



IKER
GAZTE
NAZIOARTEKO
IKERKETA EUSKARAZ

VI. IKERGAZTE

NAZIOARTEKO IKERKETA EUSKARAZ

2025eko maiatzaren 28, 29 eta 30a
Bilbo, Euskal Herria

ANTOLATZAILEA:
Udako Euskal Unibertsitatea (UEU)



Aitortu-PartekatuBerdin 4.0

ZIENTZIAK ETA NATURA ZIENTZIAK

**Zebra arrainaren (*Danio rerio*) 3ab
transkripzio faktorearen (Gtf3ab)
azterketarako garaturiko
antigorputz poliklonal baten
Western Blot bidezko lokalizazioa
gonadetan**

*Amaia Casas Espiniella
eta Iratxe Rojo-Bartolomé*

243-249- or.

<https://dx.doi.org/10.26876/ikergazte.vi.05.30>

ANTOLATZAILEA



BABESLEAK



LAGUNTZAILEAK



Zebra arrainaren (*Danio rerio*) 3ab transkripzio faktorearen (Gtf3ab) azterketarako garaturiko antigorputz poliklonal baten Western Blot bidezko lokalizazioa gonadetan

Amaia Casas Espiniella, Iratxe Rojo-Bartolomé

Cell Biology in Environmental Toxicology + One Health (CBET+) ikerketa taldea, Zoologia eta Animalia Zehulen Biologia saila, Zientzia eta Teknologia Fakultatea, Euskal Herriko Unibertsitatea UPV/EHU
acasas013@ikasle.ehu.eus

Laburpena

Arrainek genoma osoa bikoizteko gertaera desberdinak jasan dituzte, eta kariotipo konplexuak eta genoma tamaina askotarikoak dira. Teleosteoetan bikoiztuta dauden genetariko bat *gtf3a* da. Gene honek 5S rRNA-ren transkripzioa aktibatzen du eta harekin lotzen da nukleotik kanpo garraiatzeko eta zitosolean metatzeko. Gene honen bi aldaera daude arrain teleosteoetan: obarioetan espezifikoki adierazten den *gtf3ab* eta ehun guztietan adierazitako *gtf3aa*. Ikerketa honetan Gtf3aa eta Gtf3ab-ren adierazpenaren lokalizazioa aztertu egin da, bi antigorputz desberdin erabilita. Emaitez erakusten dutenez, Gtf3ab proteina obarioetan adierazten da gehienbat, baliozkotzen bere erabilera sexu markatzaile molekular bezala etorkizuneko ikerketetan.

Hitz gakoak: zebra arraina, Gtf3ab, Gtf3aa, 5S rRNA

Abstract

Fishes have gone under different whole genome duplication events, resulting in complex karyotypes and varied genome sizes. In teleosts one of the genes that is duplicated is gtf3a. This gene activates the transcription of 5S rRNA and connects to it for the transport outside the nucleus and accumulation in the cytosol. There are two variants of this gene in teleosts: the gtf3ab specifically expressed in ovaries, and gtf3aa expressed in all tissues. In this study, the location of the Gtf3aa and Gtf3ab expression has been studied using two different antibodies. The results show that Gtf3ab protein is mostly expressed in ovaries, validating its use as a molecular sex marker in future studies.

Keywords: zebrafish, Gtf3ab, Gtf3aa, 5S rRNA

1. Sarrera eta motibazioa

Arrainak arrakasta ebolutibo handia izan duten ornodunen taldea dira. Planeta osoan zehar ozeanoko habitat eta ur gezako habitat ugarietan bizi dira (Glasauer eta Neuhauss, 2014). Gainerako kordatuetatik banatu zenetik teleosteen talde desberdinetan, genoma osoaren bikoizketa desberdinak gertatu dira. Bikoizketa horiek kariotipo konplexuagoak eta genoma tamaina anitzagoak eragin ditu beste ornodun taxon batzuekin alderatuta (Shao et al., 2019). Hala ere, gene askok ez dituzte bikoizketa osteko bi kopiak mantenduko (Picolo et al., 2021). Zebra arrainen (*Danio rerio*) kasuan, genoma osoaren bikoizketa honetatik gene-bikoiztuen % 20 gutxienez mantendu da (Symonová et al., 2018). Arrain hau ikerketan asko erabiltzen den espeziea da, bere garapen azkarra, ugalkortasun-tasa handia, manipulazio genetiko erraza eta kostu baxuek direla eta (Fowler et al., 2019).

