



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea



ZTF-FCT
Zientzia eta Teknologia Fakultatea
Facultad de Ciencia y Tecnología



ZIENTZIA ETA TEKNOLOGIA FAKULTATEA. LEIOA

GRADU AMAIERAKO LANA

BIOTEKNOLOGIA

Sasoia-aren menpeko erreferentzia
geneen transkripzio-profilen ikerketa
Chelon labrosus lazunean

Ikaslea: Ibañez Perez, Jone

Data: Ekaina 2014

Zuzendaria

Maren Ortiz Zarragoitia

Ikasturtea

2013/14

Zuzendari ordea

Eider Bilbao Castellanos

AURKIBIDEA

1. LABURPENA.....	1
2. SARRERA.....	2
2.1. HONDOETAKO KORROKOIA EDO LAZUNA.....	2
2.2. TRANSKRIPTOMIKA.....	6
2.2.1. Denbora errealeko PCR kuantitatiboa (qRT-PCR).....	7
2.3. ERREFERENTZIA GENEAK.....	9
2.3.1. Aztertuko diren erreferentzia geneak.....	10
2.3.1.1. β -Aktina (ACTB).....	10
2.3.1.2. 18S RNA erribosomikoa (18S rRNA).....	10
2.3.1.3. 1- α Elongazio faktorea (EF-1- α).....	11
2.3.1.4. Glizeraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH)..	11
2.3.1.5. TATA kutxa lotura proteina (TBP).....	11
2.3.2. QuanT-iT OliGreen ssDNA metodoa.....	12

3. HIPOTESIA.....	12
4. HELBURUAK.....	12
5. MATERIALAK ETA METODOAK.....	13
5.1. LAGINAK.....	13
5.1.1. Erabilitako laginak.....	13
5.1.2. RNA erauzketa eta cDNA-ren sintesia.....	14
5.2. ITU SEKUENTZIEN LORPENA.....	15
5.2.1. Glizeraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH)	15
5.2.2. TATA kutxa lotura proteina (TBP)	16
5.3. qRT-PCR BIDEZKO ITU GENEEN TRANSKRIPZIO MAILEN NEURKETA.....	19
5.4. QuanT-iT OliGreen.....	21
5.5. ERABILITAKO ERRAMINTA INFORMATIKOAK.....	22
5.6. ESTADISTIKA.....	22

6. EMAITZAK.....	23
6.1. DISEINATUTAKO HASLEAK.....	23
6.2. ITU GENEEN TRANSKRIPZIO MAILA: ERREFERENTZIA GENEEN BIDEZKO NORMALIZAZIOA.....	28
6.2.1. Emeetan lortutako emaitzak.....	28
6.2.2. Arretan lortutako emaitzak.....	31
6.3. ITU GENEEN TRANSKRIPZIO MAILA: QuanT-iT OliGreen-aren BIDEZKO NORMALIZAZIOA.....	34
6.3.1. Emeetan lortutako transkripzio-profilak.....	34
6.3.2. Arretan lortutako transkripzio-profilak.....	36
7. EZTABAIDA.....	38
8. ONDORIOAK.....	40
9. ESKER ONAK.....	41
10.BIBLIOGRAFIA.....	42
11.ERANSKINAK.....	i

1. LABURPENA

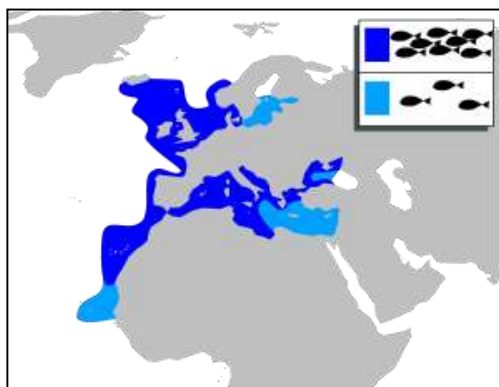
Chelon labrosus lazuna oso erabilia da kutsaduraren eragina aztertzeko organismo zentinelaz bezala, oso kutsatuta dauden itsaso zabaleko zein itsasadarretako uretan bizirauteko gai baita. Kutsatzaileek zelulen, ehunen eta organismoen transkripzio-profilen aldaketa eragin dezaketela ondo deskribatuta dago. Aldaketa hauek neurtzeko, gene-espresioaren normalizazioa burutu behar da. Eskuarki, normalizazio prozesua burutzeko, metabolismo orokorreko geneak erabiltzen dira, hau da, erreferentzia geneak. Gene hauek, zelularen oinarriko funtzioak garatzeko beharrezkoak diren geneak dira eta zelula guztietan konstitutiboki adierazi ohi dira. Aurretik egin diren zenbait ikerketetan ordea, gene hauen transkripzio maila egoera esperimentalen, ehun motaren, garapen fasearen edota zelularen zikloaren arabera aldatu egiten dela behatu da. Hortaz, erreferentzia geneen transkripzio mailen aldaketak, aztergai den itu genearen interpretazio okerra eman dezake. Hori dela eta, azken urte hauetan, beste metodo batzuk garatzen ari dira geneen transkripzio maila normalizatzeko, esaterako, QuanT-it OliGreen metodoa. Testuinguru honetan, *Chelon labrosus* lazunean toxikologia-analisiak egiteko gehien erabiltzen diren erreferentzia geneen transkripzio-profilak aztertu dira indibiduo ar zein emeetan ugalketa zikloaren zeharreko fase gametogeniko desberdinetan (bost guztira). Horretarako, erreferentzia gene bat, itu gene kontsideratuz, normalizazioa beste erreferentzia geneekiko zein QuanT-it OliGreen metodotik lortutako emaitzekiko burutu da. Aztertutako geneak β -aktina (BA), 18S RNA erribosomikoa (18S rRNA), 1- α elongazio faktorea (EF-1- α) eta glizeraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) izan dira. Aztergai zeuden erreferentzia geneen transkripzio maila qRT-PCR bidez kuantifikatu ondoren, aurretik aipatutako bi metodoekiko normalizatu ziren. Normalizazioa erreferentzia geneekiko egin zenean, itu gene berak transkripzio-profil desberdinak aurkeztu zituen normalizaziorako erabili zen erreferentzia genearen arabera. QuanT-it OliGreen metodoaren bidezko normalizazioa egin zenean berriz, aztertutako erreferentzia gene guztien transkripzio-profila, fase gametogenikoen arabera aldatzen zela ondorioztatu zen. Beraz, itu gene baten transkripzio-profilaren azterketa egin nahi denean QuanT-it OliGreen metodoa erreferentzia geneak erabiltzea baino fidagarriagoa da.

2. SARRERA

2.1. HONDOETAKO KORROKOIA EDO LAZUNA (*Chelon labrosus* Risso, 1927)

Lazuna *Mugilidae* familiako arraina da. Familia honen barruan 80 espezie daude, eta espezie hauek mundu osoan zehar banatuta daude, nagusiki, klima epel eta klima tropikaletako itsasoetan (Nelson, 1994). Familia honetako espezie gehienak pelagikoak dira eta habitat desberdinetan aurkitu daitezke; kostaldean, estuarioetan, ibaietan, eta itsasoan, Ozeano Artikoa eta Antartikoa kenduta. Gainera, espezie hauek oso erabiliak dira organismo zentinela bezala ikerketa desberdinak burutzeko, esaterako; ikerketa parasitologikoak (Burgess et al., 1994; Merella et al., 2001), ikerketa filogenetikoak (Turan et al., 2005), ikerketa ekologikoak (Delgado de Carvalho et al., 2007) eta ingurune osasun ebaluazioak. (Orbea et al., 2002, Fossi et al., 2005).

Lazuna, ipar-ekialdeko Ozeano Atlantikoan, Itsaso beltzean, Itsaso Baltikoan eta Mediterraneo itsasoan bizi da (**1. Irudia**). Kostatik hurbil egoten da, estuario eta itsasadarretan adibidez. Honek duen banaketa geografikoa dela eta, adierazle biologiko modura oso erabilia da, gehien bat, kostaldeko inguruneetan.



1. Irudia: *Chelon labrosus*en banaketa geografikoa (http://es.wikipedia.org/wiki/Chelon_labrosus).

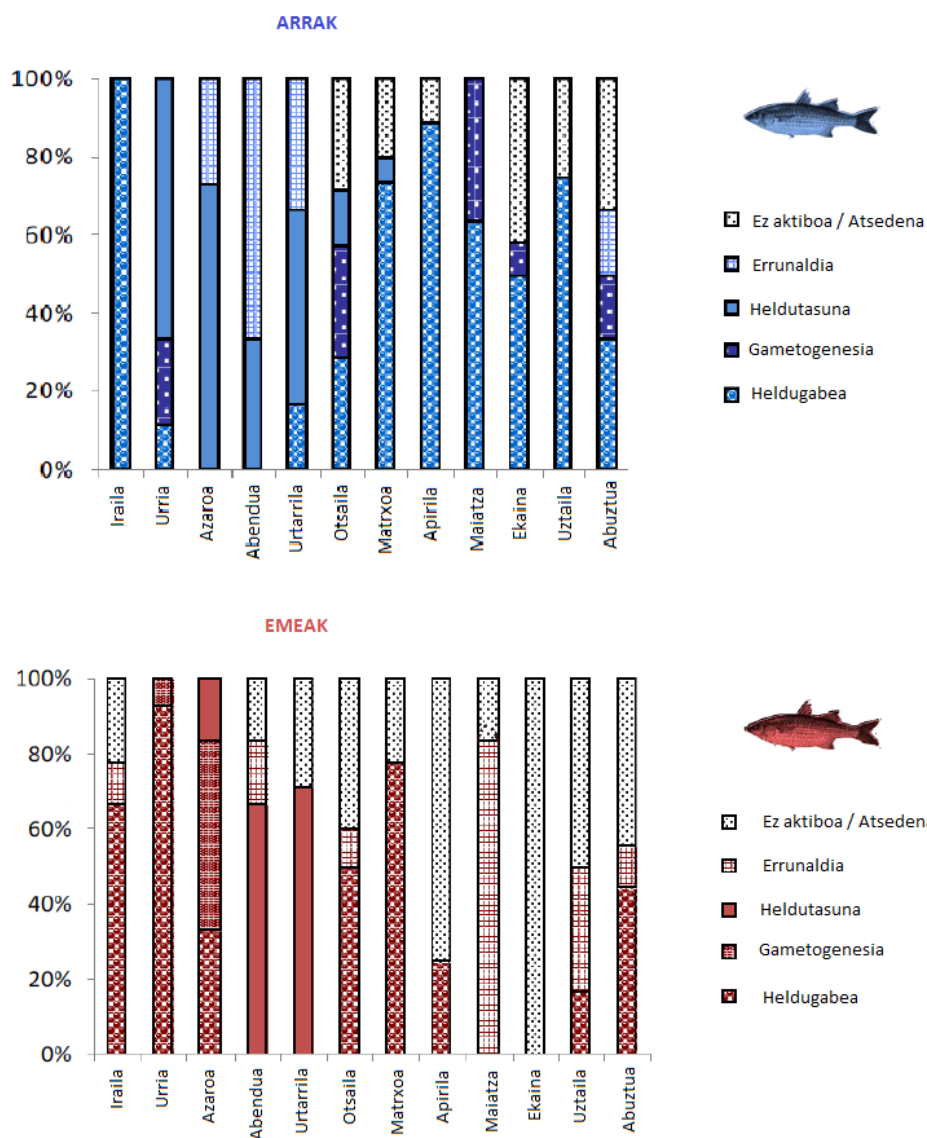
Morfologiari dagokionez, gorputz luzea eta zilindrikoa dauka eta oro har, 60 cm-ko luzera arte hazi daiteke, nahiz eta 75cm-koak ere aurkitu diren. Buru zapala eta handia dauka eta goiko ezpaina nahiko handia du. Gainera, gorputz osoa inguruaren arabera aldatu daitezkeen gris-zilar koloreko ezkatatz estalita du. **2. Irudian** ikusi daitekeenez, bi hegats dorsak ditu, lehenengoak lau arantza zurrun ditu, bigarrenak ordea, arantza zurrun bat eta beste zortzi bigun. Bukaerako hegatsak hiru arantza zurrun eta bederatzia arantza bigun ditu. Horretaz gain, hesteko sei itsu ditu, denak tamaina berekoak. Ezaugarri hauek guztiek, *Chelon labrosus* beste espezieengatik desberdintzeko balio dute.



2. Irudia: *Chelon labrosus* heldua. (http://www.magrama.gob.es/fr/pesca/ficha_esp.asp?id=293)

Animalia hau, obiparoa da eta neguan zehar ugaltzen da, azaroa eta apirila bitartean. Lazunak ez du dimorfismo sexualik aurkezten, horregatik, gonadaren azterketa histologikoa egin behar da lazun emeak eta arrak desberdintzeko. Gonada arrak, zein emeak, sasoiaren arabera aldatzen diren 5 fase gametogeniko desberdin dituela ikusi da (**1. Taula**). Hasteko, iraila eta azaroa bitartean gametogenesisia gertatzen da. Gero, abendua eta urtarrila bitartean gonadak fase heldura iristen dira eta lazun helduak itsasoan barrena joaten dira arrautzak errutera, beti ere, eskualde pelagikoan. Azkenik, maiatza eta abuztua bitartean, gonadak atsedean fasean daude, uda amaierarako aldiz, ziklo gametogeniko berria hasten da (**3. Irudia**).

Bi sexuetan garapen gametogenikoa sinkronikoki gertatzen dela ikusi da, nahiz eta, arrak heldutasunera emeak baino lehenago heltzen diren. Arrek heldutasun sexuala jaio eta 2 urtetara lortzen dute, emeak aldiz, jaio eta hirugarren urtera arte ez dira ugaltzeko gai (McDonough et al., 2005).



3. Irudia: Euskal kostaldean Bizarro et al. (2012) *Chelon labrosus*-entzat hilabete bakoitzean aurkitutako indibiduen fase gametogenikoen banaketaren deskribapena (2010-2011 urteetan). Goiko grafikoan arren datuak urdinez agertzen dira eta beheko grafikoan emeenak gorriz.

1 Taula: *Chelon labrosus* lazunetan ikertutako gonaden fase gametogenikoen deskribapena ((Bizarro et al., 2012)-tik moldatua).

Fase gametogenikoa	Arrak	Emeak
I. Heldugabea	Testikulu ez-aktiboak, espermatozitoen garapen eskasa. Espermatogonien presentzia handia eta espermatozito gutxi.	Obario ez-aktiboa obozito aurre-bitelogenikoekin. Obarioaren horma oso mehea da.
II. Gametogenesisia	Espermatozito primario eta sekundarioen presentzia eta espermatogonia nahikoa.	Obozito bitelogenikoak behatu daitezke.
III. Heldutasuna	Hodi seminiferoetan espermatozito primarioak eta sekundarioak garatzen ari dira. Espermatidak eta espermatozito helduak behatzen dira.	Obozitoak bitelo tantaz beterik agertzen dira. Obozito asko hidratatuta aurkitzen dira.
IV. Errunaldia / Atresia	Hodi seminiferoak handituta agertzen dira espermatozoide helduez beteta. Atresia egoeran, tubuluak erdi hutsik agertzen dira.	Obozitoen hiru laurdenek atresia azaltzen dute eta horma irregularrak eta amorfoak dituzte.
V. Ez-aktiboa / Atsedena	Espermatozoide gutxi. Periferian espermatogonia batzuk agertzen dira.	Gonada heldugabearen antza. Baina kasu honetan, obozitoak tamainaz handiagoak dira eta obarioen horma lodia da.

2.2. TRANSKRIPTOMIKA

Transkriptomikaren bidez, ehun edo zelula zehatz batean eta momentu zehatz batean dagoen mRNA azter daiteke. Horrela, zelula batean edo zelula multzo batean transkribatzen ari diren geneen gaineko informazioa lor daiteke.

Ingurunean gertatzen diren aldaketei aurre egiteko, izaki bizidunek geneen transkripzioa aldatzeko gaitasuna dute. Hori dela eta, esate baterako, ingurunera askatzen diren kutsatzaileek eragin zuzena dute ekosistema horretan aurkitzen diren organismoetan, zehatzago esanda, konposatu horiek eragin zuzena izango dute geneen transkripzioan. Beraz, kutsatzaile baten pean gertatzen den lehen aldaketa, gene mailan ematen da, eta ondoren aldaketa fisiologiko eta organismikoak emango dira. (Snape et al., 2004; Fent eta Sumpter, 2011).

Eragile zitotoxiko baten aurrean lehenengo induzitzen diren geneak, egokitzapenerako geneak (adibidez, metalotioneinak edota bero-talka proteinak) dira eta kutsatzaileen aurrean babesteko erabiltzen dira. Kutsatzailearen dosia handitzen bada edo esposizioa denboran luzatzen bada, organismoek gene berriak aktibatuko dituzte, galdutako oinarrizko bide metabolikoak ordezkatu ahal izateko. Baina kutsatzailearen presentzia kronikoa bihurtzen bada, geneen espresioak aldatuz jarraituko du. Azkenean organismoak ezingo du homeostasia mantendu eta hil egingo da (Denslow et al., 2007). Ondorioz, kutsatzaile baten akzio-mekanismoa ezagutzeko moldatze geneak eta konpentsatze geneak ikertzea garrantzitsua da. Transkriptomikak, gene horien ikerketa baldintza desberdinen pean egin ahal izatea ahalbidetzen du.

