

Antzinako ADNa, ikerketa-eremu berria

Garazi Andonegi Beristain

Elhuyar

Urtarrilaren 24an eta 25ean Madrilen bildu dira antzinako ADNa aztertzen diharduten hainbat arlotako aditu-taldeak Antzinako ADNaren Espainiako I. Biltzarrean.

BI EGUNEKO TOPAGUNE HORRETAN, talde bakoitzaren aurkikuntzen berri eman eta antzinako ADNaren ikerketaren etorkizuna aztertu zuten. Partaide horien artean zen EHUko Leioako campuseko irakasle eta ikertzaile Conchi de la Rúa eta berarekin solasaldia izateko aukera izan dugu. Berak azaldu digu mundu paregabe honetan zer ikerketa egin diren eta beraiek zer eskarmentu duten.

Zer da antzinako ADNa?

Organismo baten material genetiko gehiena zelularen nukleoan gordetzen da kromosoma gisara. Kromosomak 3.000 milioi nukleotidoz osatuak daude eta horiek 50.000-100.000 gene kodifikatzen dituzte. "ADN-katearen zatirik handiena, ordea, ez da geneen kodifi-

katzaillea eta izaera neutro horrek ikerketa genetikorako baliagarri egiten du ADNa", azaldu digu Conchik.

Antzinako ADNa bizirik dauden giza-kien ADNarekin alderatuz gero, desberdintasun batzuk nabariak dira. Lehenik eta behin erauzketetan lortzen den antzinako ADN-kopurua oso txikia da bizidun batengandik lor daitekeenarekin alderatuz, % 0,1 eta 1 artekoa. Eta, bigarrenik, lortzen den ADN-katea zatikatua egoten da 100 base-pareko kateetan; aldiz, bizidunetan milaka base-pareko kateak lor daitezke.

Alde horiek laginetan gertatzen diren degradazio-prozesuen ondorio dira. "Organismoa hil ondoren gertatzen diren oxidazio- eta hidrolisi-efektuek

ADN-katea haustea eragiten dute, eta garrantzi handikoa da laginen kalitate-rako organismoa inguru lehor eta oxigeno-gabe batean kontserbatu izana" azaldu digu. Arrazoi horrengatik, 100.000 urtetan jartzen dute zientzialariek antzinako ADNaren adin-muga.

ADN mitokondriala

Berreskuratutako antzinako ADN-molekulen kopuru urria dela eta, ikertzaile gehienak ADN mitokondrialarekin lan egitera zuzendu dira antzinako ADNaren kasuan. Zelula bakoitzean ADN nuklearra bakarra den bezala, ADN mitokondrial ugari izaten da. Ugaritasun horrek biziraupena eta ADNa berreskuratzeako aukerak handiagotzen ditu.



Mitokondrioaren kasuan, ADN-katearen luzera 16.500 base-pare nitrogenukoa da, giza genomaren % 0,0005 alegia. Gizakien eta hainbat ornodunen mitokondrioetako ADN-a sekuentziatua dago eta sekuentzia horretan *kontrol-gunea* deituriko eremu bat aurkitzen da. 1.100 base-pareko eremu hori neutroa da, horrela mutazioak denboraren eraginpean soilik azaltzen dira eta ez aukeraketa naturalaren bidez. Gainera, kontrol-guneak ADN mitokondrialaren mutazioen % 90 jasaten du.

Berezitasun horietaz gain, bada beste bat ere: ADN mitokondrial-a amagandik jasotzen da soilik. "ADN mitokondrial-a espermatozoideen isatsean egoten da, eta obulua ernaltzean isatsa kanpoan gelditzen da -dio Conchik-, horrela, gizonezkoen ADN mitokondrial-a kanpoan geratzen da".

Horrek azterketa-eremua erdira murriztea dakar, eta jito genetikoaren markari errazago jarraitzea.

Hastapenak

Antzinako ADNaren lehenengo ikerketa duela 150 urte desagertu zen animalia batekin egin zuten 1984an. *Equus quagga* deituriko ekido baten ehun muskular lehortutik lortu zen lehen aldiz antzinako ADN-sekuentzia bat. Sekuentzia horretatik, *quagga*-ren eta gaur egungo gertueneko ahaideen, zebraren, arteko erlazio ebolutiboa frogatu zuten.