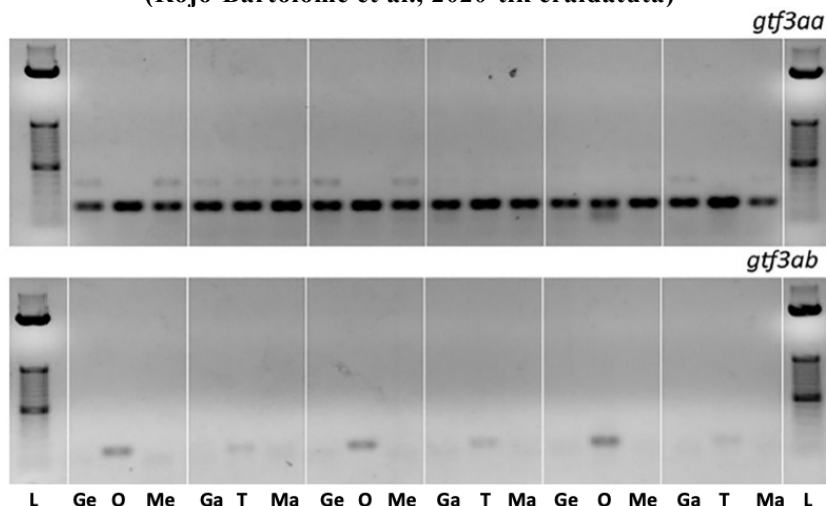
Arrainen garapenari dagokionez, oogenesia funtsezko prozesua da. Oogenesia gameto emeen garapen-prozesua da non oogoniak erabat garatutako, heldutako eta ernalkorrak diren obulu bihurtzen diren (Guzmán et al., 2014). Oogenesian zehar, bi jarduera-fase bereizten dira. Lehen fase goiztiarra, non, funtzio meiotikoak eta RNA-ren prozesamendu eta erregulazio funtzioak ematen diren, batez ere. Eta bigarren fase berantiar bat, non, funtzio-metabolikoak eta hazkunde-funtzioak ematen diren (Bogoch et al., 2022). 5S rRNA ez da beste RNA erribosomikoak bezala nukleoloan 45S pre-rRNA moduan sintetizatzen. Beraz, bere sintesia beste rRNA-rena baino lehenago ematen da eta altua da oogenesiaren fase goiztarrean (Rojo-Bartolomé, 2017).

5S rRNA-ren transkripzioan garrantzi handikoa da 3a transkripzio faktore orokorra (*gtf3a*). *gtf3a*-k 5S rRNA-ren transkripzioa aktibatzen du nukleoan, RNA polimerasa III-ren bidez. Gero 5S rRNA-rekin lotzen da eta nukleotik kanpo garraiatzen du (Polakowski eta Paule, 2002).

Hortaz, *gtf3a*-k oinarritzko funtzioak betetzen ditu zelulan, hala nola erribosomak sortzea enbrioien garapenaren lehen faseetan (Rojo-Bartolomé, 2017). Oinarritzko zelularen funtzioak betetzen dituzten geneak eboluzioaren aldetik kontserbatuta egoten dira, osotasun genomikoaren biziraupen eta mantentze mekanismoen kasuan ikusi den bezala (Ulsamer et al., 2022).

Teleosteen genometan *gtf3a*-ren bi gene paralogo daude, animalia horiek beren historia ebolutiboan zehar jasan duten genoma osoaren bikoizketa-gertaeraren ondorioz (Rojo-Bartolomé et al., 2020). Taldearen aurreko ikerketek erakutsi zuten, *gtf3ab*-ak transkripzio espezifikoak erakusten duela zebra arrainaren obarioetan (1. irudia), transkripzio apur bat testikuluetan ere erakutsiz. Transkripzioan erakutsitako desberdintasun hauek obarioetako 5S rRNA-ren ekoizpenarekin eta biltegitratzearekin lotuta dago (Rojo-Bartolomé et al., 2020). *gtf3aa*-ren kasuan, berriz, aztertutako ehun guztietan transkribatzen da (1. irudia), 5S rRNA-ren transkripzio mailako erregulazio gene bat izaten jarraitzen baitu ehun guztietan, testikuluak eta obarioak barne (Rojo-Bartolomé et al., 2020).

1. irudia. Agarosa-gelaren elektroforesiak, *gtf3aa* eta *gtf3ab* genearen adierazpena erakusten dutenak End-Point RT-PCR-aren ondoren. Zebra arrain eme baten garun (Ge), obario (O) eta muskulua (Me) eta zebra arrain ar baten garun (Ga), testikulu (T) eta muskulua (Ma). Kasu bakoitzean 100 (*gtf3aa*) eta 114 (*gtf3ab*) nukleotidoen zati amplifikatuak ikusi ziren. L = 50 pb estandarra (Rojo-Bartolomé et al., 2020-tik eraldatuta)



2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Aurreko ikerketek ikusi dute *gtf3ab*-en transkripzio mailak altuagoak direla eta gehiago pilatu egiten dela arrainen obarioetan testikuluetan baino, obuluen heltze-egoera edozein dela ere (Rojo-Bartolomé et al., 2016). Testikuluen eta obarioen artean 5S rRNA-ren eta *gtf3a*-ren metaketa desberdintasunak direla eta, ikusi da horiek sexu markatzaile molekularrak direla, hainbat arrain espezieetan erabilgarriak (Rojo-Bartolomé et al., 2016).

