia eraldatutako zelulak baliatu zituzten biriketako minbizia zuen paziente batean, minbizi horren tratamendu experimental bat burutuz (Cyranoski, 2016). Hauek, biriketako minbizi ez-mikrozitiko metastasikoa zuen pazientearen odoletik immunitate zelulak eskuratu eta PD-1 proteina kodetzen duen genea desaktibatu zuten. PD-1 proteina honek zelulen erantzun immunea oztopatzen du eta funtzio horretaz baliatuz minbizi zelulek ugaritzeko aprobetxatzen dute. Beraz, proteina horren faltan ugaritze ahalmen hori murriztu egiten da eta minbiziak barreiatzeko arazo gehiago izango ditu, nolabait kontrolatuta egongo dela. Behin *in vitro* odoleko immune zelulak eraldatu eta hazi ondoren, pazienteari injektatu zizkioten. Egia da baina, tratamendua oso geldoa izan zela eta hori dela eta bigarren injekzio bat egitea planteatu zen.

In vitro eginiko beste saiakuntza batean CRISPR/Cas9 sistema erabilia, MET 14 exonean delezioa burutu zen eta modu horretan hobekuntzak lortu ziren bai hazkuntza zelularrean, bai kolonien formakuntzan, bai eta zelulen MET inhibitzailearekiko sentsibilitatean (Togashi *et al.*, 2015). Hala ere, lan honetan ez zen minbizi-lerro zelularrik erabili eta proposatu dute etorkizun batean terapia baterako erabilgarria den informazio gehigarria lortzeko, aurretik minbizi lerro zelular batean frogatzea beharrezkoa dela.

Askotan baina, zuzenean mutazioak konpontzeko erabili beharrean, metodo hau erabili izan da lerro zelular mutatuak lortu eta hauei aurre egiteko farmakoen sintesirako edota erresistentzia mekanismoen azterketarako. Honen adibide, 2017an Park eta bere lan taldeak biriketako bular minbizidun lerro zelularra sortu zuten, EGFR T790M mutazioduna Gefitinib farmako kontzentrazio ezberdinen eraginak aztertzeko (Park *et al.*, 2017).

Gainera, beste hainbat gauza frogatzeko erabilia izan daiteke CRISPR/Cas9 sistema erabilia eginiko gene-edizioa. Hauen artean minbizi baten inbaditzeko gaitasuna. 2015an kolon-ondesteko minbizia sortzen duten mutazio ezberdinak aztertu ziren. Ikusi zen nola minbiziaren jokaera inbasiboa emateko lesio molekular asko eman behar direla. Aipatutako lesio molekular gehigarriak eman ezean, nahiz eta inbaditzeko gaitasuna izan, eragina askoz ere murriztagoa izango dela determinatu zuten (Matano *et al.*, 2015).

Ikerketak ere p53 tumore supresorearekin egin dira, behatu da gene honen berraktibazioa mugatuta dagoela erresistentzia mekanismo espezifikoenatik. Beraz, proposatu da erresistentzia hauek CRISPR/Cas9 metodoan oinarrituta editatuz gero p53 tumore supresorearen aktibazioa eman ahal izango dela (Wanzel *et al.*, 2016).



Guzti honek aditzera ematen du geneen ediziorako sistema hau ez dela soilik zuzenean geneak editatuz hauek sor ditzaketen arazoak konpontzeko mekanismo bat. Metodo hau lagungarria izan daiteke farmakoak lerro zelularretan testatzeko, modu horretan animalietan egiten diren azterketen kopurua murriztuz. Ez hori bakarrik, zelulen erregulazio mekanismoak ezagutzea ere baimentzen du, hauen kontrola izateko aukera emanda eta beste zenbait gauzaren azterketak egitea baimenduz. Gainera, baliagarria izan daiteke lan honetan planteatzen den oinarrien-frogan proposatutako sekuentzia mutatuaren *wild-type*-erako eraldaketak egiteko.

5. HELBURU OROKORRA ETA HELBURU ZEHATZAK

Orokorrean proiektu honen helburua *BRCA1* genearen 5382insC mutazioak bular-minbizia garatzeko arriskua murriztea da mutazio hau konpondu eta gene osasuntsu eratuz. Horretarako hainbat helburu zehatzak proposatzen dira:

1. Lerro zelularren hautaketa egingo da proiektua aurrera eraman ahal izateko.
2. Mutazioa basatia den sekuentziagatik ordezkatu CRISPR/Cas9 edizio-sistema erabilia zelula osasuntsu edo basatiak eskuratu ahal izateko. Helburu hau bete ahal izateko azpi helburu batzuk lortzea beharrezkoa da:
 - 2.1. *In silico* RNA gidaren diseinua egitea.
 - 2.2. sgRNA oligoen prestaketa aurrera eramatea.
 - 2.3. Bektore eta DNA emailearen prestaketa egin.
 - 2.4. Plasmidoaren eraketa zuzenaren frogapena egin.
 - 2.5. Lerro zelularra transferitu eta mutazioaren edizioa burutu.
3. Edizioa eman dela frogatu PCR eta sekuentziazioaren bidez sekuentzien azterketa eginda. Modu egokian eman bada editatutako zelulen sekuentzia editatu gabeena baino laburragoa izango da, edizioa insertzio bat konpontzeko egin delako. Helburu hau betetzeko baita azpi helburu batzuk betetzea beharrezkoa da.
 - 3.1. Zelulen isolamendu eta kolonia monoklonalen hazkuntza eman behar da.
 - 3.2. DNA-ren erauzketa, amplifikazioa eta sekuentziazioa egitea.

4. Fenotipikoki edizioaren abantailak frogatu bai zelulen hazkuntzari dagokiola bai eta drogen aurreko sentikortasuna handitzeari. Izan ere, zelula editatuen hazkuntza motelagoa izatea espero da eta kimioterapiarekiko sentikortasun handiagoa izango dutela. Helburu honek ere azpi helburu bi aurrera eramatea beharrezkoa du:

4.1. Zelulen ugaritzearen analisisa egitea.

4.2. Zelulen kimioterapiarekiko sentikortasunaren aldaketaren analisisa aurrera eramatea.

6. METODO ESPERIMENTALA

6.1. Lerro zelularren hautaketa

Lan honen helburua lerro zelular mutatu batetatik CRISPR/Cas9 edizio-sistema erabilita mutazioa desagerrarazteko diseinua eraikitzea izanda, lehenengo egin beharrezkoa erabiliko den lerro zelularren hautaketa da.