Urtebete geroago, 1985ean, beste ikertzaile batzuek momien azaleko zeluletako ADN-a berreskuratu zuten. 110 momiatatik hobekien kontserbaturik

Antzinako ADNaren Espainiako I. Biltzarra

Miraflores de la Sierra herrian dagoen Madrileko Unibertsitate Autonomoko Beiratearen Egoitzan ospatu berri da Antzinako ADNaren Espainiako I. Biltzarra. Gonbidatuen artean zeuden biologia ebolutiboa, paleobiologia, antropologia, genetika molekularra, auzitegi-biologia eta iktologia gaiak lantzen dituzten 15 ikertzaile-zentrotako adituak. Ikertzaile-talde horiek elkar ezagutu eta beraien zientziaren helburu komunetan sakontzeko asmoa azaldu zuten. Helburu horien artean, antzinako ADNaren inguruko lan-talde bat osatzea aztertu zuten. Talde hori oinarriko prozedura ezartzeaz arduratuko litzateke zientzia honetako ikerketen kalitatea bermatzeko. Beste helburuetariko bat laborategien arteko erlazioak indartzea zen talde ikertzaileen arteko elkarlana bultzatuz. Azkenik, zientzia-arlo honen aplikazio potentzialen berri emateko asmoa aipatu zuten, jendeak kontutan izan ditzan beste zenbait arlotan antzinako ADNaren ikerketak izan ditzakeen aplikazioak.

zeuden 23 aukeratu eta horietako bitatik soilik lortu zuten ADN-a eskuratzea. Pauso hori gizakien antzinako ADNaren azterketaren hastapena izan zen.



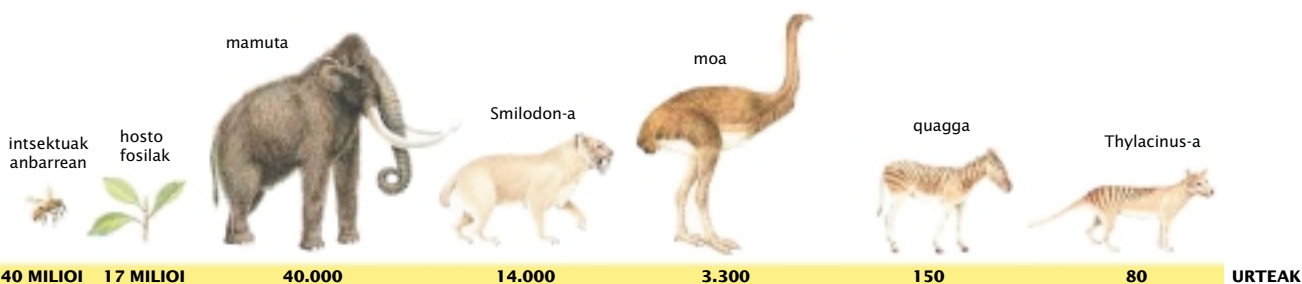
Intsektua anbarrean.

"ADN-katearen zatirik handiena neutroa da eta horrek ikerketa genetikorako baliagarri egiten du ADN-a"

rena (120 urte), *Smilodon* edo tigre 'sable-horzdunarena' (14.000 urte), mamut iletsuarena (10.000-50.000 urte) eta moarena (3.300 urte).

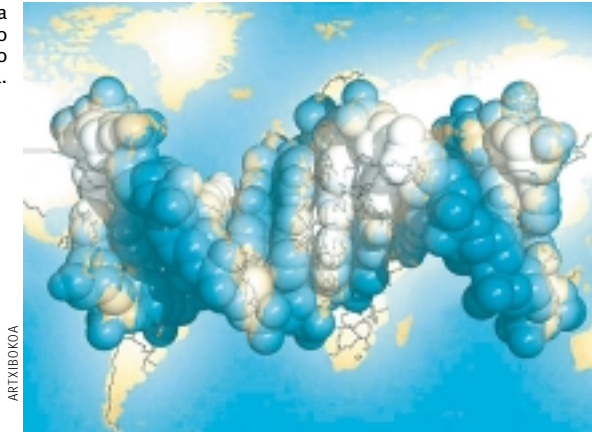
Horretaz gain, Ma deituriko magnolia-hosto bat ere aztertu zuten (17 milioi urte) eta anbarrean gordetako hainbat intsektu ere bai, baina horien guztien azterketak ez dira gaur egun fidagarri-tzat jotzen. "Ez da lortu laborategi horietan lortu ziren emaitzak errepikatzea, ez laborategi berean ez bestetan ere, eta horrek emaitzak baliogabetzen ditu" dio Conchik. "Hala ere, frogaturik gelditu zen antzinako ADN-a berreskura zitekeela". ➔

ikerketekin jarraituz, 90eko hamarkadaren erdialderako, jada desagerturik zeuden hainbat ornodunen ADN-zatiak sekuentziatzea lortu zuten, hala nola *Thylacinus* edo otso martsupiala-



Antzinako ADNaren ikerketan aurkikuntza historikoak.

Gizaldien historia biologikoa ikertzeko erabili da antzinako ADN-a.