Transkriptomikak eskaintzen du (Bourlat et al., 2013):

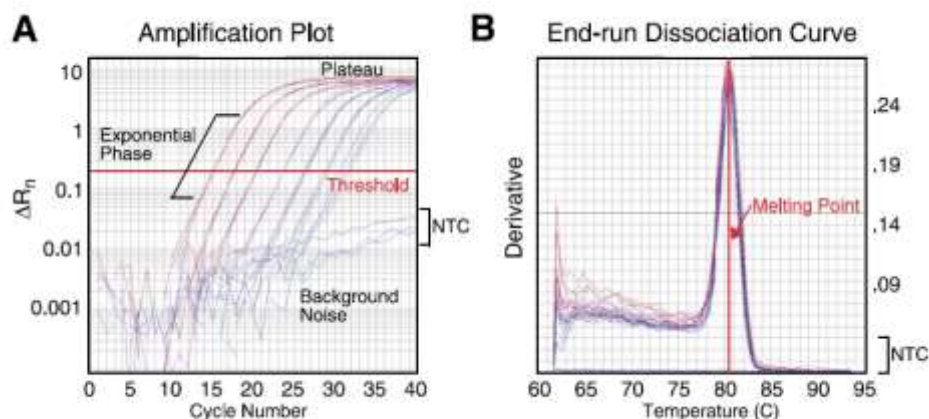
1. Abisu goiztiarrerako biomarkatzaile molekular berriak aurkitu ahal izatea, horrela etorkizunean kutsatzaile batek izan ditzakeen efektuak iragarri litezke.
2. Kutsatzaileen edo estres eragileen akzio-mekanismoen aurkikuntza
3. Lortutako akzio-mekanismoen informazioa beste emaitza batzuekin integratu ahal izatea, kutsatzaileak ekosistema oso batean izan dezakeen eragina aztertzeko eta ez soilik organismo edo espezie isolatueta.
4. Geneek eragile zitotoxikoen aurrean jarraitzen duten espresio-profila deskribatu ahal izatea.

Hortaz, kutsatzaile baten ondorioz zein beste faktore fisiko-kimikoek eraginda, zelula mailan detektagarriak diren lehenengo aldaketak mRNA mailan izaten dira. Hori dela eta, mRNA-n ematen diren aldaketak aztertzeko teknika berrien garapenean interes handia dago. Orain arte gehien erabili diren teknikak, besteak beste, microarray-ak eta denbora errealeko PCR kuantitatiboa (qRT-PCR) izan dira.

2.2.1. Denbora errealeko PCR kuantitatiboa (qRT-PCR)

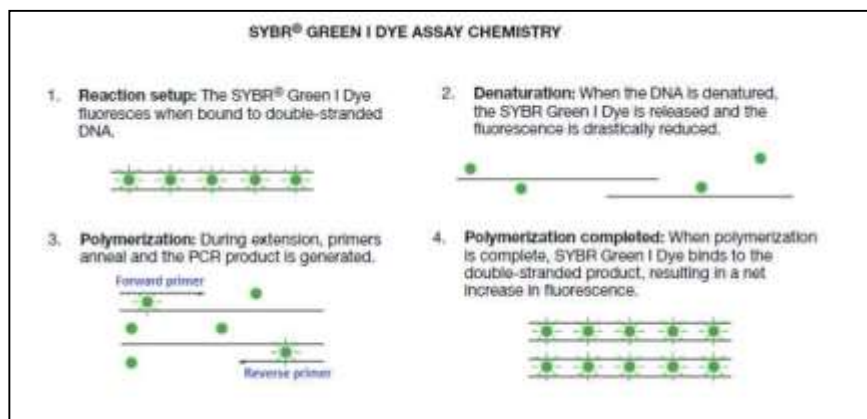
qRT-PCRren teknika DNA itu jakin baten nukleotido sekuentzia amplifikatu eta kuantifikatzeko garatu da. Metodo hau PCR arruntean oinarritzen da baina erreaktibo fluoreszente baten erabilera gehitu du. Era honetan, sekuentziaren amplifikazioarekin batera fluoreszentzia igortzen du eta atari mailara heltzeko behar dituen zikloen arabera hasierako itu sekuentzia kantitatea kuantifikatzen du (VanGuilder et al., 2008).

PCR arrunt batean, lagin guztiak meseta fasera heltzen direnean neurtzen dira. Honek, fidagarritasun baxua du, izan ere, fase esponontzial desberdina duten laginak meseta fasera elkarrekin heltzea gerta daiteke eta alderantziz, fase esponontzial berdina izanik meseta fasera batera ez heltzea. Gainera, emaitzak aztertzeko agarosazko gelak eta etidio bromuroa erabili behar dira, azken hau, mutagenikoa delarik. PCR arruntak dituen desabantaila guzti hauek egiten dute qRT-PCR hain erabilgarria. Metodo honen bidez amplifikazioaren fase esponontziala kuantifikatu daiteke, fase hau, amplifikazioaren faserik fidagarriena delarik. Horrela lagin batetik bestera dagoen desberdintasuna zehaztasunez azter daiteke. Horretaz gain, sortzen den disoziazio-kurbari esker, PCR erreakzioan produktu bakarra eratu dela ziurtatu daiteke. Disoziazio-kurban tontor bat baino gehiago agertzen bada, PCR produktu bat baino gehiago dagoela adierazten ari da (**4. Irudia**). Hori dela eta, qRT-PCRa oso erabilia da geneen espresio-profilak aztertzeko (Wittewer et al., 1997; Valasek eta Repa, 2005)



4. Irudia: Denbora errealeko PCR baten emaitza arruntak (Valasek eta Repa, 2005). A: Anplifikazioaren grafikoa, fluoreszentzia maila zikloekin, Ct, (X ardatza) handitzen dela ikusten da. Y ardatzean igorritako seinalearen normalizazioa agertzen da. Lerro gorriak (threshold) PCRaren fase esponenzialaren hasiera lagin bakoitzerako adierazten du. B: Disoziazio-kurbaren grafikoa. Tontor bakarra ikusten denez, anplifikazio-produktu bakarra dagoela ziurtatzen da. DNA gabeko kontrol bat gehitu behar da (NTC: non-template control) hasle dimeroak anplifikatzen ez direla ziurtatzeko.

Teknika hau aurrera eramateko fluoroforo desberdinak erabili daitezke, baina gehien erabiltzen dena SYBR Green I da. Metodo honen bidezko kuantifikazioak, zunden bidezkoak baino sinpleagoak eta merkeagoak direlako (Ponchel et al., 2003). SYBR Green I fluoroforoa, helize bikoitzeko DNAn (dsDNA) tartekatzen da eta igortzen duen fluoreszentzia libre dagoenean baino 1000 aldiz handiagoa da (**5. Irudia**). Fluoroforo hau, dsDNArekin asoziatzen denean 480nm-ko uhin luzera duen argia xurgatzen du eta 520nm-ko uhin luzeran igortzen du (Valasek eta Repa, 2005). Oro har, zenbat eta dsDNA gehiago egon orduan eta fluoreszentzia handiagoa igorriko du. SYBR Green I-a ez da itu sekuentziarekiko espezifikoa eta sortzen diren dsDNA produktu guztiekin lotzen da, beraz, hasleen dimeroak sortzen badira arazoak egon daitezke igorritako fluoreszentzia neurtzerakoan. Horregatik, disoziazio-kurbaren bidez dimero hauen presentzia detektatu daiteke, eta PCR baldintzak optimizatuz, hasle dimeroen sorrera ekidin (Ponchel et al., 2003).



5. Irudia: SYBR Green I metodoaren azalpen eskematikoa. (Gene Expression Guide, Applied Biosystems).

2.3. ERREFERENTZIA GENEAK

Geneen transkripzio mailak aztertzen direnean, hauen espresioaren normalizazioa egiteko beharra dago. (Dheda et al., 2005; Arukwe, 2006) Normalizazio prozesuan, metabolismo orokorreko geneak erabiltzen dira, hau da, erreferentzia geneak edo housekeeping geneak. Gene hauek, zelularen oinarritzko funtzioak garatzeko beharrezkoak diren geneak dira eta zelula guztietan konstitutiboki adierazi ohi dira.

Normalean, toxikologia arloan gene baten espresioaren kuantifikazio erlatibo zein absolutua egiteko, qRT-PCRa egin ondoren, $2^{-\Delta\Delta C_t}$ metodoa erabiltzen da (Livak eta Schmittgen, 2001). Metodo honen arabera itu genearen espresioa aztertzen da baldintza normaletan zein eragile baten pean (kutsatzailea adibidez). Lortzen diren Ct amplifikazio balioak, metodo berdinen bidez neurtutako erreferentzia gene baten espresioarekiko normalizatzen dira eta horrela baldintza desberdinetan itu geneak duen espresioa konparagarri bihurtzen da (Pfaffl et al., 2004).

Orain arte, baieztapen hau onartu bada ere, azken aldian zalantzan jartzen ari da (Arukwe, 2006). Izan ere, erreferentzia geneen espresioa aldatu egiten da egoera esperimentalen arabera, ehun motaren arabera, garapen fasearen arabera edota zelula zikloaren arabera. Ondorioz, erreferentzia genearen espresioaren aldaketa honek, aztergai den itu genearen interpretazio okerra eman dezake (Dheda et al., 2005). Hori dela eta, azken urte hauetan, beste metodo batzuk garatzen ari dira geneen transkripzioa maila normalizatzeko, esaterako, QuanT-it OliGreen metodoa.

2.3.1. Aztertuko diren erreferentzia geneak

Orain arte, *Chelon labrosus* lazunean gehien erabili diren erreferentzia geneen artean, β -aktina (ACTB), 18S RNA erribosomikoa (18S rRNA), eta 1- α elongazio faktorearen (EF-1- α) espresioa aztertuko da (Diaz de Cerio et al., 2012; Bizarro et al., 2014). Gene hauetaz gain, lan honetan glizeraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) eta TATA kutxa lotura proteinaren (TBP) espresio-profilak ere, aztertuko dira.

2.3.1.1. β -Aktina (ACTB)

Aktina zelulen zitoeskeletoaren osagai garrantzitsuenetako bat da, zelularen biziraupenerako beharrezkoak diren prozesu gehienetan parte hartzen baitu, besteak beste; zelularen migrazioan, zelularen zatiketan, eta gene-espresioaren erregulazioan. Zelularen beharrianen arabera, aktinazko piruak oso azkar mihiztatu ala desantolatu daitezke. Ornodunetan oso kontserbatuta dauden sei aktina isoforma ezagutzen dira. (Rubenstein, 1990). Hauetatik lau, muskulu leunean eta eskeletikoan espresatzen dira gehien bat. Beste biak ordea, β -aktina eta γ -aktina, aktina zitoplasmaticoak dira eta nonahi espresatzen dira (Otey et al., 1986; Hooek et al., 1991). Hori dela eta, β -aktina erreferentzia gene giza erabili ohi da, nahiz eta ingurune baldintzen arabera, gene honen transkripzio maila *Chelon labrosus* lazunean aldatzen dela ikusi den (Bilbao et al., 2010).

2.3.1.2. 18S RNA erribosomikoa (18S rRNA)

Erribosomak zelula guztietan dauden erriboproteina globularrez eta RNA erribosomikoz (rRNA) osaturiko egiturak dira eta proteinen sintesiaz arduratzen dira. Erribosoma eukariotikoak 80S erribosomak dira eta bi azpiunitatez osatuta daude; azpiunitate handia (60S) eta azpiunitate txikia (40S). Alde batetik, 60S azpiunitatea, hiru rRNAz (5S, 5.8S eta 28S) eta 46 erriboproteinaz osatuta dago. Bestetik, 40S azpiunitatea, 18S rRNAz eta 33 erriboproteinaz osatuta dago (Nelson eta Cox, 2005). Zeluletan proteinen sintesia konstitutiboki gertatzen denez 18S rRNA kodetzen duen genea, erreferentzia gene bezala oso erabilia da, esaterako, *Chelon labrosus*en molekula mailako analisiak burutzeko (Raingeard et al., 2006; Puy-Azurmendi et al., 2013). Nahiz eta zenbait baldintza pean traskripzio-profila aldatzen den (Bizarro et al., 2014).

2.3.1.3. 1- α elongazio faktorea (EF-1- α)

Elongazio faktoreek proteinen sintesirako behar diren proteinen taldea osatzen dute. Proteina hauen funtzio nagusia erribosoman gertatzen den proteinen luzapena erraztea da. Eukariotoetan bi elongazio faktore bereizten dira eEF-1 eta eEF-2. Lehenengo elongazio faktorea bi azpiunitatez osatuta dago, α eta $\beta\gamma$ eta erribosoman tRNAREN sarrera kontrolatzen du. Bigarren elongazio faktoreak tRNAtik mRNAra translokazioa katalizatzen du (Nelson eta Cox, 2005). Beraz, EF-1- α oso erabilia da erreferentzia gene bezala, baita *Chelon labrosus*en (Raingeard et al., 2006).

2.3.1.4. Glizeraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH)

Glizeraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) glukolisiko seigarren erreakzioa katalizatzen duen entzima bat da. Glukosa molekulak katabolizatzen ditu energia eta karbono molekulak lortzeko. Funtzio honetaz gain, zelula barruan beste hainbat funtzio ez-metaboliko dituela ikusi da, transkripzioaren aktibazioan edo apoptosiaren hasieran adibidez (Nelson eta Cox, 2005). Hau dela eta, ornodunetan oso erabilia da erreferentzia gene moduan, nahiz eta lazunean oraindik erabili ez den.

2.3.1.5. TATA kutxa lotura proteina (TBP)

TATA lotura proteina, DNAREN TATA sekuentziarekin espezifikoki lotzen den transkripzio faktore bat da. Sekuentzia hau geneen eskualde sustatzailean egoten da geneen transkripzio gunetik hurbil. TBPk, beste proteina batzuekin batera, TFIID konplexua eratzen du, eta konplexu hau beharrezkoa da RNA polimerasa II-ren posizionamendu zuzena bermatzeko (Nelson eta Cox, 2005). Horregatik ornodunetan asko erabiltzen da erreferentzia gene moduan, baina, *Chelon labrosus* espeziean oraindik ez da ikertu.

2.3.2. QuanT-iT OliGreen ssDNA metodoa

QuanT-iT OliGreen ssDNA metodoaren oinarria, oligonukleotido eta DNA harizpi bakarrera (ssDNA) lotzen den fluorokromo ultrasentikorra da. Metodo honen bidez soluzioan dauden oligonukleotidoak eta ssDNA sekuentziak kuantifikatu daitezke. Gainera, oso sentikorra denez 100 pg/mL baino kontzentrazio baxuagoan dauden laginak neurtu daitezke. Metodo honi esker qRT-PCR-a egiteko erabili den cDNA kontzentrazio zehatza kalkula daiteke eta emaitza hauek itu genearen espresioaren normalizazioa egiteko erabili.

3. HIPOTESIA

Chelon labrosus lazunaren gonadan, erreferentzia geneen espresio-profila urte sasoiaren arabera aldatzen da.

4. HELBURUAK

Chelon labrosus lazunean erabiltzen diren erreferentzia gene desberdinen espresio-profila aztertzearen asmoarekin, honako helburu hauek proposatu dira:

1. Bibliografia espezializatuan oinarrituriko bilaketa bat egitea erreferentzia gene kandidatu erabilienak aukeratzeko
2. Urte sasoiaren arabeko garapen fase desberdinetan dauden lazunen gonadetatik RNA erazte eta cDNA sintetizatzea
3. Erreferentzia geneen transkripzio mailak aztertzea lazunen gonadetan qRT-PCR bitartez
4. Azterketa estatistikoen bitartez egonkorren adierazten diren geneak housekeeping moduan aukeratzeko

5. MATERIALAK ETA METODOAK

5.1. LAGINAK

Lan honetan erabilitako gonadak, 2010ko irailetik 2011ko irailera bitartean arrantzatu ziren lazunenak (*Chelon labrosus*) izan dira. Lazunak, Pasaia-Trintxerpeko amarralekuan arrantzatu ziren. Hilabetero 12 eta 30 lazun bitartean arrantzatu ziren kainabera erabiliz. Lazunak *in situ* prozesatu ziren.

Estatu mailan eta Europa mailan ezarritako araudia (Azaroaren 7ko legea 32/2007; Zuzendaritza 2010/63/UE) jarraitu zen arrantzatutako lazunei ahalik eta kalte gutxien eragiteko. Horretaz gain, prozedura osoak, UPV/EHUko Animalien Ongizaterako Etika Batzordearen (AOEB) onarpena izan zuen (CEBA/152/2010/ORTIZ ZARRAGOITIA). Lazunak anesthesiatu egin ziren benzokainatan saturatuta zegoen ur soluzio batean murgilduz, eta jarraian, burua moztuz, sakrifikatu ziren. Gonadak, osorik isolatu ondoren, pisatu eta zatitu egin ziren. Gonadaren zati bat RNAlater-dun (Life Technologies) ontzi batean sartu zen eta zuzenean nitrogeno likidotan izoztu zen. Laborategian, laginak -80°C-tara gorde ziren analizatu arte. Beste gonadaren zati bat, analisi histologikoak egiteko fixatu zen, lazun bakoitzaren sexua eta fase gametogenikoa zehaztu ahal izateko.

5.1.1. Erabilitako laginak

Erreferentzia geneen transkripzio mailaren neurketa burutzeko, 88 lazunen (41 eme eta 47 ar) gonadetatik erauzitako RNAREN gainean ekoiztutako cDNA erabili zen. Lazunak, sexuaren arabera eta fase gametogenikoaren arabera sailkatu ondoren taldekatu ziren (**2. Taula**).

2.Taula: Sexua eta fase gametogenikoaren arabera sailkatutako lagin kopurua.

FASEA	LAGIN KOPURUA	
	EMEAK	ARRAK
I	9	9
II	8	10
III	9	9
IV	5	10
V	10	9
GUZTIRA	41	47

5.1.2. RNA erauzketa eta cDNAREN sintesia

Laginak TRIzol-etan (Life Technologies) homogenizatu ziren Hybaid Ribolyser (Hybaid, Ashford, UK) homogenizatzailea erabiliz. Homogenizatua eppendorf berri batera igaro zen eta 200µL kloroformo gehitu ziren, 1200rpm eta 4°C-tara zentrifugatu aurretik. Era honetan, proteinak, DNA eta RNA banatu ziren. Gainjalkina RNAREN erauzketarako zutabe batera (RNeasy kit, Ambion) pasatu zen.