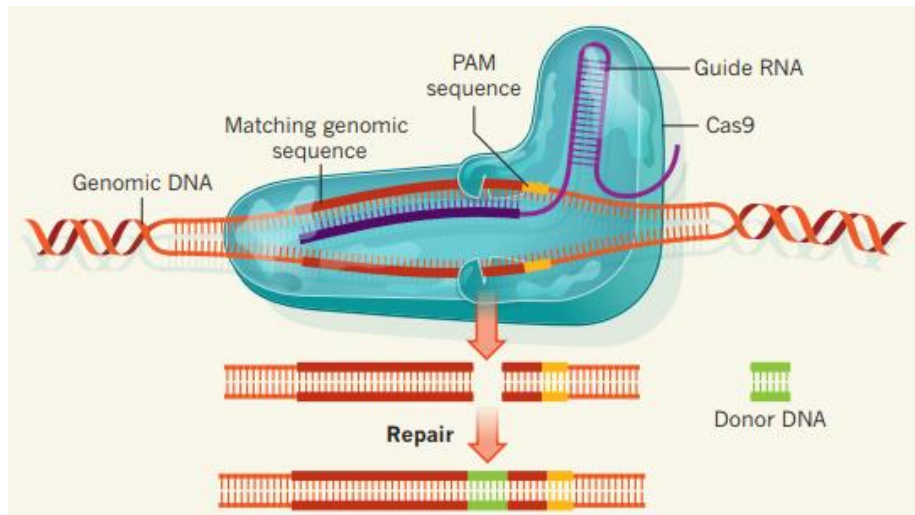
Bular-minbizia ikertzeko lerro zelular ezberdin anitz erabili izan dira: SUM44, SUM52, SUM149, SUM159, SUM185, SUM190, SUM225, SUM229, BrCa-MZ-01, S68 eta MCF-7 besteak beste, gehienak kartzinometatik eratorriak (Charafe-Jauffret *et al.*, 2009). *BRCA1* gene mutatuarekin lan egiteko, aztergaia den genearen mutazioa (5382insC) homozigosian aurkeztuen duen lerro zelularra erabiliko da. Hau kontuan izanda, patentepean dagoen HCC 1937 (ATCC® CRL2336™) hautatuko da. Lerro zelular hau bular minbizidun historia familiarra zuen 23 urteko emakume kaukasiar baten laginetatik eratorria da, *BRCA1* genearekin erlazionatutako tumore heredagarria zuena (Tulchin *et al.*, 2013). Gainera kimioterapiarekiko erresistenteak dira zelula hauek (Margelí *et al.* 2012) eta horretaz baliatuz edizioa eman ostean hau eman denentz froga daiteke kimioterapiarekiko sentikortasun handiagoa erakustea espero baita.

Hautatutako lerro zelularreko zelulak ATCC etxe komertzialari erosiko zaizkio eta beraiek jarritako baldintzetan kultiboa prestatuko da. Lerro zelular honetarako oinarritzko medioa etxe komertzial berdinak hornitzen duena izango da, RPMI-1640 medioa (ATCC 302001). Baina, hazkuntza medio oso izateko honi hezur fetal serum-a (ATCC 302020) gehitu behar da medioan, bukaerako kontzentrazioa % 10-ekoa izango delarik. Eta inkubazioa 37°C-tan egingo da zelulak bere osotasunean mantentzeko.

6.2. Sekuentzia mutatuaren edizioa CRISPR/Cas9 edizio sistema erabilita

Proiektu honetan gene ediziorako II motako *Clustered Regularly Interspersed Short Palindromic Repeat* (CRISPR) sistema erabiliko da. Honetan Cas9 nukleasak eta sgRNA beharrezkoak dira. Hauek bektore, plasmido, baten bidez intereseko zelulara transferitu eta edizioa egitea lortzen da (Ran *et al.*,

2013). sgRNA-ak Cas9 entzima bideratuko du aldatu nahi dugun sekuentziara, hau degradatu eta bertan sekuentzia berria sartzeko, DNA emalea alegia (Ma *et al.*, 2014) (2. Irudia). Horretarako erabilitako zeluletara CRISPR sistema eta sekuentzia basatia, “osasuntsua”, transferitu behar dira, behin Cas9 endonukleasak gene mutatuaren itu sekuentzia moztu duenean berria berreraikitzeko.



2. Irudia: CRISPR mekanismoa laborategian (Charpentier & Doudna, 2013)

6.2.1. RNA gidaren diseinua *in silico*

CRISPR Design tool (<http://tools.genome-engineering.org>) programa (Zhang Ladorategiak diseinatua) erabilia gida sekuentzia lortuko dugu. Horretarako konpondu nahi den sekuentzia kargatu behar da programan. Kasu honetan *BRCA1 5382insC* sekuentzia mutatua *BRCA1 WT*-a gaitik ordezkatu nahi denez RNA gida *BRCA1 5382insC* sekuentziaren homologoa izan behar da honekin hibrida dezan, beraz, sekuentzia hau izango da programan kargatuko duguna (1 Taula). Programak, erabilgarriak izango diren 20 nukleotidoko RNA gida ezberdinak erraztuko ditu. Programak aurkezten dituen RNA gida posibleetatik % 50eko puntuazio-maila baino handiagoa dutenak egokiak izango dira erabiltzeko, hots, gero eta puntuazio handiagoa izan egokiagoak izango dira. Beraz, puntuazio handiena duena hautatuko da.