ARTXIBOKOA

1986. urtean beste pauso garrantzitsu bat eman zen, PCR azterketa-metodo berria kaleratzean. Teknika horrek iraultza eragin zuen ADNaren ikerketan eta mitokondrio-geneen aurkikuntza ahalbidetu zuen.

PCR metodoa

Polimerasaren kate-erreakzioa edo PCR metodoa ADN-zati txiki batetik milioika kopia sintetizatzean datza. Prozesu zikliko horretan ADN-katearen zati bat esponenzialki bikoizten da, azterketako metodo ezberdinak aplikatzeko adinako lagin-kopurua izan arte. PCRak mugatzaile funtzioa duten ADN-kate motzen diseinua eskatzen du, ikertuko den ADN-katearen osagarriak direnak. Mugatzaile horien funtzioa bikoiztu beharreko ADN-katearen luzera finkatzea da, hasieran eta bukieran eransten baitira. Horien ondotik, Taq polimerasa izeneko entzimak ADN-katearen bikoizketa egiten du.

Horrela azterketak hezur eta hortzeta-za zabaltzeko aukera eskaini zuen PCR metodoak, eta, indusketa arkeologikoetatik lortzen den material arrunta izaki, gizaldien historia biologikoa aztertzeko atea zabaldu zen.

Arazo metodologikoak eta kutsadura

PCR metodoaren bikoizketa-kapazitatea, ordea, arazo bihurtzen da antzinako ADNaren kasuan. Antzinako ADNak kutsatzeko arrisku handia du kanpoko edozein elementurekin kon-

taktuan jartzean. Hori kontuan izanda, eta berreskuratzen diren antzinako ADN-kateak laburrak izaki, PCR metodoak kanpoko ADN-zatiak kopiatzeko probabilitate handia du. Horregatik, ezinbestekoa da zenbait neurri hartzea bikoizketaren emaitza ziurtatzeko.

*“momietatik
ADNa eskuratzea
lortu zenean,
gizakien antzinako
ADNaren
azterketari hasiera
eman zitzaion”*

Lehenik laborategiaren isolamendu fisikoa ziurtatu behar da, kanpoko elementuen eraginik izan ez dezan; bigarrenik, antzinako ADNaren berreskuratzerantz bideraturiko ekipamendua erabili behar da soilik eta, azkenik, erabili beharreko laginen esterilitate osoa

ziurtatu behar da. Lagin horiek ondoren kontserbatzen diren aleetatik atera ohi dira, eta gehienetan hezurak eta hortzak erabiltzen dituzte. “Hortz-mamitik ateratako antzinako ADN erabilgarriaren kopurua handiagoa da gaitortzeko ehun edo hezurretatik lortzen dena baino, eta, gainera, aztarnategietan pieza arrunta izaten da”.

Aipatutako neurri guztiez gain, azterketak errepikatu egin behar izaten dira laborategi berean nahiz ezberdinetan, eta ale beraren lagin bat baino gehiago erabiliaz; horrela, kutsadura egon den ala ez ziurtatzen da. Azkenik, antzinako ADN-sekuentzia homologatzeko, datu-baseetan gordetzen diren sekuentzia ezagunen unibertsoarekin konparatu behar da, ondoren emaitzak testuinguru filogenetiko egokian aztertu eta talde taxonomiko beraren beste espezie bizi edo hildakoen sekuentziekin alderatu behar dira.

Zein metodo erabiltzen dituzue azterketetarako?

“Bi metodo erabil daitezke, bata sekuentziarioa eta bestea entzima murriztaileen azterketa”.

Sekuentziarioa ADN-katean informazio genetikoaren erantzule diren base nitrogenatuen kokapena jakitea da. Hainbat pauso dituen metodo automatiko hori ADN-katearen anplifikazio berezi batean datza, non tamaina ezberdineko zati fluoreszenteak lortzen diren. Ondoren, elektroforesi bitartez banatzen dira, hau da, eremu elektriko



Hortzak dira elementu erabilienak antzinako ADNaren ikerketan.

ARTXIBOKOA

bat aplikatzen zaion gel batean bata bestearekiko aldentzen dira. Migrazio-abiadura tamainaren arabera da. Prozesu honetan laser irakurle batek zati bakoitzaren emisio fluoreszentea atzematen du, emisioa PCR prozesuan azkena gehitu zitaion base nitrogenatuaren menpekota delarik. Ondorioz, askatzen den fluoreszentiaren arabera base nitrogenatua ezagutzen da.