Beraz, RNA mailan *gtf3ab* obarioetan pilatzen dela jakinda, proteina mailan patroia bera mantentzea espero da. Eta proteinaren bi aldaeren artean Gtf3ab izango dela zebra arrainen obarioetan gehien metatuko dena. Hori kontuan hartuta, ikerketaren helburu nagusia zebra arrainen (*Danio rerio*) ehunetan proteina-mailan Gtf3ab transkripzio faktore orokorraren adierazpena lokalizatzea da, sexuaren markatzaile molekular absolutu gisa erabilgarria izan daitekeen jakiteko.

Gainera, esan bezala, *gtf3a* geneak zelularentzat oinarritzko funtzioa betetzen duela kontuan hartuta, animalia espezie desberdinen artean kontserbatuta egotea espero da. Horri esker, giza laginetarako dagoeneko eskuragarri dagoen antigorputz komertzial bat erabil liteke zebra arrainen proteinen adierazpena aztertzeko. Ondorioz, ikerketa honen bigarren mailako helburua giza GTF3A-rako diseinatutako antigorputz komertzial bat zebra arrainen ehunetan sintetizatutako proteina detektatzeko gai dela frogatzea da.

3. Ikerketaren muina

3.1 Proteina-sekuentzien kontserbazioa

gtf3a geneak kodetutako proteinak gizakien eta zebra arrainaren artean kontserbatuta ote dauden egiaztatzeko, aminoazidoen sekuentziak alderatu ziren Clustal-omegaren (EMBL-EBI, s.f.) bidez. Horretarako gizakiaren GTF3A zebra arrainaren proteina paralogo biek, a eta b, konparatu zen (1. taula). Emaitez erakusten dutenez, aminoazidoen sekuentzia nahiko kontserbatuta dago bi espezieetan. GTF3A eta Gtf3aa-ren kasuan berdinak dira aminoazidoen sekuentziaren % 49-an (1A taula). Bestalde, giza GTF3A Gtf3ab-rekin alderatuta, sekuentziaren % 38-a berdina da (1B taula). Beraz, gizakiaren GTF3A antza gehiago du zebra arrainaren Gtf3aa-rekin.

Zebra arrainaren Gtf3aa eta Gtf3ab ere alderatu ziren (2. taula). Proteinaren bi aldaera hauek sekuentziaren % 36-an berdinak dira (2. taula). Konparaketa honekin ikusten da bi paralogoen aminoazido sekuentziak antza dutela, ezberdintasun nagusia C-muturrean aurkezten delarik, luzeagoa izanik Gtf3aa-ren kasuan.

1. taula. (A) Giza GTF3A eta zebra arrainaren Gtf3aa aminoazidoen sekuentzien konparaketa Clustal-omegaren bidez. (B) Giza GTF3A eta zebra arrainaren Gtf3ab aminoazidoen sekuentzien konparaketa Clustal-omegaren bidez. (*) Bi sekuentzietan aminoazidoa berdina denean. (:) Propietate oso antzekoak dituzten aminoazido taldeen kontserbazioa dagoenean. (.) Antzeko propietateak dituzten aminoazido taldeen kontserbazioa ematen denean.