1 Taula: *BRCA1 5382insC* eta *BRCA1 WT* sekuentziak

<i>BRCA1 5382insC</i>	5'-CACCAAGGTCCAAAGCGAGCAAGAGAATCCCCAGGACAGAA-3'
<i>BRCA1 WT</i>	5'-CACCAAGGTCCAAAGCGAGCAAGAGAATCCCAGGACAGAA-3'

6.2.2. sgRNA oligoen prestaketa:

Oligoak Sigma-Aldrich etxe komertzialetik eskuratuko dira sgRNA sintetizatzeko aurretik diseinatutakoa jarraituz. Sintesarako OriGen etxe komertzialak erraztutako protokoloa jarraituz burutuko da

sgRNA-ko goi eta beheko harizpien bersuspentsioa egin 100 μ M-etako bukaerako kontzentrazioa lortu artea. Eta jarraian sgRNA oligoen suberaketa eta fosforilazorako 2. Taulan agertzen diren osagaien nahasketa egin behar da.

2. Taula: sgRNA oligoen prestaketarako osagaiak

Osagaiak	Kopurua (μ L)
Goiko sgRNA (100 μ M)	2
Beheko sgRNA (100 μ M)	2
Suberaketa baferra, x10	4
dH ₂ O	32

Oligoen suberaketa eta fosforilazorako aipatutako nahastea termozikladorean sartzen da, ziklo bakoitzean baldintzak ezberdinak aldatuz. 4 minutuz 94°C-tan mantenduko da, 5 minutuz 75°C-tan, 15 minutuz 65°C-tan eta bukatzeko 20 minutuz 25°C-tan.

sgRNAren prestaketarekin bukatzeko suberatutako eta fosforilatutako oligoak 1,5 mL-ko tutuetan sartuko dira eta 360 μ L dH₂O gehituko da prestakina diluituz.

6.2.3. Bektore eta DNA emailearen prestaketa:

CRISPR/Cas9 edizio-sistema plasmido bidez transferituko da bai eta ordezkatu nahi den sekuentzia, DNA emailea. Horretarako lehenik eta behin CRISPR/Cas9 edizioa-sistema eramango duen plasmidoa eta DNA emailea prestatu behar dira. Kasu honetan pCas-Guide (OriGen) plasmido bat erabiliko da CRISPR/Cas9 sistema transferitzeko eta DNA emailea oligo sekuentzia moduan transferituko da errekonbinazio homologorako beharrezko elementuekin.

- pCas-Guide-ren prestaketa:

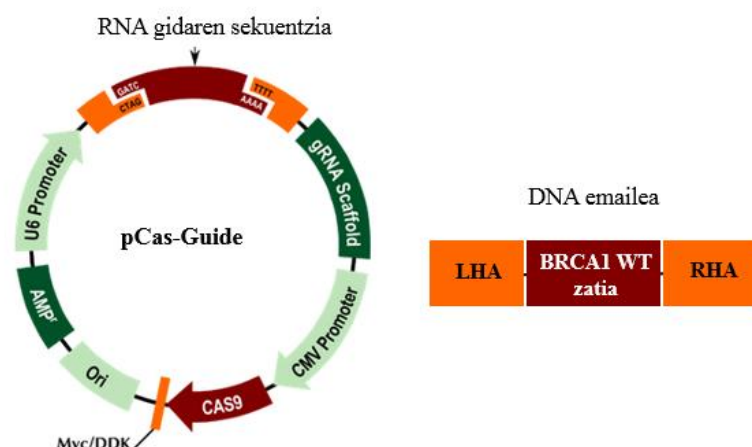
Aurretik sintetizatutako RNA gida plasmidoan ligatuko da. Ligazioa eman aurretik plasmidoa BamH1 eta BsmB1 errestrizio entzimak erabilia digerituko da. Behin digestioa eman dela OriGen etxe komertzialak erraztutako protokoloa jarraituko da 3. Taulan agertzen diren osagaien nahasketa eginez ligazioa aurrera eramateko. Modu honetan edizioa aurrera eramateko beharrezkoa den CRISPR/Cas9 sistema plasmidoan izatea lortuko da (3. Irudia)

3. Taula: RNA gidaren ligaziorako burutzeko osagaiak

Osagaiak	Kopurua (µL)
Ligazio baferra, x10	1
Aurretil liseritutako pCas-Guide bektorea (10 ng / µL)	1
Aurretik prestatutako suberatutako oligoen nahasketa	1
Ligasa (0,5 u / µL)	0,5
dH ₂ O	6,5

- DNA emailearen prestaketa:

Plasmido honetan DNA emailea ligatuko da. Baina ez hori bakarrik, honekin batera errekonbinazio homologorako beharrezkoak diren LHA (left homologous arm) eta RHA (right homologous arm) ere transfektatuko dira, errekonbinazio homologoa bera faboratzeko hain zuzen. Beraz, kasu honetan *BRCA1* gene basatiaren 19. exonetik p220 proteinaren sekuentzia kodetzailearen bukaeraraino, hau da *stop* kodoneraino eta honi jarraituz errekonbinazio homologorako besoak transfektatuko dira (3. Irudia). Hau egin ahal izateko ssDNA *BRCA1* gene basatia duena *Integrated DNA Technologies* (IDT) enpresatik eskuratutakoa izango da.



3. Irudia: Gene ediziorako sekuentziak. pCas-Guide CRISPR/Cas9 sistemaren transfekziorako eta DNA emailea eta errekonbinazio homologorako elementuen transfekziorako.

6.2.4. Plasmido eta DNA emailearen eraketa zuzenaren frogapena

- *pCas-Guide:*

Eraikitako plasmidoa *Escherichia coli* Stb13 anduira (ThermoFisher) transferituko da, honekin plasmidoaren kopia asko lortze izango delarik helburua.

Transformatutako bakterioak anpizilinadun LB+ plakan inkubatuko dira 37°C-tan eta 36 orduz Addgene etxe komertzialaren gomendioak jarraituz. Modu honetan bakarrik plasmidoa bereganatu dutenak hazteko gai izango dira. Hauetatik plasmidoan sartutako oligo pare bakoitzeko sei kolonia hautatuko dira eta kultibo puru bat lortzeko.

Gainera plasmidoare eraketa zuzena izan den egiaztatzeko hauen inokulu bat hartu eta anpizilinadun LB+ medioan haziko dira 37°C-tan gabe batez. Hazkuntza eman denean, kultiboak zentrifugatu egingo da bakterioen *peleta* lortu arte. Jarraian *peleta* eta gainjalkina banandu egingo dira eta Qiagen Miniprer Kit-a (Qiagen) erabilita DNA erauzi eta purifikatu egingo da (Ran *et al.*, 2013).