Kit-aren protokoloa jarraituz, lagin bakoitzeko RNA totala isolatu zen. Lagin bakoitzeko 1µg/µL RNA erabili zen cDNAREN sintesia egiteko SuperScript First Strand Synthesis (Life Technologies) kitaren protokoloa jarraituz

Lan honen abiapuntua -40°C-tan gordetako cDNA laginak izan dira, aurreko pausuak burutuak egon baitira.

5.2. ITU SEKUENTZIEN LORPENA

Erreferentzia gene bakoitzaren transkripzio maila kuantifikatzeko denbora errealeko PCRa (qRT-PCR) erabili da. β -aktina (GenBank Accesion n^o: AY836368), EF-1- α (GenBank Accesion n^o: AY836369) eta 18S rRNA (GenBank Accesion n^o: AY825252) geneen sekuentzia eta qRT-PCR bidez hauek amplifikatzeko beharrezkoak diren hasleak ezagunak ziren. GAPDH eta TBP geneen sekuentzia ordea eskuratu beharra zegoen. Horretarako, NCBI-n (National Center for Biotechnology Information) lazunarekin erlazio filogenetiko hurbila (Percomorpha) duten espezieen GAPDH eta TBP geneen sekuentziak bilatu ziren. ClustalW2 programa informatikoa erabiliz gene bakoitzaren sekuentziak lerrokatu ziren gene bakoitzaren sekuentzia kontserbakorrak aurkitzeko.

5.2.1. Glizeraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH)

Erreferentzia gene honen sekuentzia amplifikatzeko hasle andeatuak diseinatu ziren, honako espezie hauek erabiliz: (1) *Dicentrarchus labrax* (Accesion n^o: AY863148.1), (2) *Kryptolebias marmoratus* (Accesion n^o: FJ438822.1), (3) *Oreochromis niloticus* (Accesion n^o: JN381952.1), (4) *Platichthys flesus* (Accesion n^o: AJ937522.1) eta (5) *Takifugu rubripes* (Accesion n^o: AB704200.1). Sekuentzia hauek lerrokatuz 4 hasle bikote diseinatu ziren (**1. Eranskina**) eta **3. Taulan** ezarritakoaren arabera burutu ziren PCRak.

PCR bidez sekuentziak amplifikatu ondoren, aplikoi produktu bakarra lortu zeneko kasuetan, PCR produktua UPV/EHUko Sekuentziazio eta Genotipo Azterketen Unitatea SGiker zerbitzura bidali zen. Lortu ziren sekuentzia berriak NCBI-ko datu baseetako sekuentziekin konparatu ziren Blastn bidez. ClustalW2 programa erabiliz, arrainaren sekuentziak lerrokatu ziren (**2.Eranskina**) eta qRT-PCRan erabiltzeko *C. labrosus*en GAPDH genearekiko espezifikokoak ziren bi hasle diseinatu ziren (**8. Taula**).

3. Taula: *Chelon labrosus* GAPDH sekuentzia amplifikatzeko erabilitako hasle andeatuak eta PCR baldintzak. PCR guztiek hasierako 94°C eta 2 min-ko pausua eta amaierako 72°C eta 8 min-ko pausua izan zituzten. D: Desnaturalizazioa. H: Hibridazioa. L: Luzapena

	Hasle andeatuak	Anplikoiairen tamaina (bp)	PCR baldintzak (35 ziklo)
A	Fw1: (5') CAT TGA CCT GSA GTA CAT GG (3')	550	D: 94°C, 45s
	Rv2: (5') AGC RCC AGC ATC AAA GAT GG (3')		H: 55°C, 45s L: 72°C, 60s
B	Fw2: (5') CAT TGA CCT GSA GTA CAT GG (3')	350	D: 94°C, 45s
	Rv2: (5') TGA CYT TGC CSA CTG CCT AC (3')		H: 55°C, 45s L: 72°C, 45s
C	Fw1: (5') TYG AGA AGG CCT CYK CTC AC (3')	800	D: 94°C, 45s
	Rv1: (5') TGA CYT TGC CSA CTG CCT AC (3')		H: 55°C, 45s L: 72°C, 45s
D	Fw2: (5') TYG AGA AGG CCT CYK CTC AC (3')	600	D: 94°C, 45s
	Rv1: (5') AGC RCC AGC ATC AAA GAT GG (3')		H: 55°C, 45s L: 72°C, 60s

5.2.2. TATA kutxa lotura proteina (TBP)

TBP genea amplifikatzeko hasle andeatuak diseinatu ziren, horretarako honako espezieak erabili ziren: (1) *Oreochromis mossambicus* (Accesion n°: FN673692.1), (2) *Oryzias latipes* (Accesion n°: NM001278855.1) eta (3) *Takifugu rubripes* (Accesion n°: NM001099794.1). Sekuentzia hauek lerrotatuz 4 hasle andeatu bikote diseinatu ziren (**3. Eranskina**) eta zenbait PCR saio egin ziren.

Lehenengo saioan burututako PCR baldintzak **4. taulan** azaltzen dira. Bigarren saio batean, A eta B hasle bikoteentzako hibridazio (H) tenperatura 55°C-tara jaitsi eta luzapen (L) denbora 60s-ra igo zen. C eta D hasle bikoteen kasuan hibridazio tenperatura 54°C-tan jarri zen.

4.Taula: *Chelon labrosus*en TBP genearen amplifikaziorako diseinatutako hasle andeatuak eta lehenengo PCR saiorako baldintzak. PCR guztiek hasierako 94°C eta 2 min-ko pausua eta amaierako 72°C eta 8 min-ko pausua izan zituzten. D: Desnaturalizazioa. H: Hibridazioa. L: Luzapena.

	Hasle andeatuak	Anplikoia- ren tamaina (bp)	PCR baldintzak (35 ziklo)
A	Fw1: (5') TAC TGG AGG ARC AGC AGA GG (3')	600	D: 94°C, 45s
	Rv1: (5') GYT CRT AGC TGC TRA ACT GC (3')		H: 56°C, 45s
			L: 72°C, 45s
B	Fw1: (5') TAC TGG AGG ARC AGC AGA GG (3')	500	D: 94°C, 45s
	Rv2: (5') GGA AAM CCR AGC TTY TGC AC (3')		H: 56°C, 45s
			L: 72°C, 45s
C	Fw2: (5') GAR ASC TCT GGS ATH GTA CC (3')	350	D: 94°C, 45s
	Rv2: (5') GGA AAM CCR AGC TTY TGC AC (3')		H: 55°C, 45s
			L: 72°C, 45s
D	Fw2: (5') GAR ASC TCT GGS ATH GTA CC (3')	250	D: 94°C, 45s
	Rv1: (5') GYT CRT AGC TGC TRA ACT GC (3')		H: 55°C, 45s
			L: 72°C, 45s

Hirugarren saio bat egin zen, A eta B hasle bikoteak soilik errepikatuz; PCR zikloak 37°C-ra luzatu ziren, hibridazio (H) tenperatura 54°C-ra jaitsi eta luzapen (L) denbora 60s-tan mantendu zen. Azkenik, laugarren saiorako bost hasle andeatu bikote berri diseinatu ziren (**4. Eranskina**) eta hasle bikote bakoitzerako PCR baldintzak ezarri ziren (**5. Taula**). Anplikoi produktu bakarra lortu zeneko kasuetan, PCR produktua sekuentziatzera bidali zen.

5. Taula: TBP genearen amplifikaziorako diseinatutako bigarren hasle andeatuen sekuentziak eta laugarren saioan erabilitako PCR baldintzak. PCR guztiek hasierako 94°C eta 2 min-ko pausua eta amaierako 72°C eta 8 min-ko pausua izan zituzten. D: Desnaturalizazioa. H: Hibridazioa. L: Luzapena.

	Hasle andeatuak	Anplikoiairen tamaina (bp)	PCR baldintzak (35 ziklo)
A	Fw1: (5') CATACTGGAGGARCAGCAGMGRCA(3') Rv1: (5')CWGCTAACCTVGACTGRTCCTCAC(3')	430	D: 94°C, 45s H: 61°C, 45s L: 72°C, 45s
B	Fw1: (5')CATACTGGAGGARCAGCAGMGRCA(3') Rv2: (5')JTTGTAGCTGRGGTACHATVCCAG(3')	230	D: 94°C, 45s H: 59°C, 45s L: 72°C, 45s
C	Fw1: (5')CATACTGGAGGARCAGCAGMGRCA(3') Rv3: (5')TCGTATTCTCATYATGACNCGAGC(3')	340	D: 94°C, 45s H: 59°C, 45s L: 72°C, 45s
D	Fw2: (5')CTGGVATHGTACCRCAGCTACAAA(3') Rv1: (5')CWGCTAACCTVGACTGRTCCTCAC(3')	200	D: 94°C, 45s H: 59°C, 45s L: 72°C, 45s
E	Fw2: (5')CTGGVATHGTACCRCAGCTACAAA(3') Rv3: (5')TCGTATTCTCATYATGACNCGAGC(3')	100	D: 94°C, 45s H: 59°C, 45s L: 72°C, 45s

Gene bakoitzaren amplifikazioa burutzeko PCR medioari (**6. Taula**) (Life Technologies) 2 µL cDNA gehitu zitzaizkion. Erreplika bakoitza egiteko lazun desberdinen gibeletik zetorren cDNA erabili zen.

6..Taula: PCR medioa prestatzeko erabilitako osagaiak eta berauen kontzentrazioa

OSAGIAK	KONTZENTRAZIOA	BOLUMENA
<i>H₂O</i>	55nM	41,6 µL
Buffer	10X	5 µL
<i>MgCl₂</i>	50 mM	1,5 µL
dNTP	10 mM	1 µL
Fw	10 µM	0,2 µL
Rw	10 µM	0,2 µL
<i>T_{aq}</i>	5 U/ µL	0,5 µL
GUZTIRA:		48 µL

PCR guztien produktuak %1.5 agarosadun geletan migratu ziren eta behaketarako, etidio bromuroa erabili zen. Argi ultramoredun (UV) kamara batean gelean zegoen DNA banaketa ikusi zen.

5.3. qRT-PCR BIDEZKO ITU GENEEN TRANSKRIPZIO MAILEN NEURKETA

Itu geneen transkripzio mailaren neurketa burutzeko 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) termozikldorean 96 putzudun plakak erabili ziren. Lagin bakoitzeko 3 erreplika aztertu ziren eta erreplika bakoitzean 2µL lagin (**7. Taula**) eta 18 µL PCR medio sartu ziren. Medioaren osagaiak honako hauek izan ziren; RNasa gabeko H₂O, SYBR Green I (Roche) eta hasleak (**8. Taula**). Gene bakoitza aztertzeko erabili ziren hasleak berdinak ziren eme zein arretan, baina, sexuaren arabera, hasleok erabiltzeko baldintzak aldatu behar izan ziren (**7. eta 8.Taulak**).

Anplifikazioa eta disoziazioa burutzeko erabili ziren baldintzak honakoak izan ziren; (1) ziklo bat; 2 min eta 50°C, (2) ziklo bat; 10 min eta 95°C, (3) 40 ziklo; 15 seg eta 95°C, (4) ziklo bat; 2 min eta tenperatura hasle bikoteen arabera (8 .Taula), (5) ziklo bat, 1 min eta 95°C, disoziazioa hasten da, (6) ziklo bat; 1 min eta 60°C, (7) ziklo bat; 15 seg eta 95°C eta bukatzeko (8) ziklo bat; 15 seg eta 60°C.

qRT-PCRa egin ondoren lagin bakoitzaren batz besteko Ct balioa lortu zen. Kalkuluak egiteko balioak zuzendu ziren. Balio bakoitzari efizientzia totalaren zuzenketa faktorea aplikatu zitzaion (Livak eta Schmittgen, 2001). Era honetan, itu genearen balio zuzenduak erreferentzia genearen balioekin zatituzkoan itu genearen transkripzio balioak lortu ziren.

$$E_T^{-\Delta Ct}(\text{Itu genea})/E_T^{-\Delta Ct}(\text{erreferentzia genea}) \quad (1)$$

Non,

E_T : Efizientzia totala

ΔCt : lagin bakoitzaren batz bestekoa

7. Taula: Gene bakoitzaren qRT-PCR bidezko anplifikaziorako ezarri diren lan-baldintzak.(Kontz.= kontzentrazioa)

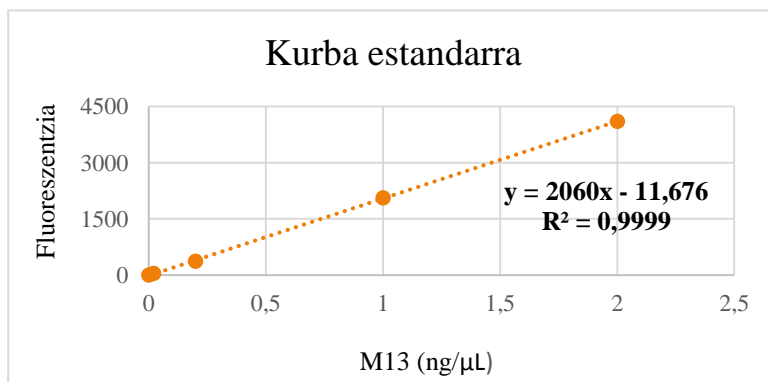
GENEAK	EMEAK		ARRAK	
	Hasleen kontz. (pmol)	Laginaren diluzioa	Hasleen kontz. (pmol)	Laginaren diluzioa
β-aktina	25	1/2000	12,5	1/5000
EF-1-α	25	1/200	12,5	1/500
18S rRNA	50	1/200	12,5	1/500
GAPDH	12,5	1/200	12,5	1/50

8. Taula: qRT-PCRak burutzeko erabilitako hasle espezifikoak. Esperotako aplikoiaren tamaina eta erabilitako hibridazio tenperaturak.

GENEA	HASLEAK	TM (°C)	ANPLIKOIA (bp)
β-aktina	Fw:(5')AGCCAACAGGGAGAAGATGA (3') Rv:(5')GAGCGTAGCCCTCGTAGATG (3')	56	173
EF-1-α	Fw:(5')CAGGGATTTTCATCAAGAACA(3') Rv:(5')GTCCATCTTGTGACACCA(3')	53	184
18S rRNA	Fw:(5')GAGGCCCTGTTAATTGGAATGAG(3') Rv:(5') TAAGATACGCTATTGGAGCTGGAA(3')	56	115
GAPDH	Fw:(5') ACCCCACCAACATCAAATGG(3') Rv:(5')TGACAACCTTGAGGGAGTTG (3')	55	201

5.4. Quant-iT OliGreen

Quant-iT™ OliGreen® ssDNA Kit-aren (Life Technologies) protokoloa jarraituz qRT-PCRa burutzeko lagin bakoitzak zuen hasierako ssDNA kontzentrazioa determinatu zen. Neurketak, Synergy HT (Biotek) irakurlean eta 96 putzudun plaketan burutu ziren. Analisisetarako kurba estandarra M13arekin egin zen (**6. Irudia**). M13a 18 basez osatutako oligonukleotidoa da. Honela, lagin bakoitzak igorritako fluoreszentzia ezagututa ssDNA kontzentrazioa kalkulatu zen. qRT-PCR bidez lortutako lagin bakoitzaren $E_T^{-\Delta Ct}$ balioa, lagin horretan zegoen ssDNA kontzentrazioarekin zatituz, genearen transkripzio balioak lortu ziren.



6 Irudia: Quant-iT™ OliGreen® metodoaren bidez lortutako kurba estandarra.

5.5. ERABILITAKO ERRAMINTA INFORMATIKOAK

Lana burutzeko erabili diren erraminta informatiko desberdinen informazioa

9. Taulan adierazita dago.

9. Taula: Erabilitako Web orrialdeen helbidea, deskribapena erabilera eta egindako doikuntzen azalpena.

Web orrialdearen izena	Helbidea	Deskribapena	Erabilera
NCBI (BLAST)	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi	Programa informatiko bat da, sekuentzien arteko lerrokamenduak egiteko RNA, DNA eta proteina mailan.	Datu baseetako sekuentziak, PCR produktuetako anplioien sekuentziekin konparatzeko erabili da.
Pubmed	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed	Estatu Batuetako Medikuntza Liburutegi Nazionalak kudeatzen duen biomedikuntza arloko artikuluak biltzen dituen sistema.	Lana egiteko behar izan den informazioaren iturri nagusia.
ClustalW2	http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/	Programa informatiko bat da, sekuentzien arteko lerrokamenduak egiteko DNA eta proteina mailan.	Aztergai zeuden sekuentziak lerrokatzeko erabili da.