A		
GTF3A eta Gtf3aa		
GTF3A	MDPPAVVAESVSLTIADAFIAAGESSAPTPRPALPRFICSPDSCSANYSKAWKLDH	60
Gtf3aa	-----MTM-----DETANVDQLGEIFICSYPDCHAYNREWKLOAH	37
	: : * * * *	
GTF3A	LCKHTGERPFVCDYEGCGKAFIRDYHLSRHILHTGKPFVCAANGCDQKFNKSNLKKH	120
Gtf3aa	LCKHTGERPYKCKYKCKSFKTKHLSRHVLTHTGKPYRCHMEDGCKEGFTTNSNLQKH	97
	***** : * . : * . * . : : ***** : * . : * . : * . : * . : *	
GTF3A	FERKHENQKQYICSFEDCKTKFKKHQQLKTHQCHTNEPLFKCTQEGCGKHFAFSPKLLK	180
Gtf3aa	ISRIHRQETKQYICTFEGCGKAFKNNQKLTHTCTHQLPFLCTQEGCGRRFSQKGLK	157
	: * . : : ***** : * . : * . : * . : * . : * . : * . : * . : *	
GTF3A	RHAKAHEGYVCQ--KGCSFVAKTWTLLKHVRETHKEELICEVCRKTFKRKYDLKQHKMTH	239
Gtf3aa	RHEKVKHGYSCETEGCSFVAKWTFENTNHK--KVHIVRVQCDQCKTFRDSWFLKQHQHVV	216
	* . * . : * . : * . : * . : * . : * . : * . : * . : * . : * . : *	
GTF3A	APERDVCRCPREGCGRTYTTVFNLSHLSFHEESRPFVCEHAGCGKTFAMKQSLTRHAV	299
Gtf3aa	SEERLVFHCPRDGCRTSYTTAFNLQSHLSFHEEQRSFICAHGCGKAFKMSQSLQRHGV	276
	: * . : * . : * . : * . : * . : * . : * . : * . : * . : * . : *	
GTF3A	VHDPDKKQMLKV--KKSREKSL--ASHLSGYIPPKRQGGQLSL-----CQK-----GES	347
Gtf3aa	VHDPEKKQMKP-----RPKRSLASRLSGYKSKTRQTKTETSAPOISQENPTHPQSDNQ	331
	***** : * . : * . : * . : * . : * . : * . : * . : * . : *	
GTF3A	PNCVEDKMLSTVAVLTG-----	365
Gtf3aa	LHCLSETLPSSHLEPKSICSPANPMHLEPFLV	367
	: * . : : * . : : * . : : * . : : * . : : * . : : * . : : *	
B		
GTF3A eta Gtf3ab		
GTF3A	MDPPAVVAESVSLTIADAFIAAGESSAPTPRPALPRFICSPDSCSANYSKAWKLDH	60
Gtf3ab	-----MG-----ERIQDPNKHFTCTFADCKATFSLKWLKLEHV	32
	: : * . : * . : * . : * . : * . : * . : * . : * . : * . : *	
GTF3A	LCKHTGERPFVCDYEGCGKAFIRDYHLSRHILHTGKPFVCAANGCDQKFNKSNLKKH	120
Gtf3ab	YCRHTGLKPFACG--DCEKTFCTRYQLTRHQLSHSGEKPYLCSVSGCSAAFSTPGSLRNH	90
	* : * . : * . : * . : * . : * . : * . : * . : * . : * . : *	
GTF3A	FERKHENQKQYICSFEDCKTKFKKHQQLKTHQCHTNEPLFKCTQEGCGKHFAFSPKLLK	180
Gtf3ab	IAQVHDNKVRHYVYQNGCAKEFHKKQLKTLCEHTNELSFKCDHEKQNNKFAFSPKLLK	150
	: : * . : * . : * . : * . : * . : * . : * . : * . : * . : *	
GTF3A	RHAKAHEGYVCQ--KGCSFVAKTWTLLKHVRETHKEELICEVCRKTFKRKYDLKQHKM--T	238
Gtf3ab	RHRKLHEGYPCGEENCFKQNTWSEYLYKRRRAHVNLPQNCQCKVFKVCFQLQHKMKFV	210
	* . : * . : * . : * . : * . : * . : * . : * . : * . : * . : *	
GTF3A	HAPERDVCRCPREGCGRTYTTVFNLSHLSFHEESRPFVCEHAGCGKTFAMKQSLTRHA	298
Gtf3ab	HSGERRMFKCTREGCKQSYTRFRNLHNLDFHEGKRDFTCHFGCDKAFAMEESLKRHF	270
	* : * . : * . : * . : * . : * . : * . : * . : * . : * . : *	
GTF3A	VHDPDKKQMLKV--KKSREKSL--ASHLSGYIPPKRQGGQLSLCQNGSPNCVE	352
Gtf3ab	VHMPQKTKPQKPKVKPKRKTTSKAKTSDAALKSEHL-----KVSLLTKTP--LP-----	318
	***** : * . : * . : * . : * . : * . : * . : * . : * . : *	
GTF3A	DKMLSTVAVLTG	365
Gtf3ab	-----	318

2. taula. Zebra arrainaren Gtf3aa eta Gtf3ab aminoazidoen sekuentzien konparaketa Clustal-omegaren bidez. (*) Bi sekuentzietan aminoazidoa berdina denean. (:) Propietate oso antzekoak dituzten aminoazido taldeen kontserbazioa dagoenean. (.) Antzeko propietateak dituzten aminoazido taldeen kontserbazioa ematen denean.