DNA izanda hau sekuentziazterera bidaliko da eta aurretik hautatutako koloniak 4°C-tan mantenduko dira emaitzak lortu arte.

- *DNA emailea:*

Behin DNA emailearen errekonbinazio homologorako beharrezkoak diren elementuekin ligatuta sekuentziazterera bidaliko da konstruktua egoki eratu dela ziurtatzeko.

6.2.5. Lerro zelularrera transferitu eta mutazioaren edizioa

Behin egiaztatuta plasmidoa eta DNA emailearen kasetea ondo eratu direla eta baliogarria izan daitezkeela proiektua aurrera eramateko, HCC 1937 lerro zelularrera transferituko dira. Horretarako lehenik eta behin zelulak transfekzioarako prestatu behar dira. Kontuan izan behar da tranfekzioaren efizientzia handitzeko ez dela zelula dentsitate handietan lan egin behar, beraz zelulen ereintza kontrolatuak egin behar dira. Kasu honetan putzudun plakak erabiliko dira, putzu bakoitzean $1,3 \times 10^5$ zelula izanik 500 μ L-ko bolumen totalen (Ran *et al.*, 2013). HCC 1937 zelulak RPMI-1640 medioan (ATCC) haziko dira ATCC etxe komertzialaren gomendioak jarraituz. Transfekzioa burutzeko mediora Lipofectamine® 2000 (ThermoFisher) gehituko da transfekzioa faboratzeko, bai plasmidoarena bai eta DNA emailearena.

Behin ediziorako osagaien transferentzia eman dela zelulak 1-3 aste bitartean 37°C-tan inkubatuko dira edizioa burutzeko.

6.3. Edizioaren frogapen genotipikoa

6.3.1. Zelulen isolamendu eta kolonia monoklonalen hazkuntza

Zelulek transferentzia jaso ostean, CRISPR/Cas9 sistemak bere funtzioa burutu duen edo ez ikusteko zelulen isolamendua egingo da hauetatik kolonia monoklonalak lortu eta hauen DNAaren azterketa eginda edizioa burutu den edo ez frogatzeko. Horretarako, mikroplaketan diluzio seriatuak egingo dira. Mikroplaka hauetan putzuak daude eta putzu batetik bestera diluzio hamartarrak eginez zelula kopurua murriztuz joango da. Putzu bakoitzean 100 μ l medio egongo dira eta batetik bestera aurretik 10 μ l gehituko dira putzu batean zelula bakarra lortu arte. Zelulan kontaketarako TC20 Automated Cell Counter-a (Bio-Rad) erabiliko da.

Putzu batean zelula bakarra izatea lortzen denean 4-6 eginez hazten utziko dira kolonia monoklonalak lortu arte.

6.3.2. DNA-ren erauzketa, amplifikazioa eta sekuentziakzioa

Kolonien hazkuntza ematean, bakoitzetik lagin bat hartu eta DNA genomikoa isolatuko da. Horretarako zelulen lisia eragin behar da eta DNeasy Blood and Tissue Kit-a (Qiagen, Hilden, Germany) erabilita DNA eskuratuko da.

Behin DNA eskuratu dela honen amplifikazioa egin behar da, aztertzen ari garen sekuentziaren aldaketa eman den ala ez detektatzeko. Horretarako lehenengo PCR-rako hasleak diseinatu behar dira. Diseinu hau *in silico* egingo da NCBI-NIH-ren *Primer designing tool* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) programa erabilita. Honetan amplifikatu nahi den sekuentzia kargatuko da, kasu honetan *BRCA1* genearen 19. exonaren zati bat, bertan baitago desagerrarazi nahi den mutazioa. Programak hasle posible ezberdinak planteatuko ditu. Egokiena hautatu eta PCR-a burutuko da *BRCA1* genearen 19. exonaren hautatutako zatiaren kopia anitz eskuratuz.

Jakinda erabilitako lerro zelularrean mutazio homozigosian dagoela kolonia monoklonalak bi aleloentzako editatu diren a ez frogatu behar da. Horretarako PCR-aren bidez amplifikatutako sekuentzien laburra migrazioa egingo da poliakrilamidazko gel baten. Migrazioa egiterakoan hiru aukera egongo dira: alde batetik bi bandak tamaina handiena izatea, hau da insertzioa mantentzea, bestetik banda bakoitza tamaina batekoa izatea eta hirugarren aukera bi bandak tamaina berdinekoak izatea, baina kasu honetan tamaina txikikoak, insertzio gabekoak. Lehenengo aukera ematen bada bi aleloak insertzioa dutela adierazten da eta horrek adierazten du ez dela espero den gene edizioa eman. Bigarrenean aukera ematen bada aldiz, alelo bakarrean edizioa eman dela esan daiteke. Eta hirugarren aukera betetzen bada, bi bandak tamaina berdinekoak badira eta biak tamaina txikiena erakusten badute, zelularen bi aleloetan edizioa eman dela esan nahi du eta ondorioz hauekin lanean jarraituko da.

Aurrekoaz gain, lortu nahi den edizioa eman dela ziurtatzeko berriz ere aurretik azaldu bezala DNA-ren erauzketa berri bat egingo da, baina oraingoan bakarrik kolonia monoklonal editatu homozigotoena, eta PCR bidez anplifikatuko da. Erauzitako DNA-tik 19. exona osoa anplifikatuko da eta horretarako ere aurretik hasleen diseinua aurrera eraman behar da. Jarraian PCR-an lortutako anplikoiak sekuentziazera bidaliko dira. Espero da sekuentzian tamaina 84 nukleotidokoa izatea, izan ere exona genearen 160849 nukleotidotik 160932 nukleotidora doa. Gainera kontuan izan behar da aurreko pausoen kolonia monoklonal homozigotoak aukeratu direla eta hortaz, sekuentziazioa egiterakoan sekuentziazio garbi, zalantza gabekoa, eta insertsio gabea atera beharko litzatekela.