5.6. ESTADISTIKA

Gene bakoitzaren faseen Ct balioen aldakortasun koefizientea kalkulatu zen, ar zein emeetan. Lorturiko datuak SPSS.22 (SPSS Inc., Microsoft Co., Redmond, WA) erabiliz aztertu ziren. Taldeen arteko ezberdintasun estatistikoak ezartzeko Anova ez parametrikokoak burutu ziren, indibiduen artean zegoen aldakortasun zela eta. Lehenengo, KruskalWallis testa eta ondoren, Dunn-en post-hoc testa egin zen. Desberdintasun esanguratsua $p < 0,05$

$$\text{Aldakortasun koefizientea} = (\text{Ct-en Desvest/Ct media}) \times 100 \quad (2)$$

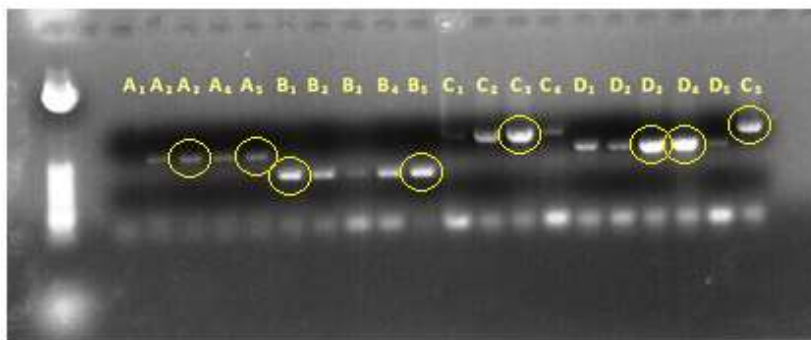
6. EMAITZAK

6.1. DISEINATUTAKO HASLEAK

6.1.1. Glizeraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH)

PCR bidez sekuentziak amplifikatu ondoren gel batean migratu ziren. Hasle bikote bakoitzak tamaina desberdineko sekuentzia bat amplifikatu zuen (**7. Irudia**). Bikote bakoitzaren bi erreplika sekuentziatu ziren eta lortu ziren sekuentzia berriak NCBI-ko datu baseetako sekuentziekin konparatu ziren Blastn bidez (**10. Taula**). Honi esker, hasle bikote bakoitzak amplifikatutako sekuentzien luzera zehatza jakitea lortu zen (**10. Taula, II. Zutabea**). Sekuentzia guztiek *O. fasciatus*-en GAPDH genearekin %93 baino antzekotasun handiagoa azaldu zuten. Gainera, kasu guztietan E balioa $1E^{-112}$ eta 0 bitartean zegoen.

- Esperotako aplikoiak: A: 550 bp, B: 350 bp, C: 800 bp eta D: 600 bp.
- Lortutako aplikoiak: A₃: 526 bp, A₅: 524 bp, B₁: 322 bp, B₅: 320 bp, C₃: 763 bp, C₅: 763 bp, D₃: 558 bp eta D₄: 563 bp.



7. Irudia: GAPDH genea amplifikatzeko burututako PCR saioaren emaitzak. A, B, C, eta D hasle bikote desberdinei dagokie eta zenbakiak hasle bikote bakoitzaren erreplika ezberdinei. Sekuentziazioa egiteko lagin bakoitzeko bi PCR produktu ezberdin aukeratu ziren (zirkuluekin adierazita): A₃: 526 bp, A₅: 524 bp, B₁: 322 bp, B₅: 320 bp, C₃: 763 bp, C₅: 763 bp, D₃: 558 bp eta D₄: 563 bp.

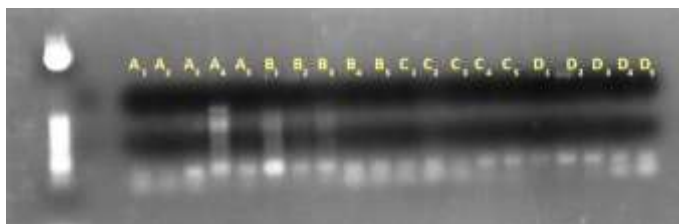
10. Taula: Sekuentziatzaera bidalitako 8 laginen emaitzak Blastn bidez aztertzean eskuratutako homologia.

Bateragarritasuna: Lerrokatu diren nukleotidoetatik bateragarriak izan diren nukleotido kopurua. **Deskribapena:** Aztergai den sekuentziarekin lerrokatu den sekuentziaren deskribapena ematen du. **E balioa** (expected value): zorizko gertaeraz, emaitza jakin bat lortzeko aukera zenbatekoa izan daitekeen adierazten du.

Sekuentzia	Luzera (bp)	Bateragar.	Deskribapena	Sekuentzien arteko gainjarketa	E balioa	Antzekotasun maila
A3	526	12-511 (499)	<i>Oplegnathus fasciatus</i> GAPDH isoform 2 mRNA, complete cds	%95	1E-112	%80
A5	524	13-524 (511)	""	%97	0,0	%91
B1	322	18-321 (306)	""	%94	2E-115	%92
B5	320	7-319 (312)	""	%97	6E-115	%91
C3	763	23-757 (734)	""	%96	0,0	%92
C5	763	23-759 (736)	""	%96	0.0	%93
D3	558	14-542 (528)	""	%94	0.0	%94
D4	563	18-544 (526)	""	%93	0.0	%92

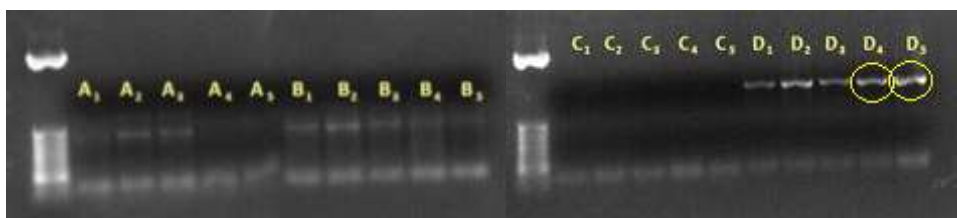
6.1.2. TATA kutxa lotura proteina (TBP)

PCR bidez TBP genearen sekuentzia zehatza lortzeko lau saio burutu ziren. Lehenengo hiru saioetan erabili ziren hasleek honako sekuentzia tamainak amplifikatzen zituzten; A: 600 bp, B: 500 bp, C: 350 bp, eta D: 250 bp. Lehenengo saioaren PCR produktuak gelean migratu zirenean ez zen inolako emaitzarik lortu (**8. Irudia**).



8. Irudia: TBP genea amplifikatzeko burututako lehengo PCR saioaren emaitzak. A, B, C, eta D hasle bikote desberdinei dagokie eta zenbakiak hasle bikote bakoitzaren erreplika ezberdinei. Ez ziren esperotako emaitzak lortu. A: 600 bp, B: 500 bp, C: 350 bp, eta D: 250 bp.

Bigarren saioa egin zenean PCR baldintzak aldatu ziren amplifikazio prozesua optimizatzeko. PCRaren emaitzak aztertu zirenean, D hasle bikoteak esperotakoa baino luzeagoa zen aplikioia eman zuen (**9. Irudia**), hala ere, bi PCR produktu sekuentziatzera bidali ziren. Lortutako sekuentziak NCBI-ko datu baseekin konparatu ziren eta *Chelon labrosus*en mitokondrioaren genomaren eskualde bat amplifikatu zela ondorioztatu zen. Lortutako sekuentziek 883 eta 844 bp zituzten eta *Chelon labrosus*en mitokondrioaren genomarekin %95-98 bitarteko homologia zuten. Hortaz, beste saio batzuk burutu ziren (**11. Taula**).



9. Irudia: TBP genea amplifikatzeko burututako bigarren PCR saioaren emaitzak. A, B, C, eta D hasle bikote desberdinei dagokie eta zenbakiak hasle bikote bakoitzaren erreplika ezberdinei. Ez ziren esperotako emaitzak lortu. A: 600 bp, B: 500 bp, C: 350 bp, eta D: 250 bp. Baina D₄ eta D₅ aplikioiak sekuentziatu ziren (zirkuluekin adierazita).

11. Taula: TBP amplifikatzean D hasle bikotearekin lortutako produktua. Lorturiko sekuentziarekin burututako nukleotido mailako blastn homologia analisiaren emaitzak. **Bateragarritasuna:** Lerrokatu diren nukleotidoetatik bateragarriak izan diren nukleotido kopurua. **Deskribapena:** Aztergai den sekuentziarekin lerrokatu den sekuentziaren deskribapena ematen du. **E balioa** (expected value): zorizko gertaeraz, emaitza jakin bat lortzeko aukera zenbatekoa izan daitekeen adierazten du.

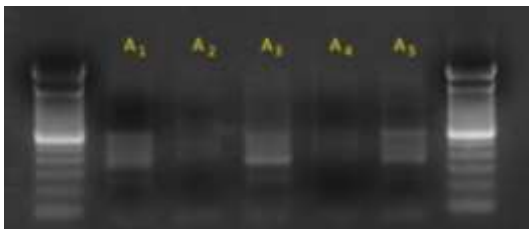
Sekuentzia	Luzera (bp)	Bateragar.	Deskribapena	Sekuentzien arteko gainjarketa	E balioa	Antzekotasun maila
D4	925	31-906 (869)	<i>Chelon labrosus</i> mitochondrion, complete genome	%94	0.0	%98
D5	991	24-868 (792)	<i>Chelon labrosus</i> mitochondrion, complete genome	%84	0.0	%95

Hirugarren saio batean, bakarrik A eta B hasle bikoteen errepikapena egin zen baldintzak aldatuz. Baina ez zen PCR produkturik lortu (**10. Irudia**).

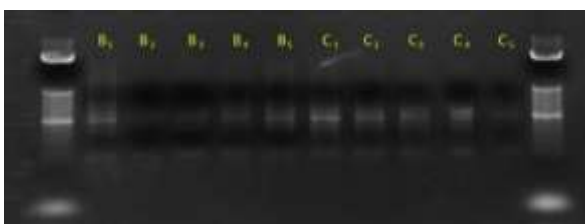


10. Irudia TBP genea amplifikatzeko burututako hirugarren PCR saioaren emaitzak. A eta B hasle bikote desberdinei dagokie eta zenbakiak hasle bikote bakoitzaren erreplika ezberdinei. Ez ziren esperotako emaitzak lortu. A: 600 bp, B: 500 bp.

Azken saioa egiteko bost hasle bikote berri diseinatu ziren. Esperotako aplikoioren tamaina honako hauek ziren; A: 430 bp, B:230 bp, C: 340 bp, D: 200 bp eta E: 100 bp. Baina, PCR produktuak gelean migratu zirenean ez zen emaitzarik lortu (**11, 12 eta 13. Irudiak**).



11. Irudia: TBP genea amplifikatzeko burututako laugarren PCR saioaren emaitzak. A hasle bikoteei dagokie eta zenbakiak erreplika ezberdinei. Ez ziren esperotako emaitzak lortu. A: 430 bp.



12. Irudia: TBP genea amplifikatzeko burututako laugarren PCR saioaren emaitzak. B eta C hasle bikote desberdinei dagokie eta zenbakiak hasle bikote bakoitzaren erreplika ezberdinei. Ez ziren esperotako emaitzak lortu. B: 230 bp, C: 340 bp.



13. Irudia: TBP genea amplifikatzeko burututako laugarren PCR saioaren emaitzak. D eta E hasle bikote desberdinei dagokie eta zenbakiak hasle bikote bakoitzaren erreplika ezberdinei. Ez ziren esperotako emaitzak lortu. D: 200 bp, E: 100 bp.

Beraz, TPB genearen sekuentzia lortzeko saio ezberdinak burutu ziren arren, ezin izan zen TPB-ren sekuentziarik eskuratu.

6.2. ITU GENEEN TRANSKRIPZIO MAILA: ERREFERENTZIA GENEEN BIDEZKO NORMALIZAZIOA

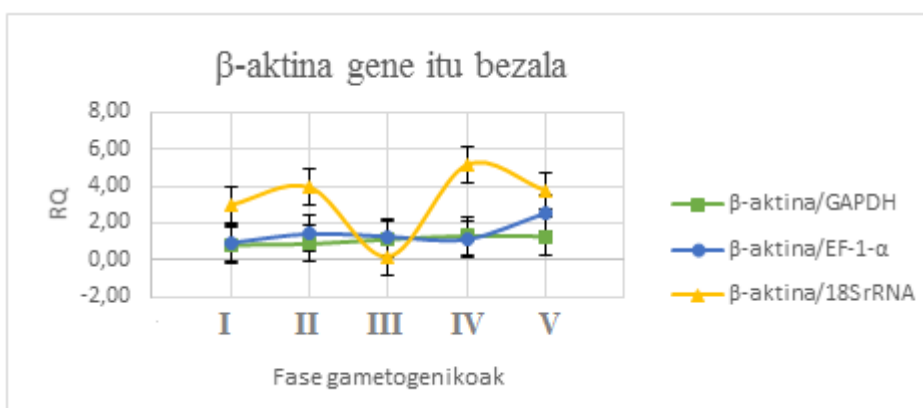
Erreferentzia gene bakoitza itu gene kontsideratuz, gainontzeko erreferentzia gene bakoitzarekiko normalizatu zen eta emaitza grafikoki adierazi, fase gametogeniko bakoitzaren arabera.

6.2.1. Emeetan lortutako emaitzak

Azterturiko erreferentzia geneek (β -aktina, GAPDH, EF-1- α eta 18S rRNA) fase gametogenikoan zehar 7.86, 7.81, 8.47 eta 11.1-eko aldakortasun koefizienteak erakutsi zituzten, hurrenez hurren.

6.2.1.1. β -aktina hemen

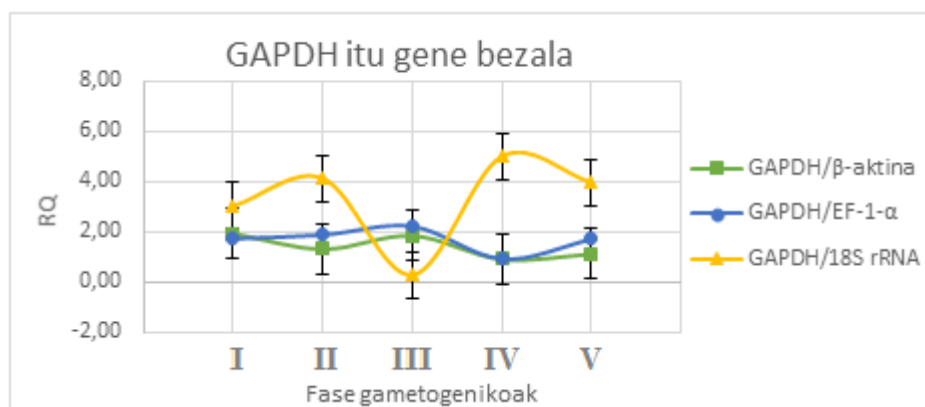
Normalizazioa egiteko erabili zen erreferentzia genearen arabera gametogenesisian zeharreko β -aktinaren transkripzio-profil desberdinak lortu ziren (**14. Irudia**). Horrela, β -aktina genearen transkripzio maila GAPDHaren genearekiko normalizatzean, antzeko transkripzio-profila eskuratu zen gametogenesisian zehar. EF-1- α genearekiko normalizatzean, antzeko emaitza eskuratu zen orohar, V. fasea salbuespena izanik; izan ere, transkripzio maila altuagoa aurkitu baitzen azken honetan. 18S rRNA-rekiko berriz, fase gametogenikoaren araberako patroia aurkitu zen, maila altuenak II. eta IV. faseetan eta baxuena III. fasean erakutsiz.



14. Irudia: Gametogenesi fase ezberdinen araberako β -aktinaren transkripzio-profila erreferentzia gene desberdin bakoitzarekiko normalizatu ondoren. Fase bakoitzeko datua batuz bestekoa eta desbiderazio estandarrekin adierazita dago. RQ: espresio erlatiboa.

6.2.1.2. GAPDH

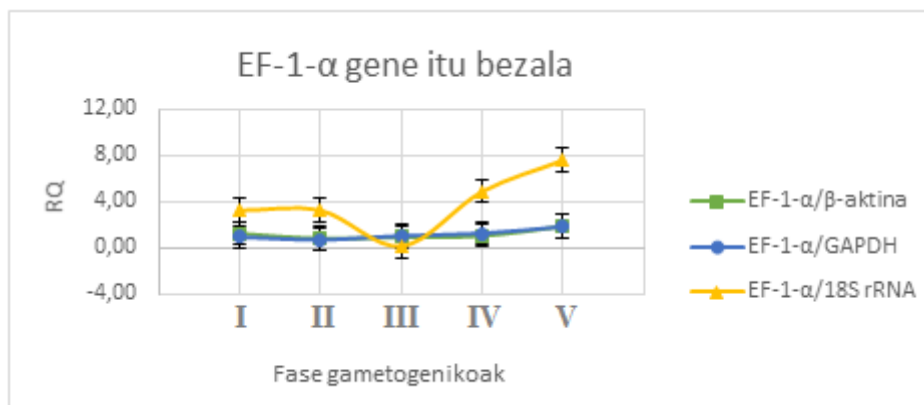
Aurreko kasuan bezala, GAPDH genearen transkripzio mailaren normalizazioa EF-1- α genearen eta β -aktina genearen transkripzio mailekiko normalizazioa burutzean antzeko transkripzio-profilak lortu ziren (**15. Irudia**), transkripzio maila fase gametogeniko ezberdinen artean arinki aldatzen zelarik. 18S rRNA genearen transkripzio mailarekiko normalizazioa burutzean aldiz, guztiz desberdina zen profila lortu zen, mailarik altuenak II. eta IV faseetan eskuratuz eta esangarriki baxuenak III. fasean. Hau da, β -aktina/18S rRNA kasuan lortutakoaren antzeko profila eskuratu zen.



15. Irudia: Lazun emeen fase gametogenikoaren arabera GAPDH-ren transkripzio-profila erreferentzia gene desberdin bakoitzaren transkripzio mailarekiko normalizatu ondoren. Fase bakoitzeko datua batz bestekoa eta desbiderazio estandarrekin adierazita dago. RQ: espresio erlatiboa.

6.2.1.3. EF-1- α

EF-1- α genearen transkripzio maila β -aktina eta GAPDH geneekiko normalizatzean, antzeko transkripzio-profila aurkitu zen aztertutako fase gametogeniko ezberdinetan (**16. Irudia**). 18S rRNA genearekiko normalizatu ondoren berriz, β -aktina eta GAPDH geneekin lortutako transkripzio-profilarekin zer ikusirik ez zuen profila lortu zen. Horrela, EF-1- α -ren transkripzio maila, aztertutako fase gametogenikoen arabera aldatzen zela aurkitu zen, maila baxuenak III. fasean lortuz eta altuenak ondorengo IV. eta V. faseetan.