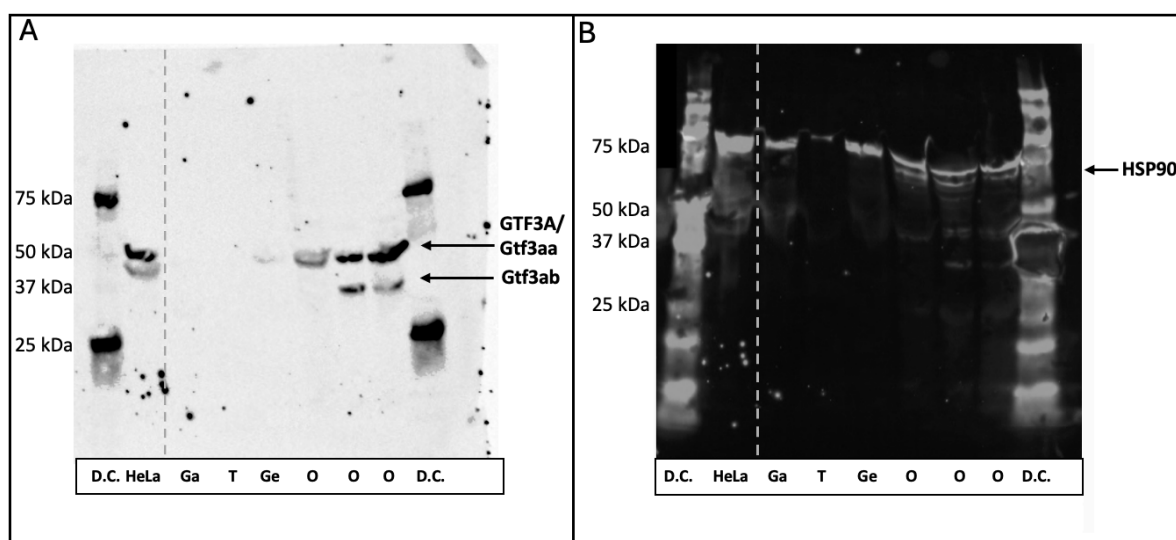
Gtf3aa eta Gtf3ab		
Gtf3aa	MTMDETANVDQLGEIFICSYPDCHAYNREWKLOAHLCKHTGERPYKCKYKCKSFKCT	60
Gtf3ab	-----MGERIQDPNKHFTCTFADCKATFSLKWLKLEHVHYCRHTGLKPFACG--DCEKTFCT	53
	. : : : . : * . : * . : * . : * . : * . : * . : * . : * . : *	
Gtf3aa	KHLSRHVLTHTGKPYRCHMEDGCKEGFTTNSNLQKHISRIHRQETKQYICTFEGCGKAF	120
Gtf3ab	RYQLTRHQLSHSGEKPYLCSVSGCSAAFSTPGSLRNHIAQVHDNKVRHYVYQNGCAKEF	113
	: : : * . : * . : * . : * . : * . : * . : * . : * . : * . : *	
Gtf3aa	KNNQLKTHECTHTQLLPFLCTQEGCGRRFSQKGLKRHEKVKHGYSCETEGCSFVAKNW	180
Gtf3ab	HKKQLKTLCEHTNELSFKCDHEKQNNKFAFSPKALKRHRKLHEGYPCGEENCFKQNTW	173
	: * : * . : * . : * . : * . : * . : * . : * . : * . : * . : *	
Gtf3aa	TEMNHK--KVHIVRVQCDQCKTFRDSWFLKQH--QHVHSEERLVFHCPRDGCRTSYTTAF	238
Gtf3ab	SEYLKRRRAHVNLPQNCQCKVFKVCFQLQHKHFKVHSGERRMFKCTREGCKQSYTRRF	233
	: * : * . : * . : * . : * . : * . : * . : * . : * . : * . : *	
Gtf3aa	NLQSHLSFHEEQRSFICAHGCGKAFKMSQSLQRHGVVHDPDKKQMKP-----RPKRSLAS	295
Gtf3ab	NLENHVLDFHEGKRDFTCHFGCDKAFAMEESLKRHFVHMPQKTKPQKPKVKPKRKTTS	293
	* . : * . : * . : * . : * . : * . : * . : * . : * . : * . : *	
Gtf3aa	RLSGYKSKTRQTKTETSAPOISQENPTHPQSDNQLHCLSETLPSSHLEPKSICSPA	355
Gtf3ab	KAK-----TSDAALKSEHLQKVSLL-----KTPLP-----	318
	: . . . : * . : : * . : : * . : : * . : : * . : : * . : : *	
Gtf3aa	NPVMHLEPFLV	367
Gtf3ab	-----	318

3.2 Zebra arrainaren Gtf3aa eta Gtf3ab-ren erreaktibitatea gizakiaren GTF3A-ren aurkako antigorputzarekin

Lehenengo giza GTF3A proteinaren aurkako Abcam-eko antigorputz poliklonal bat (Ab254632) erabili zen. Produktu honen fitxaren arabera, giza laginekin erreakzionatzen du immunohistokimika eta immunofluoreszentzia azterketetan, baina kasu honetan zebra arrainaren laginekin erabili nahi zen. Beraz, arrain ehunetan ere erabilgarria ote den egiaztatzeko Western Blot azterketa burutu zen (2A eta 2B irudiak). Horretarako, zebra arrainaren ehun desberdinak eta HeLa zelulak (kontrol moduan) lisatu eta proteinak metanol-kloroformo prezipitazioaren bidez erauzi ziren. Gero proteina lagin horiekin elektroforesia poliakrilamidazko gelean burutu zen, proteinak tamainaren eta kargaren arabera bereizteko. Ondoren, proteina horiek mintzera transferitu ziren metodo erdilehorren bidez. Mintza blokeatu eta antigorputz primarioekin (GTF3A eta HSP90) inkubatu zen, eta inkubazioa amaitzean hiru aldiz garbitu egin zen PBS-Tween-arekin. Azkenik, antigorputz sekundarioarekin (Anti-Rabbit 800) inkubatu, berriro garbitu eta ChemiDoc MP Imaging System bidez bistaratu zen.

2A irudian HeLa zelulen laginetan zebra arrain emearen garunean (nahiz eta gainerakoak baino finagoa izan) eta zebra arrainaren obarioetan 50 kDa-eko banda bat ikus daiteke. Gainera, obarioetako laginetan 37 kDa inguruko proteina baten bigarren banda bat ikusten da. Beraz, giza antigorputz hau ez da espezifikoa zebra arrainaren proteina batentzako, obarioetan bi proteina detektatzen baitira.