6.4. Edizioaren fenotipoaren azterketa

Behin bi aleoetan edizioa jasan duten kolonia monoklonalak hautatuta edizioak fenotipoan sortu beharreko abantailak frogatuko dira, ugaritzearen moteltzea eta kimioterapiarekiko sentikortasuna.

6.4.1. Zelulen ugaritzearen analisisa

Mutazioaren edizioak zelulen ugaritze-abiadura murriztuko duela espero da. Hortaz, hau frogatzeko jatorrizko HCC 1937 zelulen eta editatuen arteko hazkuntza abiaduren konparaketa egingo da. Honetarako, bi ereintza egingo dira simultaneoki, bietan zelula kopuru bera jarriko da hasiera batean, baina, batean jatorrizko HCC 1937 zelulak eta bestean editatutakoak. Zelulak 37°C-tan inkubatuko dira eta denbora tarte ezberdinetan zelulen zenbaketa egingo da. Espero da edizioa jaso duenak gutxiago ugaritzea, hau da, edizioa jasan duten zelula edizioa jaso ez dutenak baino txikiagoa izatea espero da. Kontuan izan behar da kultiboan zelula hilak eta biziak egongo direla eta beraz hauen arteko bereizketa egin ahal izateko Trypan blue (Sigma) koloratzailea erabiliko da. Kolorante hau bakarrik mintz zelularra minduta duten zeluletan barneratuko da zelula hauei kolore urdina emanez. Horrela zelula hilak urdin ikusiko dira mikroskopio pean eta biziak zuri. Beraz, espero da editatutako zelulek eratutako kolonietan zelula bizi gutxiago egotea, hau da zelula zuri gutxiago, ugaritzea motelagoa baita.

Ugaritzearen azterketa egiteko baita mitokondrioaren aktibitatearen analisisa eginda beha daiteke. MTT metodoa baliatuko da honetarako, MTT-n oinarritutako *In Vitro* Toxicology Assay Kit-a (Sigma-Aldrich) erabiliko da etxe komertzialak berak adierazten duen moduan. MTT uretan disolbagarria den tetrazolium gatz hori bat da. Hau erreduzitzean formazanen familiako konposatu batean bilakatzen da kolore morea hartuz eta uretan disolbaezin bilakatuz. Honen kuantifikaziorako disolbatzaile organiko batean disolbatzen da, isopropanolean, eta honen kolore intentsitatea espektrofotometroaren bidez neurtzen da 570 nm-ko uhin luzeran. Aipatutako MTT-aren erredukzio horretan aktibitate metabolikoaren adierazle diren deshidrogenasek parte hartzen dute. Hortaz, zenbat eta deshidrogenasa aktibitate gehiago egon orduan eta kolore more intentsuagoa egongo da. Beraz, espero da zelula editatuetan kolore more intentsitate txikiagoa egotea zelula kopurua editatu gabeetan baino baxuagoa delako.

6.4.2. Zelulen kimioterapiarekiko sentikortasunaren aldaketaren analisia: Apoptosi analisia

HCC 1937 zelula mutatuak (HCC) kimioterapiarekiko erresistenteak dira eta espero da mutazioa editatu ostean (HCC-editatuak) zelulak drogekiko sentikortasuna handitzea 2003an Tassone eta lankideek ikusitakoaren arabera. Hauek behatu zuten HCC 1937 zelula eraldatuek HCC 1937 parentalak baino Doxorubizineretikiko ($P < 0.05$) eta Paklitaxelarekiko ($P < 0.001$) sentikortasun handiagoa erakustez zutela. Beraz, proiektu honetan hau betetzen den frogatzeko drogen aurrean bai zelula mutatuak zein editatuak duen erantzuna aztertuko da LDH bidezko apoptosi maila neurtuta.

Ameriketako minbizia elkartearen (*American Cancer Society*) arabera Adriamizina, Taxola, Taxoterea, Fluorouraziloa, Ziklofosfamida eta Paraplatina bezalako farmakoen erabilera da ohikoena bular minbiziaren tratamendu kimiterapeutikoak aurrera eramateko, normalean bi edo hiruren arteko konbinaketa ematen delarik. Hau horrela izanda hauetariko hiru hautatuko dira zelula editatuak hauekiko sentikortasun altuagoa erakusten dutenentz determinatzeko. Eta kontuan izanda sarritan farmakoen konbinaketak egiten direla hauen arteko nahasketen aurreko erantzuna ere aztertuko da.

Adriamizina (Doxorubizina) farmakoaren 50-60 mg/m²-ko dosia gomendatzen da bilar-minbizi kasuetarako Gador S.A. erakundearen arabera; Ziklofosfamida eta Fluorourazilo farmakoena aldiz 500-600 mg/m²-koa. Gainera, aipatu bezala sarritan farmakoak ez dira banaka erabiltzen beraz hauek binaka aplikatzea ere proposatzen da. Beraz, dosi hauek erabiliko dira zelula kultiboetan, bai banaka zen binaka. Farmako bakoitzaren edo bikotearen azterketak egiteko bi kultibo prestatuko dira bakoitzeko; batean HCC zelulen ereintza egingo da eta bestean HCC-editatuena. Behin farmakoak gehituta zelulak 48 orduz inkubatzen mantenduko dira farmakoek eragina izan dezaten.

48 orduak pasata apoptosia jasa dauten zelulen estimazioa egingo da LDH metodoa erabilita. Honetarako innoprot etxe komertzialak eskaintzen duen zitotoxizitaterako kita erabiliko da. Honetaz baliatuz zelula apoptotikoek kultibo mediora askatutako laktato deshidrogenasa (LDH) detektatuko da. Modu horretan, zenbat eta LDH aktibitate handiagoa egon medioan orduan eta zelula gehiago apoptosian sartu direla adieraziko da, eta horrek suposatzen du zelulen farmakoarekiko sentikortasuna handiagoa dela. Azken hau espero delarik zelula editatuetan.