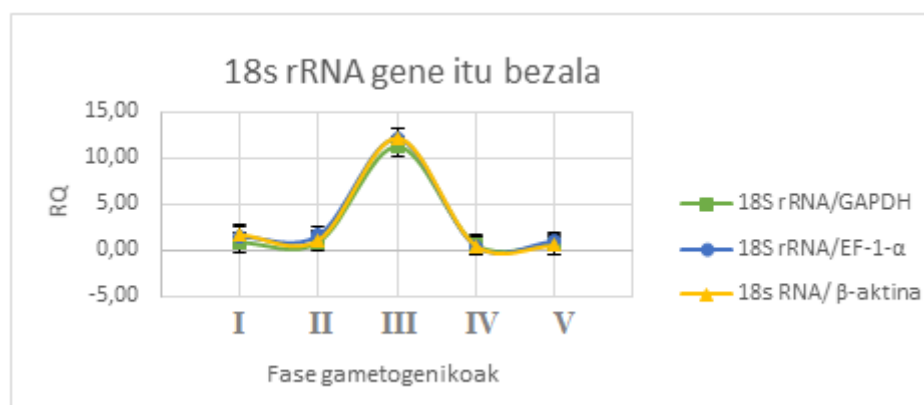


16. Irudia: Gametogenesiaren fase ezberdinetan zehar EF-1- α -ak erakusten duen transkripzio-profila erreferentzia gene desberdinen transkripzio mailarekiko normalizatu ondoren. Fase bakoitzeko datua batz bestekoa eta desbiderazio estandarrekin adierazita dago. RQ: espresio erlatiboa.

6.2.1.4. 18S rRNA

18S rRNA genearen transkripzio maila EF-1- α , β -aktina eta GAPDH geneen transkripzio mailekiko normalizatzean, oso antzeko transkripzio-profilak lortu ziren.

17. Irudian ikusten denaren arabera, 18S rRNAREN transkripzio mailak balio maximoa III. fasean zeuden emeetan eskuratu zuen. Gainontzeko fase gametogenikoetan zeuden emeen gonadetako 18S rRNA genearen transkripzio maila berriz, antzekoa zen kasu guztietan.



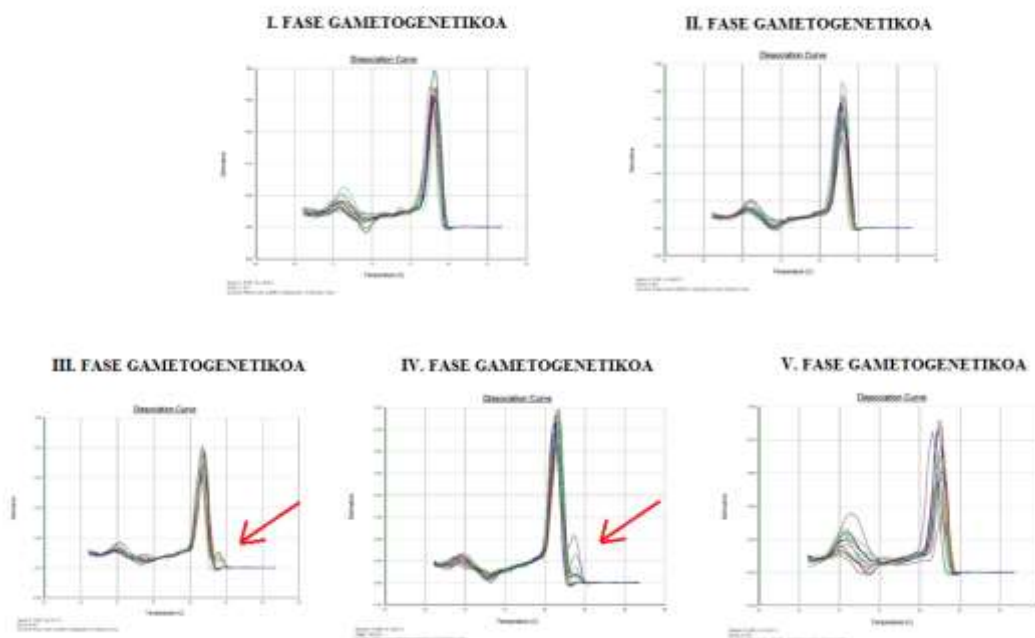
17. Irudia: Lazun emeen fase gametogeniko ezberdinen arabera 18S rRNA genearen transkripzio-maila erreferentzia gene desberdin bakoitzaren transkripzio mailarekiko normalizatu ondoren. Fase bakoitzeko datua batz bestekoa eta desbiderazio estandarrekin adierazita dago. RQ: espresio erlatiboa.

6.2.2. Arretan lortutako emaitzak

Azterturiko erreferentzia geneek (GAPDH, EF-1- α eta 18S rRNA) fase gametogenikoan zehar 6.37, 5.98 eta 13,26ko aldakortasun koefizienteak erakutsi zituzten, hurrenez hurren.

6.2.2.1. β -aktina

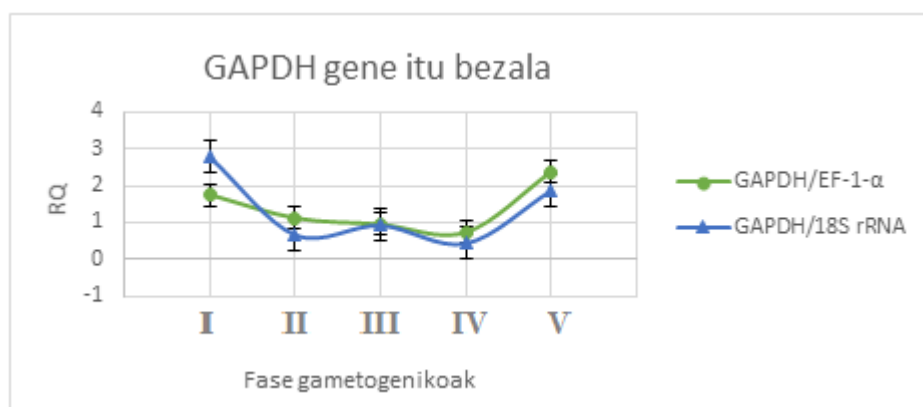
β -aktinaren disoziazio kurba, fase gametogenikoaren arabera aldatzen zela behatu zen. Batetik, inespezifikotasunak lortzen ziren eta bestetik fase ezberdinetan produktu inespezifikoko hauek itxura ezberdina erakusten zuten. I., II. eta V. faseetan lortzen ziren grafikoak nahiko berdintsuak ziren (**18. Irudia**) baina, III. eta IV. faseetan tontor nagusiaren alboan beste tontor txikiago bat agertzen zen (**18. Irudian** gezi gorritz adierazita). Lortzen ziren inespezifikotasunak zirela eta, eta bereziki hauek gabeko amplifikazio espezifikokoagoak lortzeko ezintasunari lotuta, arren analisisetan β -aktinaren transkripzio maila ez erabiltzea erabaki zen.



18. Irudia: β -aktinaren qRT-PCR bidezko amplifikazioaren ondoko disoziazio-kurbaren emaitzen irudia fase gametogeniko bakoitzean. Gezi gorriaz bigarren tontorra adierazita dago. Bakarrik III. eta IV. faseetan agertu zen.

6.2.2.2. GAPDH

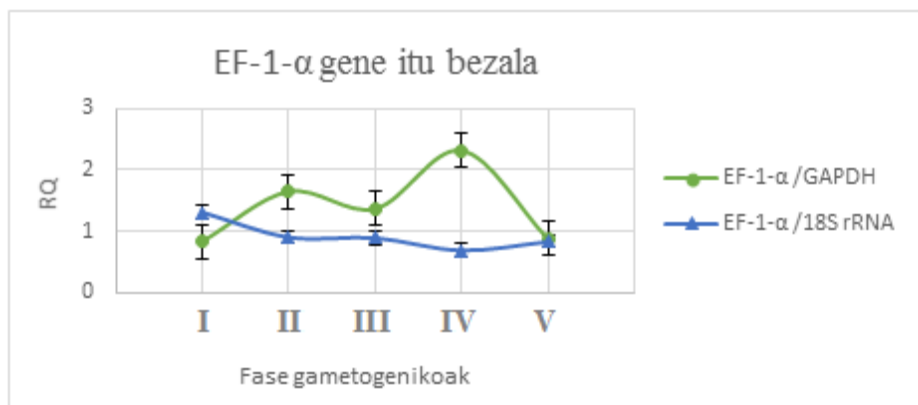
GAPDH genearen transkripzio maila EF-1- α genearen transkripzio mailarekiko normalizatzean, I. fase gametogenikotik IV. faserarte transkripzio maila beherakorra izan zen eta V. fasean transkripzio mailak bere balio maximoa lortu zuen (**19. Irudia**). 18S rRNA genearen transkripzio mailarekiko normalizazioak berriz, GAPDHren transkripzio profil ezberdina erakutsi zuen. I. fasetik II. fasera transkripzio mailak behera egin zuen, eta horrela mantendu zen V. fasean berriz igo arte. Hala ere V. fasean behatutako iguera hau ez zen I. go faseko transkripzio mailara heldu.



19. Irudia: Lazun arren gonadetako GAPDH genearen transkripzio-profila erreferentzia gene desberdin bakoitzaren transkripzio mailarekiko normalizatu ondoren. Fase bakoitzeko datua batz bestekoa eta desbiderazio estandarrekin adierazita dago. RQ: espresio erlatiboa.

6.2.2.3. EF-1- α

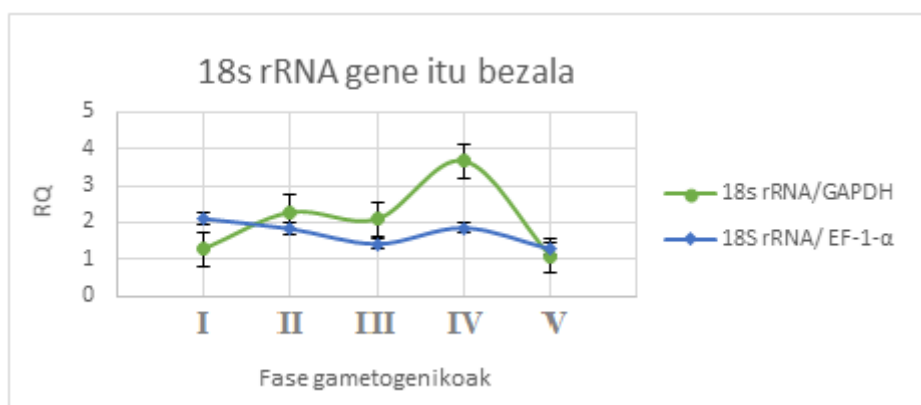
EF-1-a genearen transkripzio mailaren normalizazioa GAPDH genearen transkripzio mailarekiko burutzean, honek IV faserarte goranzko joera zuen, nahiz eta III. fasean II. fasean lortutako transkripzio mailen antzeko mailak neurtu ziren (**20. Irudia**). IV. fasean, transkripzio mailaren balio maximoa neurtu zen, V fasean, I. fasean neurtutako balioetara bueltatzeko. Normalizazioa 18S rRNA genearekiko egitean, EF-1- α genearen transkripzio mailen profil zeharo ezberdina eskuratu zen aztertutako fase gametogeniko ezberdin ia guztietan zehar (V. fasea salbuespena izan zen). Horrela EF-1- α genearen transkripzio maila fase guztietan zehar nahiko konstante mantendu zen.



20. Irudia: Lazun arren gonadetako EF-1- α genearen transkripzio-profila erreferentzia gene desberdin bakoitzaren transkripzio mailarekiko normalizatu ondoren. Fase bakoitzeko datua batatz bestekoa eta desbiderazio estandarrekin adierazita dago. RQ: espresio erlatiboa.

6.2.2.4. 18S rRNA

18S rRNA genearen transkripzio mailaren normalizazioa EF-1- α eta GAPDH geneen transkripzio mailarekiko burutzean, bi transkripzio-profil zeharo desberdin lortu ziren (**21. Irudia**). Aurreko kasuan bezala, GAPDH genea erabiltzean 18S rRNA genearen transkripzio mailak IV. fase arte goranzko joera zuen, III. fasean II. fasearen maila berdintsuetan mantendu arren. IV. fasean transkripzio mailaren balio maximoa lortu zen, V. fasean berriz ere jaisteko. Normalizazioa EF-1- α genearen transkripzio mailarekiko burutzean ordea, 18S rRNAren transkripzioa antzera mantendu zen fase gametogeniko ezberdinetan zehar, baina I. fasetik V. faserarte beherakada bat ikusi zen.



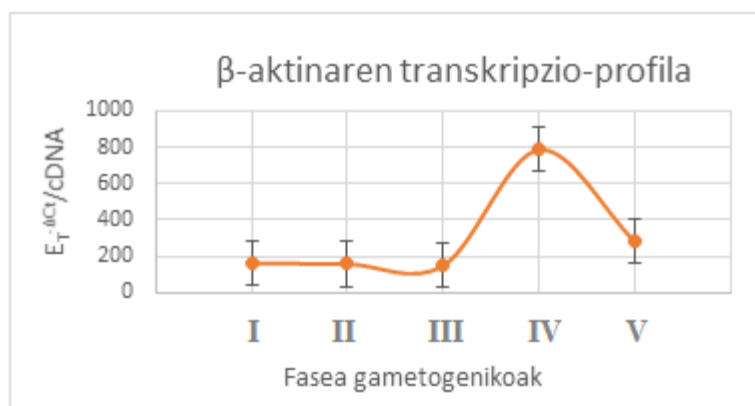
21. Irudia: Lazun arren gonadetako 18S rRNA genearen transkripzio-profila erreferentzia gene desberdin bakoitzaren transkripzio mailarekiko normalizatu ondoren. Fase bakoitzeko datua batatz bestekoa eta desbiderazio estandarrekin adierazita dago. RQ: espresio erlatiboa.

6.3. ITU GENEEN TRANSKRIPZIO MAILA: QuanT-iT OliGreen-aren BIDEZKO NORMALIZAZIOA

6.3.1. Emeetan lortutako transkripzio-profilak

6.3.1.1. β -aktina

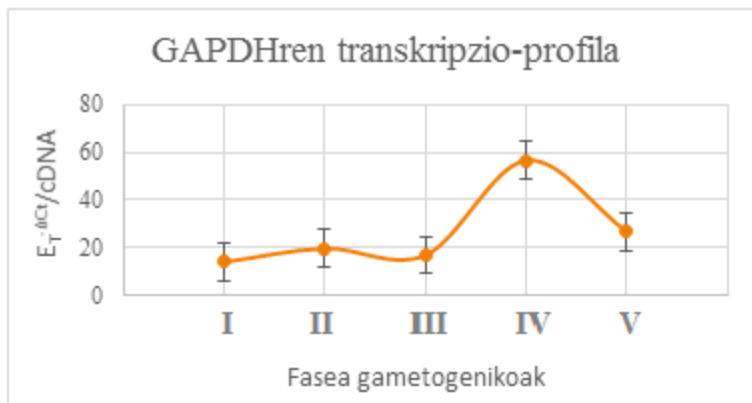
QuanT-iT OliGreenaren bidezko cDNA kontzentrazioaren neurketa erabiliz, β -aktina genearen transkripzio maila fase gametogenikoan zehar ezberdina zela behatu zen (**22. Irudia**). I., II. eta III. faseetan, transkripzio maila berdintsu mantendu bazen ere, IV. fasean transkripzio maila laukoiztu egin zen. V. fasean espresio maila IV. fasekoaren erdia izan zen.



22. Irudia: QuanT-iT OliGreen metodoaren bidezko cDNA kontzentrazioaren neurketaren bidezko β -aktina genearen transkripzio-profilaren normalizazioa emeen gonadetan fase gametogeniko ezberdinetan zehar.

6.3.1.2. GAPDH

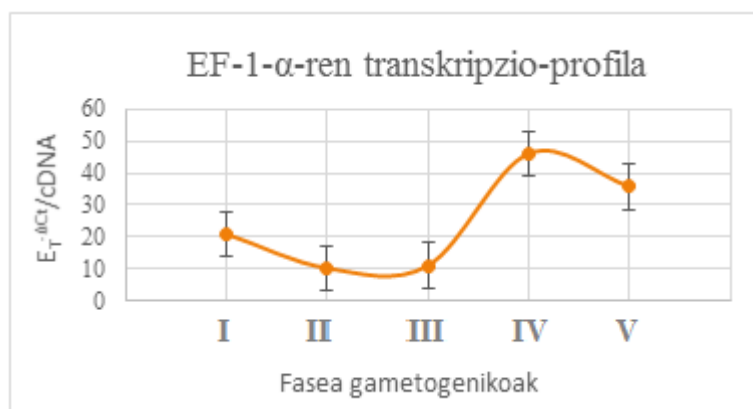
GAPDH genearen transkripzio-profila β -aktinarentzako deskribatutakoren antzekoa izan zen. GAPDHren transkripzio maila lehenengo hiru fase gametogenikoetan nahiko konstante mantendu zen baina IV. fasean bere maximoa lortu zuen, V. fasean berriz ere esangarriki, behera egiteko. (**23. Irudia**).



23. Irudia: : QuanT-iT OliGreen metodoaren bidezko cDNA kontzentrazioaren neurketaren bidezko GAPDH genearen transkripzio-profilaren normalizazioa emeen gonadetan fase gametogeniko ezberdinetan zehar.