2. irudia. (A) Western Blot emaitzak Gtf3a proteina adierazteko HeLa zelulen proteina erauzketetan, zebra arrain ar baten garun (Ga) eta testikuluetan (T) eta zebra arrain eme baten garun (Ge) eta obarioetan (O). GTF3A antigorputza 1:200 diluzioan. (B) Western Blot emaitzak HSP90 adierazteko karga-kontrol gisa. D.C = Dual Color pisu molekularren markatzailea.



3.4 Gtf3ab proteinaren adierazpena zebra arrainaren ehunetan antigorputz espezifikoarekin

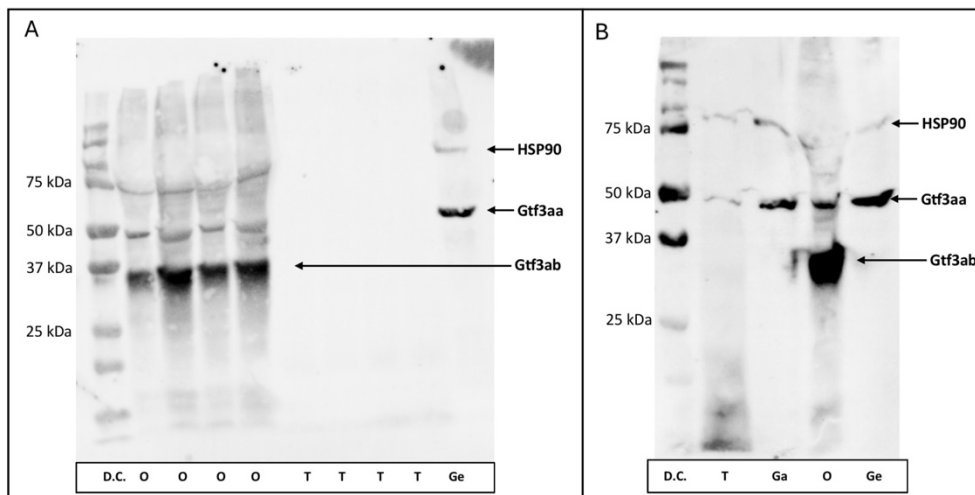
Giza antigorputzarekin zebra arrainaren ehunetan proteina detektatu ondoren, jakin nahi izan zen ea proteinaren aldaera jakin bat detektatzen ari zen. Gtf3ab aldaera proteikoa aztertzeko (obarioan adierazten dena), antigorputz poliklonal bat sintetizatu zen (Abyntek Gtf3ab). Horretarako, bi proteina paralogoen sekuentzien konparazioan oinarrituta, lau peptido sortarazi ziren eta horietako bi (3. taula) baliatu ziren unxiak immunizatzeke. Peptido horiek Gtf3aa eta Gtf3ab-ren arteko homologia gutxieneko gunetan aukeratu ziren, Gtf3ab-rako espezifikoa izan zitezen.

3.taula. Antigorputz poliklonalaren sintesirako baliatutako bi peptidoen sekuentziak.

Peptidoa	Sekuentzia
Peptido 1	MGERIQDPNKHFTC
Peptido 2	NTWSEYLNKRRRTAHRVNLPC

3A eta 3B irudietan ikus daitekeenez, obarioetan Gtf3ab antigorputzarekin bi banda ikusten dira, bata 50 kDa-ekoa, eta bestea 37 kDa-ekoa. Burmuinean eta testikulan, berriz, 50 kDa-eko banda bakarra ikusten da. 3A irudian, testikulu laginek ez dute proteinarik erakutsi. Bi banda hauek giza antigorputzarekin agertzen ziren bandekin bat datoz. Kasu honetan obarioetan bakarrik agertzen den 37 kDa-eko banda 50 kDa-ekoa baino intentsitate handiagoa du.

3. irudia. (A) Western Blot emaitzak, Gtf3ab adierazteko zebra arrainaren obario (O), testikulu (T) eta garun (Ge) laginetan. Gtf3ab (Abyntek) antigorputza 1:250 diluzioan, eta HSP90 karga kontrol gisa. D.C =Dual Color pisu molekularren markatzailea. (B) Western Blot emaitzak, Gtf3ab-ren adierazpena zebra arrainaren testikulu (T), arraren garunaren (Ga), obarioaren (O) eta emearen garunaren (Ge) laginetan. Gtf3ab (Abyntek) antigorputza 1:250 diluzioan, eta HSP90 karga kontrol gisa. D.C =Dual Color pisu molekularren markatzailea.



4. Ondorioak

Aldez aurreko ikerketek erakutsi dute 5S rRNA, tRNA eta haien ekoizpen, garraio eta metaketarekin batera doazen proteinak hainbat arrain espezieta emeen obarioetan pilatzen direla (Diaz de Cerio et al., 2012; Ortiz-Zarragoitia et al., 2014; Bir et al., 2023). 5S rRNA-ri funtzionalki lotutako geneetako bat *gtf3a* da.