Kontuan izan behar da LDH aktibitatea kit-ean dauden erreaktiboak direla eta sortzen den kolore gorri intentsitatearen arabera neurtzen dala, hau da kit-ak metodo kolorimetricoa eskaintzen du. LDH entzimak kit-ean dagoen NAD⁺ NADH-ra erreduzitzen du L-laktatoaren presentzian. Aldi berean sortutako NADH-a neurtu ahal izateko erreakzio akoplatu bat ematen da, zeinetan INT tetrazolium gatza erreduzitzen den produktuak kolore gorria hartzen duelarik. Behin erreakzio hauek eman direla innoprot-ek adierazi bezala kolore intentsitatea espektrofotometro bidez neurtuko da 490 nm-ko uhin luzeran.

7. ONDORIOAK, ESPEROTAKO EMAITZAK ETA PROIEKTUAREN ONURAK

Proiektuak arrakasta izanez gero, hau da, HCC 1937 (5382insC) lerro zelular mutatuan gene edizioa egitea lortzekotan eta honek ekarpen fenotipiko onuragarriak izatekotan, aurrerapauso handi bat emango litzateke bular minbiziaren ikerkuntzari dagokiola. Izan ere, aurretik aipatu bezala, *BRCA1* genean gertatzen diren mutazioek, alegia 187delAG mutazioak eta lan honetan aztertutako mutazioak (5382insC), eragiten dute bular minbiziaren herentzia familiarrarekin lotutako kasuen gehiengoa (% 65-46 populazioaren arabera) (Petrucci *et al.*, 2010). Konkrituki, Ashkenazi populazioan egindako azterketa batean, 187delAG duten indibiduoek bular-minbizia izateko % 64ko arriskua daukate eta 5382insC dutenek % 67 (Antoniu *et al.*, 2005).

Beraz, historia familiarrean *BRCA1* genean mutazioak identifikatuta badaude posiblea da ondorengoetara transmititzea mutazioa. Horrenbestez, edizio genetiko hau lerro germinaleko zeluletan eginez gero, ondorengoetan mutazioa honek eragindako arrisku-maila murriztea lortuko litzateke. Aurrekoa egia bada ere, giza-zelula germinalen manipulazioak arazo etiko asko sortzen ditu eta gaur egun zelula germinaletan albo-arazo larriak sor ditzaketen praktikak legez kanpo daude. Baina, denborarekin, metodoaren eraginkortasuna eta fidagarritasuna handitzen direnean, horrelako arazo konponketarako CRISPR/Cas9 sistemaren erabilera hedatuko denaren ikusmira dago.

Oinarrien-froga bezala planteatzen dugun proiektuan emaitza positiboak lortuz gero, hurrengo pausua izango litzateke ikustea metodo honek organismo bizietan izango lukeen erantzuna, zehazki laborategiko saguetan (*Mus musculus*). Espainiako laborategiko animalien zientzietarako erakundeak (SECAL) adierazi bezala, *BRCA1* generako mutazio homozigotoa duten saguak *in utero* hiltzen dira. Beraz, saguetan planteatutako proiektua testatzeko *nude* saguak erabiltzea gomendatzen da, sagu-eredu ortologoak eratuz. Sagu hauek immunoerreprimituak daude eta horren eraginez hauetan tumore bat sartuz gero ez dute errefusatuko. Honetaz baliatuz, lortu beharko litzateke sagu hauetan 5382insC mutazioa duen tumorea ezarri eta ondoren, proiektuan garatutako CRISPR/Cas9 sistema injektatu eta tumoreren garapena etetea. Behin saguetan emaitza positiboak lortu direla, bukaerako helburua gizakiekin probatzea izango litzateke, metodoaren eraginkortasuna eta fidagarritasuna terapiaren aldekoak direnean. Gizakietan zelula germinalekin lan egitea debekatuta dagoenez, egun ezin da mutazioaren eramailea den familia bateko ondorengoetan mutazioaren desagerpena planteatu, baina metodo hau txerto bezala planteatu daiteke. Hau da, txerto baten bitartez minbiziaren garapena oztopatzea, beste minbizia batzuekin egiten den antzera, utero-lepoko minbiziarekin adibidez. Horrenbestez, planteatu beharrekoa hurrengo hau litzateke: familian mutazioa detektatua duten gazteei nerabezaroan txerto moduan DNA ediziorako sistema hau txertatzea minbizia garatu aurretik mutazioaren konponketa eman dadin. Egia da baina, bularreko zelulen berriztapena ematen dela eta hori dela eta dosi bat baino gehiagoren beharra egongo litzateke bular minbiziaren garapenaren prebentziorako, biriketako minbiziarekin 2016-an behatu zuten bezala (Cyranoski, 2016).

Hala ere, zaila da aldaketa eraginkor eta fidagarriak ematea, beraz, lerro zelular honekin prebentziorako tratamendu ezberdin batzuk garatzeko ere lan egin daiteke. Kontuan izanda HCC 1937 lerro zelularrak 5382insC mutazioa egonkortuta duela, *BRCA1* geneak kodetutako proteina tumore supresorearen, p220, funtzioa beteko duen farmakoaren bilaketa ere egin daiteke. Kasu honetan ere, farmakoen eragina aztertuko litzateke lehenengo maila zelularrean, ondoren saguetan eta behin emaitza onak lortuta, gizakietan tratamendu esperimental bezala.

8. BIBLIOGRAFIA

American Cancer Society. (Azken aldaketak: 2018). Breast Cancer. Treatment and side effects. Eskuragarri: <https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer.html> (Azken kontsulta: 2018/06/15)

American Type Culture Collection (ATCC®). (Azken aldaketak: 2016). HCC1937 (ATCC® CRL-2336™). LGC Standards-ATCC. Eskuragarri: https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CRL-2336.aspx?geo_country=es#culturemethod (Azken kontsulta: 2018/06/09)

Antoniou, A. C., Pharoah, P. D. P., Narod, S., Risch, H. A., Eyfjord, J. E., Hopper, J. L., ... & Radice, P. (2005). Breast and ovarian cancer risks to carriers of the BRCA1 5382insC and 185delAG and BRCA2 6174delT mutations: a combined analysis of 22 population based studies. *Journal of medical genetics*, 42(7), 602-603. doi: 10.1136/jmg.2004.024133