6.3.1.3. EF-1- α

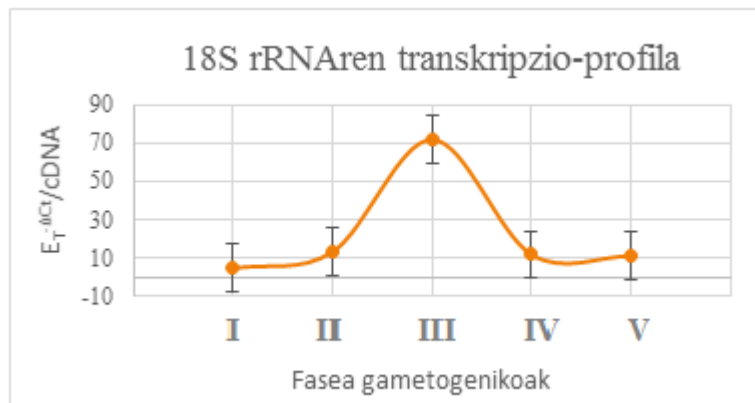
I. fasetik III. faserarte, EF-1- α -ren transkripzio maila antzekoa izan zen baina IV. fasean esangarriki igo zen V. fasean zeuden lazun emeen gonadetan arinki jaisteko (24. Irudia).



24. Irudia: : QuanT-iT OliGreen metodoaren bidezko cDNA kontzentrazioaren neurketaren bidezko EF-1- α genearen transkripzio-profilaren normalizazioa emeen gonadetan fase gametogeniko ezberdinetan zehar.

6.3.1.4. 18S rRNA

18S rRNA genearen transkripzio maila antzekoa izan zen I, II, IV eta V. faseetan zeuden lazun emeen gonadetan baina III. fasean zeuden emeen gonadetan ordea, esangarriki altuagoa izan zen (25. Irudia).

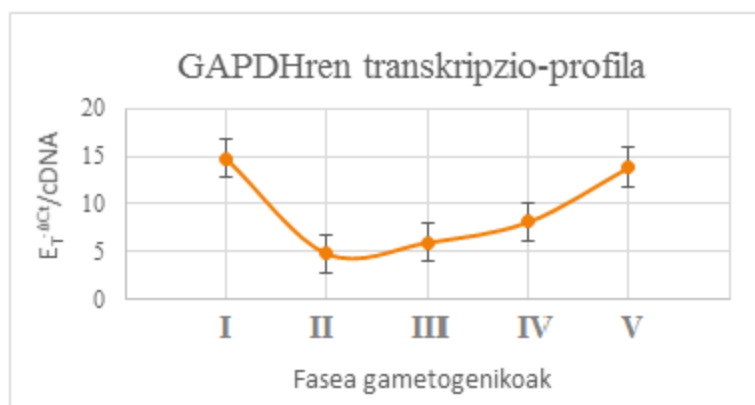


25. Irudia: Quant-iT OliGreen metodoaren bidezko cDNA kontzentrazioaren neurketaren bidezko 18S rRNA genearen transkripzio-profilaren normalizazioa emeen gonadetan fase gametogeniko ezberdinetan zehar.

6.3.2. Arretan lortutako transkripzio-profilak

6.3.2.1. GAPDH

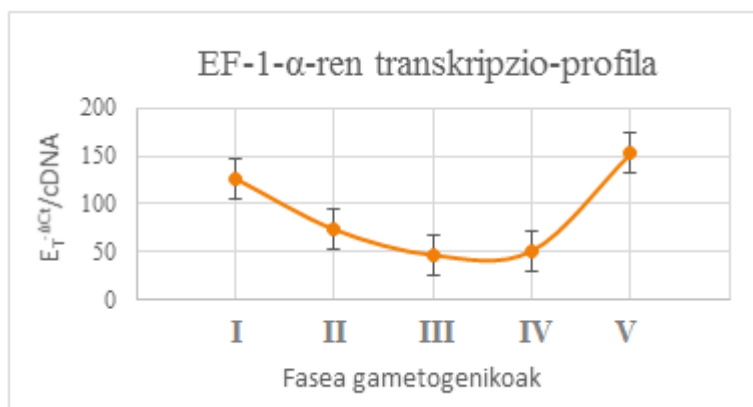
GAPDH genearen transkripzioa ere fase gametogenikoarekin batera aldatzen zela behatu zen (26. Irudia). I. fasean genearen transkripzio maila maximoa eman zen, baina II. faserako GAPDHaren transkripzio mailak esangarriki behera egin zuen. II. fasetik V. fasera, berriz, goranzko joera erakutsi zuen.



26. Irudia: Quant-iT OliGreen metodoaren bidezko cDNA kontzentrazioaren neurketaren bidezko GAPDH genearen transkripzio-profilaren normalizazioa emeen gonadetan fase gametogeniko ezberdinetan zehar.

6.3.2.2. EF-1- α

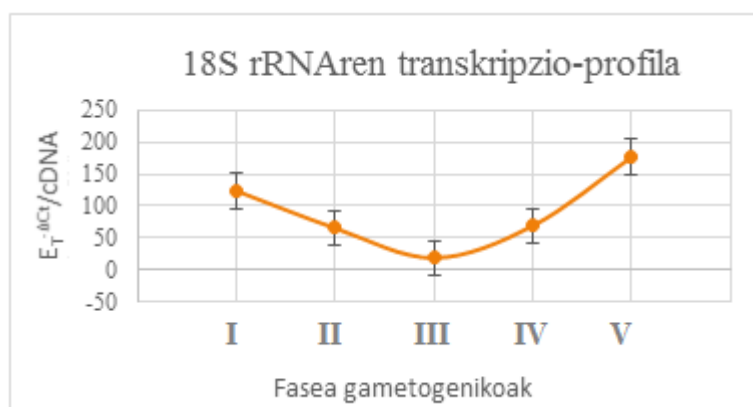
EF-1- α erreferentzia gene honen transkripzio-profila I. fasetik abiatuta jaitsiz zihoan III. faserarte. III. eta IV. faseetan antzeko transkripzio mailetan mantendu ondoren, V. faserako berriro gora egiten zuen, I. faseko mailak gaindituz (**27. Irudia**).



27. Irudia: QuanT-iT OliGreen metodoaren bidezko cDNA kontzentrazioaren neurketaren bidezko EF-1- α genearen transkripzio-profilaren normalizazioa emeen gonadetan fase gametogeniko ezberdinetan zehar.

6.3.2.3. 18S rRNA

18S rRNA genearen transkripzio mailak ere, EF-1- α -k erakutsitako joera berdina erakutsi zuen, transkripzio maila gutxituz zihoan I. fasetik III. faserarte. III. fasetik V. faserarte transkripzio maila handituz zihoan (**28. Irudia**).



28. Irudia: QuanT-iT OliGreen metodoaren bidezko cDNA kontzentrazioaren neurketaren bidezko 18S rRNA genearen transkripzio-profilaren normalizazioa emeen gonadetan fase gametogeniko ezberdinetan zehar.

7. EZTABAIDA

Transkriptomika azterketetan itue genearen transkripzio mailaren normalizazioa egiteko beharra dago (MIQE Guidelines; Bustin et al., 2009). Normalizazio hau erreferentzia geneen bidez egiten da, non itue genearen transkripzio mailak erreferentzia gene batekiko erlatibizatzen den. Oro har, erreferentzia gene hauek konstitutiboki transkribatzen dira eta zelulen metabolismo eta mantentzean parte hartzen dute. Beraz, transkripzio maila altuko geneak dira eta kanpo faktoreekiko sentikortasun txikikoak. Hala ere, azken baieztapen honen inguruan eztabaida handiak sortu dira eta erreferentzia geneen transkripzio-profila esposizio egoera desberdinen aurrean aldatzen dela frogatu da (Dheda et al., 2005; Arukwe, 2006; Filby eta Tyler, 2007). Horrela, esperimentu bakoitzerako eta zelula, ehun, organismo zein sasoi desberdinetarako erreferentzia geneen azterketa indibidualizatua egiteko gomendioa proposatu da (Dheda et al., 2004).

Chelon labrosus lazuna espezie zentinelak gisa erabiltzen da azterketa ekotoxikologietan (Raingard et al., 2006; Bilbao et al., 2010; Diaz de Cerio et al., 2012). Espezie honetan modu arruntean erabili izan diren erreferentzia geneak β -aktina (BA), 18S RNA erribosomikoa (18S rRNA), 1- α elongazio faktorea (EF-1- α) eta glizeraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) izan dira. Lan hauetan gametogenesi fase berdineko indibiduoak konparatzen zituzten baina sasoi desberdineko indibiduoak konparatzean, erreferentzia gene horien aldakortasun handiak frogatu berri dira (Bizarro et al., 2012; Rojo-Bartolomé et al., 2012). Gradu Amaierako Lan honetan lorturiko emaitzak azken lan horien emaitzak konfirmatzen dituzte. *Chelon labrosus*en ugal zikloaren fase gametogeniko desberdinetan erreferentzia geneen transkripzioa aldakorra dela frogatu da. Itue genearen transkripzio-profila, erabili zen erreferentzia genearen arabera aldatzen baitzen. Gametogenesisian zeharreko erreferentzia gene arruntenen aldakortasuna gonadan, beste organismo batzuetan ere frogatu da. Adibidez, arrainetan (García-López et al., 2011); bibalbioetan (Mauriz et al., 2012) eta krustazeoetan (Sellars et al., 2007).

Erreferentzia geneek ematen dituzten arazoak ezagunak diren arren, itue geneen normalizaziorako erreferentzia geneen erabilpena oso hedatua dago eta bakarrik erabili beharrean zenbait erreferentzia geneen konbinazioa erabiltzea proposatu da.

GeNorm, Norfinder edo Bestkeeper bezalako programa informatikoen esperimendu baten barruan neurturiko erreferentzia geneen aukeraketa egokia egiten laguntzen dute (Vandesompele et al., 2002; McCurley eta Callard, 2008; Du et al., 2013). Hala ere, prozedura hauek hainbat erreferentzia geneen transkripzio mailak aldi berean neurtzea eskatzen dute. Adibidez, GeNorm programaren bidez esperimendu baten baldintzen pean aldakortasun gutxien izan duten 3 erreferentzia gene aukeratu dira. Programak hiru erreferentzia gene horien arabera balio bat ematen du iturri geneak balio horrekiko normalizatzeko. Prozedura honen arazo nagusia da, lortzen diren erreferentzia geneen transkripzio-profilak soilik esperimendu horretarako balio dutela, ondorioz, beste ikerketa bat egiteko berriro ere beste hainbat gene aztertu behar dira. Prozedura guzti hau denbora eta diru gastu itzela da. Horregatik, erreferentzia geneen transkripzio mailen albertan aurkitzea prozedura eraginkorra izan daiteke.

OliGreen (Rinnh et al., 2008) edo RiboGreen (Hashimoto et al., 2004) bezalako tekniken bidez, qRT-PCR egiteko erabiliko cDNA kontzentrazio zehatza kalkulatu da, eta honen bidez iturri genearen normalizazioa egiten da. Beraz, ugalketa sasoiaren menpeko zein baldintza esperimentalen menpeko erreferentzia geneetan sorturiko aldakortasunaren arazoa saihestea lortzen da. Era berean, esperimendu edo azterketa berri bakoitzean egin beharreko erreferentzia geneen neurketa eta selekzio lana ere murrizten da, dakarren kostu ekonomikoekin batera. Esaterako, RT-PCR erreakzio batek 1,65\$ balio duen bitartean RiboGreen erreakzioak 0.08\$ balio du, eta gainera denboraren aldetik askoz arinagoa da. qRT-PCR bat burutzeak 2.5-3h daramatzen bitartean RiboGreen-en bidezko azterketa batek 20min irauten du (Hashimoto et al., 2004). Horretaz gain, nukleotido sekuentzietara lotzen diren fluorokromoen bidezko cDNA kuantifikazioaren aplikazioa normalizazio prozedura moduan, erreferentzia geneak erabiltzea baino efizienteagoa dela frogatuta dago (Rinnh et al., 2008).

Laburbilduz, transkriptomika-analisiak egiten direnean iturri geneen normalizazioa egiteko cDNA erabiltzea erreferentzia geneak erabiltzea baino onuragarriagoa da, egoera oso aldakorra denean, gonadaren azterketa fase gametogeniko desberdinetan kasu. Gainera, lan honetan lortutako emaitzak ikusita argi geratzen da erreferentzia geneen erabilerak iturri geneen interpretazio okerra eman dezaketela. Beraz, zehaztasun eta doitasun mesedetan QuanT-it OliGreen metodoa erabiltzea hobetzen da.

8. ONDORIOAK

- Arrainetan burutzen diren transkripzio mailen neurketen normalizazioak burutzeko erabiltzen diren erreferentzia geneak (β -aktina, 18S RNA erribosomikoa, 1- α elongazio faktorea eta glizeraldehido-3-fosfato deshidrogenasa) fase gametogeniko desberdinetan zeuden *Chelon labrosus* lazun ar eta emeen gonadetan modu arrakastatsuan aplikatu dira qRT-PCR bidez.
- Arrainetan, bereziki *C. labrosus* lazunean, burutzen diren toxikogenomika ikerketetan, transkripzio mailen normalizazioa burutzeko ohikoak izaten diren erreferentzia geneen (β -aktina, 18S RNA erribosomikoa, 1- α elongazio faktorea eta glizeraldehido-3-fosfato deshidrogenasa) transkripzio-profila fase gametogeniko desberdinetan zehar modu ezberdinduan aldatzen dela frogatu da.
- Orain arte itu geneen transkripzioaren normalizaziorako erabili izan ohi diren erreferentzia geneen (β -aktina, 18S RNA erribosomikoa, 1- α elongazio faktorea eta glizeraldehido-3-fosfato deshidrogenasa) erabilerak, itu geneen transkripzio-profilaren interpretazio okerrak ondoriozta ditzake.
- QuanT-iT OliGreen metodoa ziklo gametogenikoan zehar arrantzatutako *C. labrosus* lazun ar eta emeen gonadetako cDNA kontzentrazioa neurtzeko optimizatu da eta modu arrakastatsuan aplikatu da.
- QuanT-iT OliGreen metodoaren bidezko cDNA kontzentrazioaren neurketa geneen transkripzio mailen normalizaziorako aukera zehatza eta fidagarria da.
- QuanT-iT OliGreen metodoaren bidezko cDNA kontzentrazioaren neurketa geneen transkripzio mailen normalizaziorako irtenbide egokia izan daiteke toxikogenomika arloan.

9. ESKER ONAK

Maren Ortiz Zarragoitia eta Eider Bilbao Castellanos Graduan Amaiako Lana aurrera eramateko eskeinitako aukeragatik.

Zoologia eta Animalia Zelulen Biologia Saileko Zelulen Biologia Ingurumen Toxikologian Ikerketa taldeari, bereziki Iratxe Rojo-Bartolomé eta Nerea Duroudierri lanak iraun duen bitartean eskainitako laguntzagatik.

UPV/EHUko Sekuentziazio eta Genotipo Azterketen Unitatea SGiker-eri emandako laguntza teknikoagatik.

Biokimika eta Biologia Molekularra Saileko Antonio Gomez eta Alberto Ourori QuanT-iT metodoa burutzeko beharrezkoa izan den fluorimetroa uzteagatik.

10. BIBLIOGRAFIA

- Arukwe, A. 2006. Toxicological Housekeeping Genes: Do They Really Keep the House?. *Environ. Sci. Technol.* 40, 7944-7949
- Bilbao, E., Cajaraville, M.P., Cancio, I. 2010. Differential transcription of genes involved in peroxisome proliferation in thicklip grey mullets *Chelon labrosus* injected with benzo(a)pyrene. *Comp. Biochem. Physiol., C: Comp. Pharmacol. Toxicol.* 151, 334-342
- Bizarro, C., Aragón, P., Maquieira A., Cajaraville, M.P., Ortiz-Zarragoitia M. 2012. Characterization by histological and molecular tools of the reproductive cycle and endocrine disruption effects on a thicklip grey mullet (*Chelon labrosus*). *Comp. Biochem. phys., part A.* 163, S32-S38
- Bizarro, C., Ros, O., Vallejo, A., Prieto, A., Etxebarria, N., Cajaraville, M.P., Ortiz-Zarragoitia, M. 2014. Intersex condition and molecular markers of endocrine disruption in relation with burdens of emerging pollutants in thicklip grey mullets (*Chelon labrosus*) from Basque estuaries (South-East Bay of Biscay). *Mar. Environ. Res.* 96, 19-28
- Bourlat, S.J., Borja, A., Gilbert, J., Taylor, M.I., Davies, N., Weisberg, S.B., Griffith, J.F., Lettieri, T., Field, D., Benzie, J., Glockner, F.O., Rodriguez- Ezpeleta, N., Faith, D.P., Bean, T.P. and Obst, M. 2013. Genomics in marine monitoring: New opportunities for assessing marine health status. *Mar. Pollut. Bull* 74, 19-31
- Burgess, P.J., Matthews, R.A. 1994. A standardized method for the in vivo maintenance of *Cryptocaryon irritans* (Ciliophora) using the grey mullet *Chelon labrosus* as an experimental host. *J. Parasitol.* 80(2), 288-92.
- Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J.A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M.W., Shipley, G.L., Vandesompele, J. and Wittwer, C.T. 2009. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clin. Chem.* 55,4