Zebra arrainaren *gtf3a* genomatik bikoiztuta dagoela ikusi da, tamainan bereizten diren bi aldaera (*gtf3aa* eta *gtf3ab*) adierazten (Rojo-Bartolomé et al. 2020). Clustal-omega bidez egindako proteinen konparazioek erakusten dute zebra arrainaren proteinaren bi aldaerak kontserbatuta daudela giza GTF3A-rekiko. Kontzertatuta hori dela medio, lan honek erakutsi du posible dela giza antigorputzak erabiltzea Western Bloten zebra arrainaren ehunetan Gtf3a proteinaren adierazpena aztertzeko. Horrela, Gtf3ab proteina laburrago bat bereiz daiteke, batik bat bere C-muturrean.

Lortutako emaitzek erakusten dute, gainera, zebra arrainen ehunetan proteinen bi aldaerak adierazpen desberdina dutela obarioetan eta aztertutako gainerako ehunetan. Testikulan eta garunean banda bat lortzen da (≈ 50 kDa), bai giza antigorputzarekin, bai zebra arrainerako diseinatutakoarekin, eta obarioetan argi eta garbi bereizitako bi banda (≈ 50 kDa eta ≈ 37 kDa) detektatzen dira. Bi banda horiek proteinaren bi aldaerei dagozkie (Gtf3aa eta Gtf3ab), gainerako ehunetan (garuna eta testikuluak) bakarrik agertzen baita (≈ 50 kDa). Aztertutako ehun guztietan

adierazten den proteina Gtf3aa da, eta obarioan espezifikoa Gtf3ab da. Beste azterlan batzuetan ikusi da RNA mailan, *gtf3ab* genea oso adierazia dagoela obozitoak bereizten diren bitartean (Liu et al., 2022; Rojo-Bartolomé et al., 2020), eta, beraz, obarioetan transkripzio eta itzulpen espezifikoa duela.

Zebra arrainaren antigorputza Gtf3ab aldaera bakarrik antzemateko sintetizatu arren, bi proteina desberdin (≈ 50 kDa eta ≈ 37 kDa) antzemateko gai dela ikusi da. Bi proteina hauek (Gtf3aa eta Gtf3ab) giza antigorputzak ere identifikatzen ditu. Bi antigorputz hauen arteko aldea da bakoitzak afinitate handiagoa duela proteinaren aldaera betengatik. Giza antigorputzak afinitate handiagoa du Gtf3aa-rekin, 50 kDa-eko banda intentsitate handiagoarekin ikusten baita. Eta zebra arrainerako antigorputza Gtf3ab-rekin afinitate handiagoa du, obarioetan bakarrik agertzen den 37 kDa-eko banda intentsitate handiagoa erakutsiz.

Ondorioz, nahiz eta erreplika gehiago behar dituzten aurretiazko azterketak izan, lan honek Gtf3a proteina zebra arrainen obarioetan adierazten dela egiaztatzen du. Ehun horretan pisu molekular desberdineko proteinaren bi aldaera agertzen dira, Gtf3aa eta Gtf3ab, eta bigarren aldaera da gehien adierazten dena (37 kDa ingurukoa). Gainera, giza GTF3A antigorputz komertziala zebra arrainaren Gtf3a proteinaren adierazpena aztertzeke erabil daiteke, Western Blot-en bidez, nahiko kontserbatuta baitago bi espezieetan.

5. Etorkizunerako planteatzeko den norabidea

Etorkizunari begira, obarioetako proteina aldaeraren adierazpenean dauden desberdintasun horiek zebra arrainaren sexua bereizteko erabil litezke. Alde batetik, proteina hau espezie desberdinen artean kontserbatuta dagoela aprobetxatuz, Western Blota erreplika liteke beste arrain espezie batzuekin erabilgarria den jakiteko. Beste alde batetik, proteina horri buruzko informazio gehiago lortzeko, immunofluoreszentzia esperimenduak egin litezke ehun mailan, obario zein testikuluekin, jakiteko Gtf3ab zehazki non adierazten den. Gainera, posible izanez gero, immunofluoreszentzian lortutako emaitzak RNA-FISH (RNA fluorescence in situ hybridization) batekin konpara liteke. Teknika honek RNA eta proteinak zelula finkoetan bistaratzea eta lokalizatzea ahalbidetzen ditu, beraz ea obozito kalitatea zuzenki proportzionala den Gtf3ab-ren kantitatearekin jakiteko ere erabil liteke.