Apostolou, P., & Fostira, F. (2013). Hereditary breast cancer: the era of new susceptibility genes. *BioMed research international*, 2013. doi: 10.1155/2013/747318

Asociación Española Contra el Cáncer (AECC). (Azken aldaketak 2018). Los datos del cáncer. Eskuragarri: <http://observatorio.aecc.es/> (Azken kontsulta: 2018/02/25)

Charafe-Jauffret, E., Ginestier, C., Iovino, F., Wicinski, J., Cervera, N., Finetti, P., ... & Brown, M. (2009). Breast cancer cell lines contain functional cancer stem cells with metastatic capacity and a distinct molecular signature. *Cancer research*, 69(4), 1302-1313. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-2741

Charpentier, E., & Doudna, J. A. (2013). Biotechnology: Rewriting a genome. *Nature*, 495(7439), 50. doi: 10.1038/495050a

Chen, S., & Parmigiani, G. (2007). Meta-analysis of BRCA1 and BRCA2 penetrance. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 25(11), 1329. doi: 10.1200/JCO.2006.09.1066

Coignet, M. V., Zirpoli, G. R., Roberts, M. R., Khoury, T., Bandera, E. V., Zhu, Q., & Yao, S. (2017). Genetic variations, reproductive aging, and breast cancer risk in African American and European American women: The Women's Circle of Health Study. *PLoS one*, *12*(10), e0187205. doi: 10.1371/journal.pone.0187205

Cope, D. G. (2013). Breast cancer: reviewing the past to give direction for the future. *Oncology nursing forum*, *40*, 425-428. doi: 10.1188/13.ONF.425-428

Costa, M., & Saldanha, P. (2017). Risk reduction strategies in breast cancer prevention. *European journal of breast health*, *13*(3), 103. doi: 10.5152/ejbh.2017.3583

Cox, D. B. T., Platt, R. J., & Zhang, F. (2015). Therapeutic genome editing: prospects and challenges. *Nature medicine*, *21*(2), 121. doi:10.1038/nm.3793

Cyranoski, D. (2016). CRISPR gene-editing tested in a person for the first time. *Nature news*, *539*(7630), 479.

Forat-Yazdi, M., Neamatzadeh, H., Sheikha, M. H., Zare-Shehneh, M., & Fattahi, M. (2015). BRCA1 and BRCA2 common mutations in Iranian breast cancer patients, a meta-analysis. *Asian Pac J Cancer Prev*, *16*(3), 1219-24. doi: 10.7314/APJCP.2015.16.3.1219

Gador S.A. Tratamientos del cáncer de mama. Eskuragarri: <http://www.gador.com.ar/comunidad/tratamientos-del-cancer-de-mama/>. (Azken kontsulta: 2018/06/16)

Hatchi, E., Skourti-Stathaki, K., Venz, S., Pinello, L., Yen, A., Kamieniarz-Gdula, K., ... & Kellis, M. (2015). BRCA1 recruitment to transcriptional pause sites is required for R-loop-driven DNA damage repair. *Molecular cell*, *57*(4), 636-647. doi: 10.1016/j.molcel.2015.01.011.

Innoprot 2008 - Cell Based Assays for Drug Discovery Screening. Kit de Citotoxicidad por LDH. Eskuragarri: http://www.innoprot.com/es_productos.asp?idp=106&id=13. (Azken kontsulta: 2018/06/16)

Instituto Nacional de Estadística. (Azken aldaketak: 2018) Cifras de población y Censos demográficos. Eskuragarri: http://www.ine.es/dyns/INEbase/es/categoria.htm?c=Estadistica_P&cid=1254735572981 (Azken kontsulta: 2018/02/25)

Karami, F., & Mehdipour, P. (2013). A comprehensive focus on global spectrum of BRCA1 and BRCA2 mutations in breast cancer. *BioMed research international*, *2013*.

Linger, R. J., & Kruk, P. A. (2010). BRCA1 16 years later: risk-associated BRCA1 mutations and their functional implications. *The FEBS journal*, 277(15), 3086-3096.

Ma, Y., Zhang, L., & Huang, X. (2014). Genome modification by CRISPR/Cas9. *The FEBS journal*, 281(23), 5186-5193. doi: 0.1111/febs.13110

Mao, X. Y., Dai, J. X., Zhou, H. H., Liu, Z. Q., & Jin, W. L. (2016). Brain tumor modeling using the CRISPR/Cas9 system: state of the art and view to the future. *Oncotarget*, 7(22), 33461. doi: 10.18632/oncotarget.8075.

Margelí Vila, M., Rosell Costa, R., & Barnadas Molins, A. (2012). *Factores pronósticos y predictivos de respuesta a la quimioterapia neoadyuvante con antraciclinas en una serie de cáncer de mama.* (Doktoretza tesia). Bartzelonako unibertsitate autonomoa. Medikuntzako departamentua.

Matano, M., Date, S., Shimokawa, M., Takano, A., Fujii, M., Ohta, Y., ... & Sato, T. (2015). Modeling colorectal cancer using CRISPR-Cas9-mediated engineering of human intestinal organoids. *Nature medicine*, 21(3), 256. doi: 10.1038/nm.3802

McDaniel, J. M., Varley, K. E., Gertz, J., Savic, D. S., Roberts, B. S., Bailey, S. K., ... & Newberry, K. M. (2017). Genomic regulation of invasion by STAT3 in triple negative breast cancer. *Oncotarget*, 8(5), 8226. doi: 10.18632/oncotarget.14153

National Cancer Institute. NCI Dictionary of Cancer Terms. Eskuragarri: <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/cancer> (Azken kontsulta: 2018/02/25)

Neamatzadeh, H., Shiryazdi, S. M., & Kalantar, S. M. (2015). BRCA1 and BRCA2 mutations in Iranian breast cancer patients: A systematic review. *Journal of research in medical sciences: the official journal of Isfahan University of Medical Sciences*, 20(3), 284.