- Delgado de Carvalho, C., Marocco Corneta, C., Sanches Uieda, V. 2007. Schooling behavior of *Mugil curema* (Perciformes: Mugilidae) in an estuary in southeastern Brazil. *Neotrop. Ichthyol.* 5(1), 81-83
- Denslow, N.D., Garcia- Reyero, N. and Barber, D.S. 2007. Fish 'n' chips: the use of microarrays for aquatic toxicology. *Mol Biosyst* 3 (3), 172- 177
- Dheda, K., Huggett, J.F., Bustin, S.A., Johnson, M.A., Rook, G., Zumla, A. 2004. Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR. *Biotechniques*, 37(1), 112-4. 116, 118–9
- Dheda, K., Huggett, J.F., Chang, J. S., Kim, L.U., Bustin, S.A., Johnson, M.A., Rook, G.A., Zumla, A. 2005. The implications of using an inappropriate reference gene for real-time reverse transcription PCR data normalization. *Anal. Biochem.* 344, 141-143
- Diaz de Cerio, O., Bilbao, E., Cajaraville, M.P., Cancio, I. 2012. Toxicology tailored low density microarray for the thicklip grey mullet, *Chelon labrosus*; development, production and validation. *Mar. Biotechnol.*
- Du, Y., Zhang, L., Xu, F., Huang, B., Zhang, G. and Li, L. 2013 Validation of housekeeping genes as internal controls for studying gene expression during Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) development by quantitative real-time. *Fish & Shellfish Immunology* 34, 939-945
- Fent, K. and Sumpter, J.P. 2011. Progress and promises in toxicogenomics in aquatic toxicology: Is technical innovation driving scientific innovation? *Aquat. Toxicol.* 105S, 25-39
- Filby, A.L. and Tyler, C.R. 2007. Appropriate 'housekeeping' genes for use in expression profiling the effects of environmental estrogens in fish. *BMC Mol Biol.* 8, 8-10
- Fossi, M.C., Mauceri, A., Leonzio, C., Ancora, E., Minniti, F., Maisano, M., Lo Cascio, P., Ferrando, S. and Fasulo, S. 2005. Stress factors in the gills of *Liza aurata* (Perciformes, Mugilidae) living in polluted environments. *J. Zool.* 72(4), 285 - 292

- García-López, A., Sánchez-Amaya, M.A., and Prat, F. 2011. Targeted gene expression profiling in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.) follicles from primary growth to late vitellogenesis *Comp. Biochem. phys., part A.* 160, 374–380
- Hashimoto, J.G., Beadles-Bohling, A.S. and Wiren, K.M. 2004 Comparison of RiboGreen® and 18S rRNA quantitation for normalizing real-time RT-PCR expression analysis. *BioTechniques* 36, 54-60
- Hoock, T.C., Newcomb, P.M., Herman, I.M. 1991. Beta actin and its mRNA are localized at the plasma membrane and the regions of moving cytoplasm during the cellular response to injury. *J. Cell. Biol.* 112, 653-664.
- Livak, K.J. and Schmittgen, T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods.* 25, 402- 408
- Mauriz, O., Pazos, A.J., Lozano, V., Martinez-Escauriaza R., Perez-Paralle L. and Sanchez J.L. 2008. Molecular cloning of a cDNA encoding putative vitellogenin from the bivalve mollusc *Pecten maximus*. Unpublished.
- McCurley, A.T. and Callard, G.V. 2008. Characterization of housekeeping genes in zebrafish: male-female differences and effects of tissue type, developmental stage and chemical treatment. *BMC Molecular Biology.* 9, 102
- McDonough, C.J.; Roumillat, W.A.; Wenner, C.A. 2005. Sexual differentiation and gonad development in striped mullet (*Mugil cephalus* L.) from South Carolina estuaries. *Fish. Bull.* 103, 601-619
- Merella, P., Garippa, G. 2001. Metazoan parasites of grey mullets (Teleostea:Mugilidae) from the Mistras Lagoon (Sardinia, western Mediterranean). *Sci. Mar.* 65 (3), 201-206.
- Nelson, J.S. 1994. *Fishes of the world.* 3ª edición. John Wiley & Sons, Inc. New York. 600.
- Nelson, D.L. and Cox, M.M. 2005. *Lehninger Principios de Bioquímica.* 4ª edición. Ed. Omega.

- Orbea, A., Ortiz-Zarragoitia, M., Solé, M., Porte, C., Cajaraville, M.P. 2002. Antioxidant enzymes and peroxisome proliferation in relation to contaminant body burdens of PAHs and PCBs in bivalve molluscs, crabs, and fish from the Urdaibai and Plentzia estuaries (Bay of Biscay). *Aquat. Toxicol.* 58, 75-98.
- Otey, C.A., Kalnoski, M.H., Lessard, J.L., Bulinski J.C. 1986. Immunolocalization of the gamma isoform of nonmuscle actin in cultured cells. *J. Cell. Biol.* 102, 1726-1737.
- Pfaffl, M.W., Tichopad, A., Prgomet, C. and Neuvians, T.P. 2004. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper–Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol. Lett.* 26(6), 509-515.
- Ponchel, F., Toomes, C., Bransfield, K., Leong, F. T., Douglas, S.H., Field, S.L., Bell, S. M., Combaret, V., Puisieux, A., Mighell, A.J., Robinson, P.A., Inglehearn, C.F., Isaacs J.D., and Markham, A.F. 2003. Real-time PCR based on SYBR-Green I fluorescence: An alternative to the TaqMan assay for a relative quantification of gene rearrangements, gene amplifications and micro gene deletions. *BMC Biotechnol.* 3, 18.
- Puy-Azurmendi, E., Ortiz-Zarragoitia, M., Villagrasa, M., Kuster, M., Aragón, P., Atienza, J., Puchades, R., Maquieira, A., Domínguez, C., López de Alda, M., Fernandes, D., Porte, C., Bayona, J.M., Barceló, D., Cajaraville, M.P. 2013. Exposure and effects of endocrine disruptors in thicklip grey mullet (*Chelon labrosus*) from the Urdaibai Biosphere Reserve (Bay of Biscay). *Sci. Total Environ.* 443, 233-244
- Raingard, D., Cancio, I., Cajaraville, M.P. 2006. Cloning and expression pattern of peroxisome proliferator-activated receptor α in the thicklip grey mullet *Chelon labrosus*. *Mar Environ Res* 62, 113-117.
- Rhinn, H., Marchand-Leroux, C., Croci, N., Plotkine, M., Scherman, D. and Escriou V. 2008. Housekeeping while brain's storming Validation of normalizing factors for gene expression studies in a murine model of traumatic brain injury. *BMC Molecular Biology* 9, 62

- Rojo-Bartolomé, I., Diaz de Cerio, O., Martos-Bernal, J., Bilbao, E., Ortiz-Zarragoitia M., Cancio I. 2012. 5S to 18S rRNA ratio in gonads as an easy and inexpensive index for the identification of sex in a pollution sentinel fish species (*Chelon labrosus*). *Comp. Biochem. phys., part A.* 163, S55–S60
- Rubenstein, P.A. 1990. The functional importance of multiple actin isoforms. *Bioessays* 12, 309-315.
- Sellars, M.J., Lyons, R.E., Grewe, P.M., Vuocolo, T., Leeton, L., Coman, G.J., Degnan, B.M. and Preston, N.P. 2007. A PL10 vasa-like gene in the kuruma shrimp, *Marsupenaeus japonicus*, expressed during development and in adult gonad. *Mar Biotechnol.* 9(3), 377-87.
- Snape J.R., Maund S.J., Pickford D.B. and Hutchinson T.H. 2004. Ecotoxicogenomics: the challenge of integrating genomics into aquatic and terrestrial exotoxicology. *Aquat. Toxicol.* 67, 143-154.
- Turan, C., Caliskan, M., Kucuktas, H. 2005. Phylogenetic relationships of nine mullet species (*Mugilidae*) in the Mediterranean Sea. *Hydrobiol.* 532, 45-51.
- Valasek, M.A. and Repa J.J. 2005. The power of real-time PCR. *Adv. Physiol. Educ.* 29, 151-159.
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A. and Speleman F. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 2002 18-3
- VanGuilder, H.D., Vrana, K.E. and Freeman, W.M. 2008. Twenty- five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *BioTechniques* 44, 619- 626
- Wittwer, C.T., Herrmann, M.G., Moss, A.A. and Rasmussen, R.P., 1997. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *BioTechniques* 22, 130-138.

ERANSKINAK

1. ERANSKINA

GAPDH genea anplifikatzeko hasle andeatuen diseinua:

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

```

Platichthys-flesus      CCCCCACTCACACCCGGAGTCACAAGACAGACTGAGGCATCTCACAAAACG 50
Dicentrarchus-labrax    -----
Takifugu-rubripes      -----
Kryptolebias-marmoratus -----
Oreochromis-niloticus  -CGCAGAGTACATGGGGGCACACAACCTCAA---GAAGCATCATCCGTGAG 46

```

```

Platichthys-flesus      AGGACTAGACCTACCC-----AGACAAAATGGTGAAA-----GTT 85
Dicentrarchus-labrax    -----ATGGTGAAA-----GTC 12
Takifugu-rubripes      -----ATGGTCAA-----GTT 12
Kryptolebias-marmoratus -----ATGGTGAAA-----GTC 12
Oreochromis-niloticus  GTTACTCCGCACTCCCTAAGCAGCAGCCACCATG-TCAGACCTCTGTGTT 95
                        *** * * * * **

```

```

Platichthys-flesus      GGTATCAATGGATTTCGGCCGCATCGGTGCGCTGGTGACCAGAGCAGCCTT 135
Dicentrarchus-labrax    GGTATCAATGGATTTCGGCCGCATCGGTGCGCTGGTGACCCGTGCTGCTTT 62
Takifugu-rubripes      GGCATCAACGGATTTCGGCCGTATCGGCCGTCTGGTGACTCGTGTGCTTT 62
Kryptolebias-marmoratus GGTATCAATGGATTTGGCCGCATTTGGTCTGCTGGTGACCCGCGCTGCCAT 62
Oreochromis-niloticus  GGAATCAATGGATTTGGTTCGCATTGGCCGCTGGT--CCTGAG-GGCTT- 141
** ***** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** * * * **

```

```

Platichthys-flesus      CACCTCCAAGAAGGTG--GAGATCGTGGCCATCAACGACCCCTTCATCGA 183
Dicentrarchus-labrax    CACCTCCAAGAAGGTG--GAGATTGTGGCCATCAATGACCCCTTCATCGA 110
Takifugu-rubripes      CACCTCCAAGAAGGTG--GAAATTGTGGCCATCAATGACCCCTTCATTGA 110
Kryptolebias-marmoratus CCTCAGCAAGAAGGTG--GAGATTGTGGCCATCAATGACCCATTTCATCGA 110
Oreochromis-niloticus  -GCCTTCAGAAGGGCATCAAGGTTGTGGCCATCAATGACCCCTTCATTGA 190
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

Fw1

```

Platichthys-flesus      CCTGGAGTACATGGTCTACATGTTCAAGTATGACTCCACCCACGGTCGCT 233
Dicentrarchus-labrax    CCTGGAGTACATGGTCTACATGTTCAAGTATGACTCCACCCACGGCCGCT 160
Takifugu-rubripes      CCTGGAGTACATGGTCTACATGTTCAAGTATGACTCCACCCACGGCCGCT 160
Kryptolebias-marmoratus CCTGGAGTACATGGTCTACATGTTCAAGTATGACTCCACTCACGGCCGTT 160
Oreochromis-niloticus  CCTGCAGTACATGGTTTACATGTTCAAGTACGACTCCACCCATGGCCGTT 240
**** ***** ***** ***** ***** ** * * * *

```

Platichthys-flesus TCCACGGTCAGGTCAGTGTGAGGGAGACAAGCTGGTCATCGATGGACAC 283
 Dicentrarchus-labrax TCAAGGGTGAGGTCAAGGTTGAGGGTGACAAGCTGGTCGTCGATGGACAC 210
 Takifugu-rubripes TCAAGGGTGAGGTGAAGGCCGAGGGTGGCAAGCTGGTCGTCGATGGACAT 210
 Kryptolebias-marmoratus TCCATGGAGAAGTCAAGGCTGAGGGAGACAACTTGTTCATTCGATGGACAC 210
 Oreochromis-niloticus ACCGTGGTGAAGTGTCTGCAGATAATGGCAAACCTTGTTCGTCGATGGCCAA 290

* ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *

Platichthys-flesus AAAATCTCAGTTTTCCACGAGAGGGACCCCGCCAACATCAAATGGGGGGA 333
 Dicentrarchus-labrax AAAATCAGCGTTTTCCACGAGAGGGACCCCGCCAACATCAAATGGGGTGA 260
 Takifugu-rubripes GCCATCACCGTTTTCCACGAGAGGGACCCCACTAACATTAATGGGGTGA 260
 Kryptolebias-marmoratus AAAATCAGCGTCTTCCATGAGAGGGACCCCACTAACATCAAATGGGGTGA 260
 Oreochromis-niloticus GCCATCTCTGTCTTCCAGTGTATGAAGCCAGCTGAAATCCCCTGGGGCAG 340

*** ** ***** * * * * * * * * * *****

Fw2

Platichthys-flesus TGCTGGTGCCCGTATGTGGTTGAGTCCACCGGTGTCTTACCACCATTG 383
 Dicentrarchus-labrax GGCTGGTGCCAGTACGTGGTTGAGTCCACTGGTGTGTTACCACCATCG 310
 Takifugu-rubripes GGCTGGTGCCAGTATGTGGTTGAGTCCACTGGTGTGTTACCACCATCG 310
 Kryptolebias-marmoratus GGCTGGTGCCAGTACGTGGTGGAGTCCACTGGCGTCTTACCACCATCG 310
 Oreochromis-niloticus CTCTGGAGCCAAATATGTTGTTGAGTCCACTGGAGTTTTCTCAGTGTTC 390

**** ** * * * * * ***** * * * * * * * * * * *

Platichthys-flesus AGAAGGCCTCTGCTCACTTGAAGGGCGGCCAAGAGAGTCATCATCTCT 433
 Dicentrarchus-labrax AGAAGGCCTCTGCTCACTTGAAGGGAGGTGCCAAGAGAGTCGTCATCTCT 360
 Takifugu-rubripes AGAAGGCCTCCGCTCACTTGAAGGGTGGTGCCAAGAGAGTGATCATCTCT 360
 Kryptolebias-marmoratus AGAAGGCCTCTGCTCACTTGAAGGGTGGTGCCAAGAGAGTCATCATCTCC 360
 Oreochromis-niloticus AGAAGGCCTCTCTCACATCCAGGGTGGTGCAAAGCGTGTGGTTGTGTCA 440

***** * ***** * * * * * * * * * * * * * * *

Platichthys-flesus GCTCCCAGCGGACGCTCCCATGTTTCGTCGTTGGCGTGAACCACGAGAA 483
 Dicentrarchus-labrax GCACCCAGCGCTGACGCTCCCATGTTTCGTCATGGGTGTCAACCATGAGAA 410
 Takifugu-rubripes GCACCCAGTGTGATGCCCCATGTTTCGTCATGGGCGTCAACCATGAGAA 410
 Kryptolebias-marmoratus GCCCCAGCGCCGACGCTCCCATGTTTCGTCATGGGCGTCAACCCAGAGAA 410
 Oreochromis-niloticus GCCCCCTCACCCGATGCTCCAATGTTTGTTCATGGGAGTTAATGAGGACAA 490

** *** * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

Platichthys-flesus GTACGAGAACTCCCTCAAGG---TCGTGACGAACGCTTCTGCACAACCA 530
 Dicentrarchus-labrax ATACAGCAATTCCCTCCAG---TTGTCAGCAATGCTTCTGCACAACCA 457
 Takifugu-rubripes GTACGACAAGTCCCTTTCCG---TTGTCAGCAACGCTTCTGCACAACCA 457
 Kryptolebias-marmoratus GTACGACAATCCCTCCAG---TTGTCAGCAATGCTTCTGCACAACCA 457
 Oreochromis-niloticus ATACGACCCTCCTCCATGACTATGTCAGTAATGCCTCCTGCACCACCA 540

*** ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

Platichthys-flesus ACGAGAACATCAAGAAGGTTGTGAAGGCCGCGAGCTGATGGACCCATGAAG 880
 Dicentrarchus-labrax ATGACGACATCAAGAAGGTTGTTAAGGCTGCAGCTGAAGGACCCATGAAG 807
 Takifugu-rubripes ACGACGACATCAAGAAGGTTGTGAAGGCCGCGAGCTGAGGGCCCAATGAAA 807
 Kryptolebias-marmoratus ACGATGACATTAAGAAGGTTGTGAAAGCCGCTGCTGAAGGACCCATGAAG 807
 Oreochromis-niloticus ACGCTGAGATTAAGGAAGCCGTCAAGAAGGCCGCCGAGGGACCCTTGAAA 890

* *

Platichthys-flesus GGCTACCTGGCTTACACCGAGCACCAGGTCGTCTCCTCAGACTTCAACGG 930
 Dicentrarchus-labrax GGCATTCTGGGATACACAGAGCACCAGGTCGTCTCCACAGACTTCAACGG 857
 Takifugu-rubripes GGCATTCTGGGATACACCGAGCACCAGGTTGTGTCCACAGACTTCAACGG 857
 Kryptolebias-marmoratus GGCATTCTGGGATACACCGAGCACCAGGTCGTCTCCACAGACTTCAACGG 857
 Oreochromis-niloticus GGAGTGCTGGGTTACACCGAGGACCAGGTGGTGTCTCTGATTTTCATCGG 940

** *

Rv1

Platichthys-flesus CGACACCCACTCCTCCATCTTTGATGCTGGCGCTGGCATCGCCCTCAATG 980
 Dicentrarchus-labrax TGACACTCACTCCTCCATCTTTGATGCTGGTGCTGGCATCGCCCTCAACG 907
 Takifugu-rubripes CGACACCCACTCCTCCATCTTTGATGCTGGTGCTGGCATCGCCCTCAACG 907
 Kryptolebias-marmoratus CGACACCCACTCCTCAATCTTTGATGCTGGCGCTGGCATCGCTCTCAACG 907
 Oreochromis-niloticus TGATACCCATTCTTCCATCTTTGATGCTGGTGCTGGCATCGCCCTCAATG 990

** *

Platichthys-flesus ACCACTTTGTCAAGCTGGTCTCTTGGTACGACAACGAGTTTGCCTACAGC 1030
 Dicentrarchus-labrax ACCACTTTGTCAAGCTGGTCACATGGTACGACAATGAATTTGGCTTACAGC 957
 Takifugu-rubripes ACCACTTCGTCAAGCTGGTCACATGGTACGACAATGAGTTTGGCTTACAGC 957
 Kryptolebias-marmoratus ACCACTTTGTCAAGCTCGTTTCATGGTATGACAACGAGTTCGGCTTACAGC 957
 Oreochromis-niloticus ACAACTTTGTCAAGCTCATTTCTGGTATGATAATGAGTACGGCTTACAGC 1040

2. ERANSKINA

GAPDH genearentzako hasle espezifikoaren diseinua:

Sekuentziatuetatik lortutako emaitzak ClustalW2 programa informatikoa erabiliz lerokatu ziren. Hasteko, hasleek anplifikatutako erreplikak beraien artean eta *Oplegnathus fasciatus* sekuentziarekin lerokatu ziren eta homologoenak aukeratu ziren. Gero, aukeraturako A-B eta C-D hasleen sekuentziak *O. fasciatus*-en sekuentziarekiko lerokatu ziren.

Morez azaltzen diren baseak A eta C sekuentzietan desberdinak direla esan nahi du.

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