Entzima murriztaileekin, berriz, jomuga sekuentziak aztertzen dira. "Jomuga sekuentziak ADN-katean dauden pare nitrogenatuzko kate laburrak dira". Entzima murriztaileak ADN-katea puskatzeko gai dira jomuga sekuentziak dauden tokietatik. 4-6 base-pare nitrogenatuko (pb) luzera izaten duten

"euskal ikertzaileek ikusi dute V haplotaldearen absentsia dagoela Euskal Herriko aztarnategietan"

jomuga sekuentzia horiek ezberdinak izaten dira entzima murriztaile bakoitzeko, hau da, entzima murriztaile bategi jomuga sekuentzia jakin bat topatu behar du ADN-katea puskatu ahal izateko; gainera, jomuga sekuentzia hori askotan ez da existitzen. "ADN-kateak entzima ezberdinekin erreak-



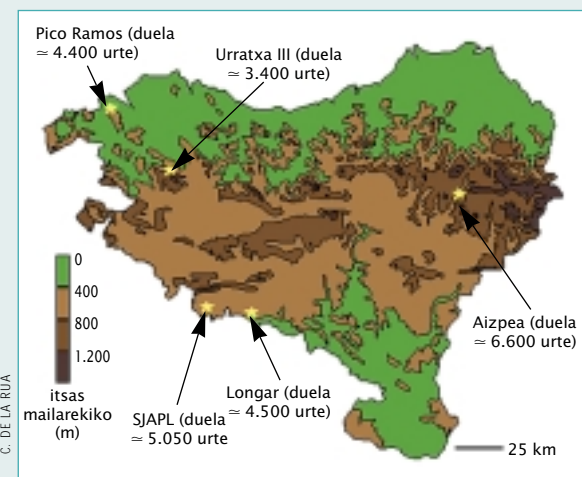
ARTXIBOKOA

Zientzia honen etorkizunak aurkikuntza berriak eskainiko ditu, dudarik gabe.

zionatzen duen ala ez ikusita, jomuga sekuentzia ezberdinak dituen ala ez jakin dezakegu eta jomuga sekuentziak izan ala ez, dauden patroiz ezberdinen arabera, erlazio-genetikoak ikusteko gai gara". Metodologikoki bigarren teknika hori errazagoa eta azkarragoa da, eta horrek emaitza positibo gehiago lortzeko aukera eskaintzen du.

Euskal Herrian zer?

Conchi de la Rúak eta bere taldekideek antropologiara zuzendu dituzte beraien ikerketak. Entzima murriztaileen metodoa erabiliz, hainbat euskal aztarnategitako kutsadurarik gabeko laginen % 97 klasifikatu ahal izan dute. Ehuneko altua badirudi ere, esan beharra dago berreskuratu diren laginen % 25 soilik osatzen dutela, egoera ezin hobean zeuden hortzak bakarrik aztertu direlako, kutsadura-arriskua ekidin nahian.



Aurkikuntzen artean, ikertzaile italiar batzuen teoriari aurka egiteko datuak lortu dituzte. Ikertzaile italiar horiek orain dela 10.000-15.000 urte Euskal Herriatik Europara zabaldu zen talde baten berri ematen zuten. Teoria horren

xedea gaur egun euskal gizartean dagoen talde genetiko baten ugaritasuna azaltzea zen, V Haplotalde deiturikoarena. Euskal ikertzaileen lanek frogatu dute talde horren absentsia dagoela antzinako ADNren laginetan, hau da, ez dagoela haplotalde horren garai hartako aztarnarik. Horrek zer esan nahi du? "Haplotalde hori ez zela hemen sortu, hemengoa balitz 10.000 urte baino gutxiagoko antzinatasuna duten laginetan agertu beharko lukeelako". Talde horren ugaritasuna azaltzeko, deriba genetikoan jartzen dute ikuspuntua Conchik eta bere taldekideek. "Haplotaldea definitzen duen mutazioak populazioaren talde batean, Gipuzkoan esaterako, tasa altua lortu ahal izan zuen populazioa txikia zen garai batean, eta ondoren eman ziren populazio-hazkunderik mutazio hori zabaldu ahal izan zuten".

Etorkizun hurbila

Azken urteetan antzinako ADNaren ikerketa helburu jakin batzuetara zuzendu da; erlazio filogenetikoak aurkitzera, aldakortasun genetikoaren denboran zehar aztertzerako edo aldaketa demografikoak ikertzera. Guztia biologia molekularren aurrerapenei eta PCR teknikaren garapenari zor zaio. Hala ere, hainbat oztopo daude oraindik, kutsadura-arriskua eta antzinako ADNaren kontserbazio kaskarra lekuko.

Etorkizunari begira jarrita, orain arte lortutako arrakastak ADNaren erauzketa-metodologia hobetzera eta antzinako lagin-kopurua handitzera zuzentzen ditu ikerketak. Horretaz gain, ADN nuklearraren ikerketan sakontzera bideratuko dituzte ikerketa berriak. Adierazle horiek amagandik jasotako informazioa ez ezik aitarena aztertzeko aukera ere emango dute. Etorkizunak emango al digu zientzia honen muga?