Oluwagbemiga, L. A., Oluwole, A., & Kayode, A. A. (2012). Seventeen years after BRCA1: what is the BRCA mutation status of the breast cancer patients in Africa?—a systematic review. *SpringerPlus*, 1(1), 83. doi: 10.1186/2193-1801-1-83

OriGene Technologies, Inc. All Rights Reserved. (Azken aldaketak 2018) Custom gRNA Cloning Service. Eskuragarri: <https://www.origene.com/products/gene-expression/crispr-cas9/grna-cloning-service>. (Azken kontsulta: 2018/06/15)

Özkan, M., Yıldırım, N., Dişçi, R., İlgün, A. S., Sarsenov, D., Alço, G., ... & Ordu, Ç. (2017). Roles of Biopsychosocial Factors in the Development of Breast Cancer. *European journal of breast health*, 13(4), 206. doi: 10.5152/ejbh.2017.3519

Park, M. Y., Jung, M. H., Eo, E. Y., Kim, S., Lee, S. H., Lee, Y. J., ... & Yoon, H. I. (2017). Generation of lung cancer cell lines harboring EGFR T790M mutation by CRISPR/Cas9-mediated genome editing. *Oncotarget*, 8(22), 36331. doi: 10.18632/oncotarget.16752

Paul, A., & Paul, S. (2014). The breast cancer susceptibility genes (BRCA) in breast and ovarian cancers. *Frontiers in bioscience (Landmark edition)*, 19, 605.

Petrucelli, N., Daly, M. B., & Feldman, G. L. (2010). Hereditary breast and ovarian cancer due to mutations in BRCA1 and BRCA2. *Genetics in Medicine*, 12(5), 245. doi:10.1097/GIM.0b013e3181d38f2f

Ran, F. A., Hsu, P. D., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D. A., & Zhang, F. (2013). Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nature protocols*, 8(11), 2281. doi: 10.1038/nprot.2013.143

Rebbeck, T. R., Mitra, N., Wan, F., Sinilnikova, O. M., Healey, S., McGuffog, L., ... & Nathanson, K. L. (2015). Association of type and location of BRCA1 and BRCA2 mutations with risk of breast and ovarian cancer. *Jama*, 313(13), 1347-1361. doi: 10.1001/jama.2014.5985.

Satagopan, J. M., Boyd, J., Kauff, N. D., Robson, M., Scheuer, L., Narod, S., & Offit, K. (2002). Ovarian cancer risk in Ashkenazi Jewish carriers of BRCA1 and BRCA2 mutations. *Clinical Cancer Research*, 8(12), 3776-3781.

Schauwecker, S. M., Kim, J. J., Licht, J. D., & Clevenger, C. V. (2017). Histone H1 and chromosomal protein HMG2 regulate prolactin-induced STAT5 transcription factor recruitment and function in breast cancer cells. *Journal of Biological Chemistry*, 292(6), 2237-2254. doi: 10.1074/jbc.M116.764233

Shahi, P., Wang, C. Y., Lawson, D. A., Slorach, E. M., Lu, A., Yu, Y., ... & Werb, Z. (2017). ZNF503/Zpo2 drives aggressive breast cancer progression by down-regulation of GATA3 expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(12), 3169-3174. doi: 10.1073/pnas.1701690114

Sharma, B., Kaur, R. P., Raut, S., & Munshi, A. (2018). BRCA1 mutation spectrum, functions and therapeutic strategies: The story so far. *Current Problems in Cancer*. doi: 10.1016/j.currprobcancer.2018.01.001

Sigma-Aldrich. (Azken aldaketak: 2018). Cell Viability and Proliferation Assays. Eskuragarri: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biofiles/cell-viability-and-proliferation.html>.

(Azken kontsulta: 2018/06/16)

Silver, D. P., & Livingston, D. M. (2012). Mechanisms of BRCA1 tumor suppression. *Cancer discovery*, 2(8), 679-684. doi: 10.1158/2159-8290.CD-12-0221

Sociedad española para las ciencias del animal de laboratorio. Los roedores de laboratorio como modelos de enfermedades humanas. Eskuragarri: <https://secal.es/wp-content/uploads/2014/10/09-GENETICA-Pba-2.pdf.pdf> . (Azken kontsulta: 2018/06/16)

Tai, Y. C., Domchek, S., Parmigiani, G., & Chen, S. (2007). Breast cancer risk among male BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *Journal of the National Cancer Institute*, 99(23), 1811-1814. doi: 10.1093/jnci/djm203

Tassone, P., Tagliaferri, P., Perricelli, A., Blotta, S., Quaresima, B., Martelli, M. L., ... & Venuta, S. (2003). BRCA1 expression modulates chemosensitivity of BRCA1-defective HCC1937 human breast cancer cells. *British journal of cancer*, 88(8), 1285. doi: 10.1038/sj.bjc.6600859

Togashi, Y., Mizuuchi, H., Tomida, S., Terashima, M., Hayashi, H., Nishio, K., & Mitsudomi, T. (2015). MET gene exon 14 deletion created using the CRISPR/Cas9 system enhances cellular growth and sensitivity to a MET inhibitor. *Lung Cancer*, 90(3), 590-597. doi: 10.1016/j.lungcan.2015.10.020

Tulchin, N., Ornstein, L., Dikman, S., Strauchen, J., Jaffer, S., Nagi, C., ... & Bodian, C. (2013). Localization of BRCA1 protein in breast cancer tissue and cell lines with mutations. *Cancer cell international*, 13(1), 70. doi: 10.1186/1475-2867-13-70

Wanzel, M., Vishedyk, J. B., Gittler, M. P., Gremke, N., Seiz, J. R., Hefter, M., ... & Schneikert, J. (2016). CRISPR-Cas9-based target validation for p53-reactivating model compounds. *Nature chemical biology*, 12(1), 22. doi: 10.1038/nchembio.1965

Yeo, S. K., French, R., Spada, F., & Clarkson, R. (2017). Opposing roles of Nfkb2 gene products p100 and p52 in the regulation of breast cancer stem cells. *Breast cancer research and treatment*, 162(3), 465-477. doi: 10.1007/s10549-017-4149-0

Zhang, L., & Han, J. (2017). Branched-chain amino acid transaminase 1 (BCAT1) promotes the growth of breast cancer cells through improving mTOR-mediated mitochondrial biogenesis and function. *Biochemical and biophysical research communications*, 486(2), 224-231. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.02.10