```
C1-Fw1 -----
Oplegnathus_fasciatus CCTTCATTGACTTGACAGTACATGGTCTACATGTTCAAGTATGACTCCACC 200
AB_bateratua -----ACT 3
```

```
C1-Fw1 -----AGGGTGACAAGCTGGTCAT 19
AB_bateratua CACGGCCGCTTACAGGGTGAGGTGAGCCAGGATGATGGCAAGCTAGTGGT 53
Oplegnathus_fasciatus CACGGCCGCTTACCATGGTGAGGTCTCCCAAGAGGATGGCAAGCTCGTCGT 250
```

Fw

```
C1-Fw1 CGA TGGACACAAAATCTCTGT TTTCCATGAGAGGGA CCCCACCAACATCA 69
AB_bateratua CGA TGGAAACGCCATCTCTGT CTTCAGTGTATGAA CCGAGCTGAGATCC 103
Oplegnathus_fasciatus CGATGGCAACGCCATCTCTGTCTTCCAGTGTATGAAGCCAGCAGAGATCC 300
```

```
C1-Fw1 AATGGGGCGATGCCGGTGGCCAGTATGTTGGTGGAGTCCACTGGTGTGTTC 119
AB_bateratua CCTGGGGCAGTGC TGGAGCCAAATACGT TGTGAGTCCACTGGAGTCTTC 153
Oplegnathus_fasciatus CCTGGGGCAGTGTCTGGAGCCAAGTACGTTGTGAGTCCACTGGAGTCTTC 350
```

```
C1-Fw1 ACCACCATGAGAAA GCCTCTGCTCATCTCAAGGTTGGTGCCAGAGAGT 169
AB_bateratua CTCAGTGTAGAGAAA GCCTCTCTCACTCCAGGCGGTGCAAGAGCGT 203
Oplegnathus_fasciatus CTCAGTGTGGAGAAA GCCTCTTCTCACCTCCAGGCGGTGCTCAGCGTGT 400
```

```
C1-Fw1 CATCATCTCCGCA CCGAGCGCTGATGCTCCATGTTTCGTCATGGGTGTCA 219
AB_bateratua GGTGTGTCCTCGCTCCCTCACCGAGCCCAATGTTTCGTCATGGGAGTTA 253
Oplegnathus_fasciatus GGTGTGTCCTGCCCCATCACCTGATGCTCCAATGTTTGTGTCATGGGAGTTA 450
```

Rv

```
C1-Fw1 ACCACGAGAAGTACGA CAACTCCCTCAAGG--TTGTCA GCAA TGT TCC 265
AB_bateratua ACGAGGACAAATACGAC CCTCTCCCTCATGACCATTGTGTCAGCAACGCCCTCC 303
Oplegnathus_fasciatus ACGAGGACAAATACGACCCCTCTCCATGACCATCGTCAGCAATGCCCTCC 500
```

```
C1-Fw1 TGCACAACAAACTGCCTGGCA CCCCATGGCCAAAGTCCATCCACGATAACTT 315
AB_bateratua TGTACCACAAACTGCCTGGCT CCCCATGGCCAAAGTCCATCCACGATAACTT 353
Oplegnathus_fasciatus TGCACCACCAACTGCCTGGCCCCCTGGCCAAAGTCCATCCATGATAACTT 550
```


3. ERANSKINA

Tata box binding (TBP) proteina kodetzen duen genea anplifikatzeko hasle andeatuak:

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

```

Takifugu-rubripes      -----ATGGACCAGAAT 12
Oryzias-latipes       TAGTGGTTGGCAGTGTGGAACGGGAGAAGCACAAAACATGGACCAAAC 50
Oreochromis-mossambicus -----

Takifugu-rubripes      AACAGTATACCAGGCTTCCAAGGACTGGCATCCCCCAGGGCGCCATGAC 62
Oryzias-latipes       AACAGCATCCAAGCCTTTC AAGGCTGGCTTCACCTCCGGGTGTGATGAC 100
Oreochromis-mossambicus -----

Takifugu-rubripes      ACCAAGTATGCCTATCTTCAGTCCTATGATGCCGTATGGCTCGGGCCTGA 112
Oryzias-latipes       CCCAACCATGCCAGTGTTCAGTCCCATGATGCCGTACGGCTCGGGCCTCA 150
Oreochromis-mossambicus -----ATATGGCTCTGGTCTGA 17
                          .** ***** ** ** *

```

Fw1

```

Takifugu-rubripes      CACCCCAACCTGTCCAGAACACCAACAGTTTGTCTATACTGGAGGAACAG 162
Oryzias-latipes       CGCCCCAGCCAGTACAAAACACAAACAGTTTGTCCATACTGGAGGAGCAG 200
Oreochromis-mossambicus CACCCAGCCAGTGCAGAACACCAACAGTTTGTCAATACTGGAGGAACAG 67
                          *.*****.**:** ** .*****.***** *****.***

Takifugu-rubripes      CAGAGGCAGCAAC-----AGCAACAACAAGCACAGCAGGCA-- 198
Oryzias-latipes       CAGAGGCAACAGCGACAACAACAGCAGCAGCAACAACACAGCAGTTG-- 248
Oreochromis-mossambicus CAGAGGCAACAGCAGGCTCAGCAACAGCAGCAACAGGCAACAACAGGC 117
                          *****.**. *          ****.*****.****.***

Takifugu-rubripes      AACACAGGGATTC-CTGGAACATCAGGAACAACCCACAGCTTTTCCATT 247
Oryzias-latipes       AACACAGGTCTTC-CAGGAGCATCAGGACAGACTCCACAGCTCTTTCATT 297
Oreochromis-mossambicus ACAACAGGCCAGCTCAGGGACGTCGGGGCAGACCCCTCAACTTTTCCACT 167
                          *.***** .: * **:*. * **.*...** **:*** ** ** *

Takifugu-rubripes      CCCAGGCAGTTGCAGGCACAACAACCACAGCGCTACCAGGAAATACGCCA 297
Oryzias-latipes       CTCAGCCAGTACCAGGTTCAACTACCACTGCGCTACCGGGGAACACCCCG 347
Oreochromis-mossambicus CCCAGGCAGTGGGAGGCTCGACCACAACACTGCACTGCCAGGAAACACCC 217
                          * ** * **   ** :* ** ** **:*** **.* ** ** **

Takifugu-rubripes      CTGTACAACACCCCACTGACTCCCTATGACCCCAATTACACAGCCACACC 347
Oryzias-latipes       CTCTACAGCGCTCCGGTGACGCTATGACCCCATCGCTCCAGCAACACC 397
Oreochromis-mossambicus CTCTTACCACCCCGTGACCCCATGACCCCATCAGCCCGGCCACCC 267
                          ** *:** *. * ** . **** ** *****. ** . * **.* ** **

```

Fw2

Takifugu-rubripes AGCTTCAGAGAGCTCTGGGATTGTACCACAGCTACAAAACATAGTATCTA 397
 Oryzias-latipes TGCCTCAGAGAGCTCTGGCATCGTACCACAGCTACAAAACATAGTTTCTA 447
 Oreochromis-mossambicus TGCTTCA**GAAACCTCTGGCATAGTACC**GCAGCTACAAAATATAGTATCTA 317
 : ** ***** * ***** ** ***** .***** ***** ***** : **

Takifugu-rubripes CAGTAAATCTGGGCTGTAAACTGGATTAAAGACAATTGCTCTGAGAGCC 447
 Oryzias-latipes CTGTAAATCTGGGTTGTAAATGGACCTGAAGACTATTGCCTTAAGAGCC 497
 Oreochromis-mossambicus CTGTAAACTTAGGCTGTAAACTGGATTGAAGACCATTGCCCTGAGAGCC 367
 * : ***** * . ** ***** **** * . ***** ***** * . *****

Takifugu-rubripes AGGAATGCAGAATACAATCCAAGCGTTTTGCTGCTGTCATCATGAGAAT 497
 Oryzias-latipes AGGAATGCTGAATACAACCCAAGCGTTTTGCTGCAGTCATTATGAGAAT 547
 Oreochromis-mossambicus AGAAATGCAGAATACGACCCAAGCGTTTTGCTGCCGTCATCATGAGAAT 417
 ** . ***** : ***** . * ***** ***** ***** *****

Takifugu-rubripes ACGAGAACCAGGACTACTGCTCTCATTTTCAGTTCTGGGAAGATGGTCT 547
 Oryzias-latipes ACGAGAACCAAGAACTACAGCTCTCATCTTCAGCTCTGGGAAGATGGTCT 597
 Oreochromis-mossambicus ACGAGAGCCAGGACCACTGCTCTGATCTTCAGCTCTGGAAAGATGGTCT 467
 ***** . ** . ** . ** ** : ***** ** ***** ***** . *****

Takifugu-rubripes GCACAGGAGCCAAGAGTGAGGAGCAGTCAAGGTTAGCTGCCAGAAAATAC 597
 Oryzias-latipes GCACTGGAGCCAAAAGTGAGGAACAGTCCAGGTTAGCAGCTAGAAAATAT 647
 Oreochromis-mossambicus GCACAGGAGCCAAGAGTGAGGAGCAGTCGAGGTTAGCAGCCAGAAAATAT 517
 **** : ***** . ***** . ***** ***** ***** : ** *****

Rv2

Takifugu-rubripes GCTCGTGTGGTGCAGAAGCTTGGCTTTCTGCTAAGTTCTTGGACTTTAA 647
 Oryzias-latipes GCCCGTGTGGTGCAAAAGCTCGGTTTTCTGCAAAGTTTTTGGACCTCAA 697
 Oreochromis-mossambicus GCGCGTGT**GTGCAGAAGCTCGGTTTTCC**CGCCAAGTTCTTGGACTTCAA 567
 ** ***** ***** . ***** ** ***** ** ***** ***** * **

Takifugu-rubripes AATACAAAACATGGTGGGAAGCTGTGATGTGAGGTTCCCAATCCGACTGG 697
 Oryzias-latipes GATTCAAAACATGGTGGGCACTGTGATGTCAAGTTTCCCATTCGCTGG 747
 Oreochromis-mossambicus GATTCAGAACATGGTGGGCAACTGTGATGTGAAGTTCCCATTCGGCTGG 617
 . ** : ** . ***** ***** . * . ***** * . *** ** . ** ** *****

Rv1

Takifugu-rubripes AAGGATTAGTCTGACGCATCAGCAGTTTAGCAGCTATGAACCAGAGCTT 747
 Oryzias-latipes AAGGACTGGTCTCACACATCAGCAGTTCAGCAGCTATGAGCCGGAGCTT 797
 Oreochromis-mossambicus AGGGATTGGTCTCACACATCA**GCAGTTTAGCAGCTACGAGC**CGGAGCTG 667
 * . *** * . ***** ** . ***** ***** ***** ***** * . ** . *****

4. ERANSKINA

Tata box binding proteina (TBP) kodetzen duen genea anlifikatzeko hasle andeatuen bigarren diseinua (laugarren saiakera):

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

Fw1

```

Chionodraco-rastrospinosus -----GGAGGAGCAG 10
Chaenocephalus-aceratus -----GGAGGAGCAG 10
Notothenia-coriiceps -----GGAGGAGCAG 10
Oreochromis-mossambicus CACCCAGCCAGTGCAGAACACCAACAGTTTGTCAATACTGGAGGAACAG 67
Takifugu-rubripes CACCCCAACCTGTCCAGAACACCAACAGTTTGTCTATACTGGAGGAACAG 162
Oryzias-latipes CGCCCAGCCAGTACAAAACACAAACAGTTTGTCCATACTGGAGGAGCAG 200
***** ***

```

```

Chionodraco-rastrospinosus CAGCGACAGCAGCAG-----CAGCAACAGGCACAGCA---GGC 45
Chaenocephalus-aceratus CAGCGACAACAGCAA-----CAGCAACAGGCACAGCA---GGC 45
Notothenia-coriiceps CAGCGACAGCAGCA-----GCAACAGGCACAGCA---GGC 42
Oreochromis-mossambicus CAGAGGCAACAGCAGGCTCAGCAACAGCAGCAACAGGCACAACAACAGGC 117
Takifugu-rubripes CAGAGGCAGCAACAG-----CAACAACAAGCAGCA---GGC 197
Oryzias-latipes CAGAGCCACAGCGACAACAACAGCAGCAGCAACAACAACAGCA---GTT 247
*** * ** * * * ***** ** *

```

```

Chionodraco-rastrospinosus AAACGCAGGTCTTCCT-GGAACGTCGTCGGGGCTAACCCCTCAGCTTTAC 94
Chaenocephalus-aceratus AAACGCAGGTCTTCCT-GGAACGTCGTCGGGGCTAACCCCTCAGCTTTAC 94
Notothenia-coriiceps AAACGCAGGTCTTCCT-GGAACGTCA---GGGCTAACCCCTCAGCTTTAC 88
Oreochromis-mossambicus ACA-ACAGCCAGCTCAGGGACGTCG---GGGCAGACCCCTCAACTTTTC 163
Takifugu-rubripes AAACACAGGGATTTCCT-GGAACATCA---GGAACAACCCACAGCTTTTC 243
Oryzias-latipes GAACACAGGTCTTCCA-GGAGCATCA---GGACAGACTCCACAGCTCTTT 293
* **** * ** * ** ** ** ** *

```

```

Chionodraco-rastrospinosus CATTCCCAGACGGTTGCAGGCTCGACCACCACAGCGCTGCCAGGGAACAC 144
Chaenocephalus-aceratus CATTCCCAGACGGTTGCAGGCTCGACCACCACAGCGCTGCCAGGGAACAC 144
Notothenia-coriiceps CATTCCCAGACGGTTGCAGGCTCGACCACCACAGCGCTGCCAGGGAACAC 138
Oreochromis-mossambicus CACTCCCAGGCAGTGGGAGGCTCGACCACAACAGCACTGCCAGGAAACAC 213
Takifugu-rubripes CATTCCCAGGCAGTTGCAGGCACAACAACCACAGCGCTACCAGGAAATAC 293
Oryzias-latipes CATTCTCAGCCAGTACCAGGTTCAACTACCACTGCGCTACCAGGGAACAC 343
** ** ** * ** *** * ** * ** * ** * ** *

```

```

Chionodraco-rastrospinosus CCCGCTCTACAACACCCCGCTGACCCCATGACCCCATCACACCGGCAA 194
Chaenocephalus-aceratus CCCGCTCTACAACACCCCGCTGACCCCATGACCCCATCACACCGGCAA 194
Notothenia-coriiceps CCCGCTCTACAACACCCCGCTGACCCCATGACCCCGCCACACCGGCAA 188
Oreochromis-mossambicus CCCCTCTTACCACCCCGCTGACCCCATGACCCCATCACGCGGCCA 263
Takifugu-rubripes GCCACTGTACAACACCCCACTGACTCCTATGACCCCAATTACACAGCCA 343
Oryzias-latipes CCCGCTCTACAGCGCTCCGGTGCAGCCTATGACCCCATCGCTCCAGCAA 393
** * * * * * * * * * * * * * * *

```



```

Chionodraco-rastrospinosus ATACGCTCGTGTGGTGCAGAAGCTCGGCTTTCCTGCTAAGTTCTTGGACT 494
Chaenocephalus-aceratus ATACGCTCGTGTGGTGCAGAAGCTCGGCTTTCCTGCTAAGTTCTTGGACT 494
Notothenia-coriiceps ATACGCTCGTGTGGTGCAGAAGCTCGGCTTTCCTGCTAAGTTCTTGGACT 488
Oreochromis-mossambicus ATATGCGCGTGTGTGCAGAAGCTCGGTTTTCCCGCCAAGTTCTTGGACT 563
Takifugu-rubripes ATACGCTCGTGTGGTGCAGAAGCTTGGCTTTCCTGCTAAGTTCTTGGACT 643
Oryzias-latipes ATATGCCCGTGTGGTGCAAAAGCTCGGTTTTCTGCAAAGTTTTTGGACC 693
*** ** ***** ***** ***** ** ***** ** ***** *****

```

```

Chionodraco-rastrospinosus TTAAGATCCAGAACATGGTGGG-----ATC--- 519
Chaenocephalus-aceratus TCAAGATCCAGAACATGGTGGG-----ATCCA- 521
Notothenia-coriiceps TTAAGATCCAGAACATGGTGGG-----ATCC-- 514
Oreochromis-mossambicus TCAAGATTCAGAACATGGTGGGCAACTGTGATGTGAAGTCCCCATTCGG 613
Takifugu-rubripes TTAAAATACAAAACATGGTGGGAGCTGTGATGTGAGGTCCCAATCCGA 693
Oryzias-latipes TCAAGATTCAAAACATGGTGGGCAAGTTGTGATGTCAAGTTCCCATTCGT 743
* ** ** ** ***** ** **

```