6. Erreferentziak

- Bir, J., Rojo-Bartolomé, I., Lekube, X., Diaz de Cerio, O., Ortiz-Zarragoitia, M., & Cancio, I. (2023). High production of transfer RNAs identifies the presence of developing oocytes in ovaries and intersex testes of teleost fish. *Marine Environmental Research*, 186. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2023.105907>
- Bogoch, Y., Jamieson-Lucy, A., Vejnar, C. E., Levy, K., Giraldez, A. J., Mullins, M. C., & Elkouby, Y. M. (2022). Stage Specific Transcriptomic Analysis and Database for Zebrafish Oogenesis. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.826892>
- Diaz de Cerio, O., Rojo-Bartolomé, I., Bizarro, C., Ortiz-Zarragoitia, M., & Cancio, I. (2012). 5S rRNA and accompanying proteins in gonads: powerful markers to identify sex and reproductive endocrine disruption in fish. *Environmental science & technology*, 46(14), 7763–7771.
- EMBL's European Bioinformatics Institute. (s. f.). Clustal Omega. Multiple Sequence Alignment (MSA). Recuperado 11 de junio de 2024, de <https://www.ebi.ac.uk/jdispatcher/msa/clustalo>
- Fowler, L. A., Williams, M. B., Dennis-Cornelius, L. N., Farmer, S., Barry, R. J., Powell, M. L., & Watts, S. A. (2019). Influence of Commercial and Laboratory Diets on Growth, Body Composition, and Reproduction in the Zebrafish *Danio rerio*. *Zebrafish*, 16(6), 508–521. <https://doi.org/10.1089/zeb.2019.1742>
- Glasauer, S. M. K., & Neuhauss, S. C. F. (2014). Whole-genome duplication in teleost fishes and its evolutionary consequences. In *Molecular Genetics and Genomics* (Vol. 289, Issue 6, pp. 1045–1060). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00438-014-0889-2>

- Guzmán, J. M., Luckenbach, J. A., Yamamoto, Y., & Swanson, P. (2014). Expression profiles of fsh-regulated ovarian genes during oogenesis in coho salmon. *PLoS ONE*, 9(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114176>
- Liu, X., Huang, Y., Tan, F., Wang, H. Y., Chen, J. Y., Zhang, X., Zhao, X., Liu, K., Wang, Q., Liu, S., Piferrer, F., Fan, G., & Shao, C. (2022). Single-Cell Atlas of the Chinese Tongue Sole (*Cynoglossus semilaevis*) Ovary Reveals Transcriptional Programs of Oogenesis in Fish. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.828124>
- National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information. (2021). Transcription factor IIIA [Homo sapiens]. Protein. Recuperado 11 de junio de 2024, de https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP_002088.2
- National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information. (2020). General transcription factor IIIAa [*Danio rerio*]. Protein. Recuperado 11 de junio de 2024, de https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP_001003866.1
- National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information. (2020a). General Transcription Factor IIIA, b [*Danio rerio*]. Protein. Recuperado 11 de junio de 2024, de https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP_001083013.2
- Ortiz-Zarragoitia, M., Bizarro, C., Rojo-Bartolomé, I., de Cerio, O. D., Cajaraville, M. P., & Cancio, I. (2014). Mugilid fish are sentinels of exposure to endocrine disrupting compounds in coastal and estuarine environments. In *Marine Drugs* (Vol. 12, Issue 9, pp. 4756–4782). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/md12094756>
- Piccolo, F., Grandchamp, A., Piégu, B., Rolland, A. D., Veitia, R. A., & Monget, P. (2021). Genes Encoding Teleost Orthologs of Human Haploinsufficient and Monoallelically Expressed Genes Remain in Duplicate More Frequently Than the Whole Genome. *International Journal of Genomics*, 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/9028667>
- Polakowski, N., & Paule, M. R. (2002). Purification and characterization of transcription factor IIIA from *Acanthamoeba castellanii*. In *Nucleic Acids Research* (Vol. 30, Issue 9).
- Rojo Bartolomé, I. (2017). Sex differentiation in teleost fish species: molecular identification of sex and oocyte developmental stage.
- Rojo-Bartolomé, I., de Cerio, O. D., Diez, G., & Cancio, I. (2016). Identification of sex and female's reproductive stage in commercial fish species through the quantification of ribosomal transcripts in gonads. *PLoS ONE*, 11(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149711>
- Rojo-Bartolomé, I., de Souza, J. E. S., de Cerio, O. D., & Cancio, I. (2020). Duplication and subfunctionalisation of the general transcription factor IIIA (gtf3a) gene in teleost genomes, with ovarian specific transcription of gtf3ab. *PLoS ONE*, 15(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0227690>
- Shao, F., Han, M., & Peng, Z. (2019). Evolution and diversity of transposable elements in fish genomes. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51888-1>
- Symonová, R., & Howell, W. M. (2018). Vertebrate genome evolution in the light of fish cytogenomics and rDNAomics. In *Genes* (Vol. 9, Issue 2). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/genes9020096>
- Ulsamer, A., Martínez-Limón, A., Bader, S., Rodríguez-Acebes, S., Freire, R., Méndez, J., de Nadal, E., & Posas, F. (2022). Regulation of Claspín by the p38 stress-activated protein kinase protects cells from DNA damage. *Cell Reports*, 40(12). <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.111375>

7. Eskerrak eta oharrak

Eskerrak “Cell Biology in Environmental Toxicology + One Health (CBET+)” ikerketa taldeari. Telmo Portugal Barandari eskerrak, lan honetan erabilitako zebra arrainak bere esperimentuetatik eratorriak baitziren. Eta azkenik, eskerrik zintzoenak Iratxe Rojo-Bartolomé lanaren zuzendariari, baita lan honetan zehar lagundu izan duen Jon Ander Nietori.