Archive of SID

فیزیولوژی و بیوتکنولوژی آبزیان
سال سوم، شماره اول، بهار ۱۳۹۴

مطالعه بیان ژن‌های پرتوانی در مراحل مختلف تکوین جنینی ماهی گورخری (*Danio rerio*)

امیر حسین اسماعیلی[۱]، محمد رضا کلباسی[۲]*، حسین بهاروند[۳]*، سیده نفیسه حسنی[۴]

تاریخ دریافت: اسفند ۹۳ تاریخ پذیرش: اردیبهشت ۹۴

چکیده

اگرچه نشانگرهای پرتوانی در پستانداران به خوبی شناخته شده‌اند، اما هنوز دانش ما در مورد این نشانگرها در ماهیان و دیگر آبزیان اندک است. در این راستا، بیان ژن‌های oct4، nanog، klf4، lin28، c-myc و sox2 که به عنوان هسته مرکزی پرتوانی در موجودات مختلف گزارش شده‌اند، در مراحل مختلف تکوین جنینی ماهی گورخری، شامل مراحل مورولا (۷۱ درجه‌ساعت)، بلاستولای میانی (۱۰۵/۵ درجه‌ساعت)، گاسترولا (۳۱۰ درجه‌ساعت) و سگمنتاسیون (۶۸۴ درجه‌ساعت)، مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج بررسی بیان کمی ژن با استفاده از تکنیک Real Time PCR نشان داد که در بلاستولای میانی ژن‌های lin28، klf4 بیش‌ترین بیان معنی‌دار و ژن‌های oct4، c-myc بیش‌ترین بیان غیرمعنی‌دار را داشتند. علاوه بر این، ژن sox2، که به عنوان یکی از عوامل پرتوانی در موش و انسان شناخته شده است، در ماهی گورخری بعد از مرحله گاسترولا به اوج بیان خود رسید. همچنین نشانگر nanog در مرحله مورولا بیش‌ترین بیان را داشته و در مراحل دیگر تفاوتی در بیان این ژن دیده نشد. بنابراین مهم‌ترین عوامل پرتوانی در ماهی گورخری ژن‌های lin28 ، klf4، oct4 و c-myc هستند که در مرحله بلاستولای میانی به حداکثر بیان خود می‌رسند. ژن sox2 در این ماهی به عنوان مارکر پرتوانی مطرح نیست و احتمالا در فرآیند تمایز دخیل است از طرفی با توجه به الگوی بیانی nanog، به نظر می‌رسد که این ژن نقش دیگری غیر از عملکرد پرتوانی در این گونه داشته باشد.

واژگان کلیدی: *بیان ژن، پرتوانی، تکوین جنینی، ماهی گورخری.*

۱- دانشجوی دکتری، گروه شیلات، دانشکده علوم دریایی و منابع طبیعی، دانشگاه تربیت مدرس، نور، ایران.
۲- استاد گروه شیلات، دانشکده علوم دریایی و منابع طبیعی، دانشگاه تربیت مدرس، نور، ایران.
۳- استاد گروه سلول های بنیادی و زیست‌شناسی تکوینی، مرکز تحقیقات علوم سلولی، پژوهشکده زیست‌شناسی و فناوری سلول‌های بنیادی جهاددانشگاهی، پژوهشگاه رویان، تهران، ایران.
۴- استادیار گروه سلول های بنیادی و زیست‌شناسی تکوینی، مرکز تحقیقات علوم سلولی، پژوهشکده زیست‌شناسی و فناوری سلول‌های بنیادی جهاددانشگاهی، پژوهشگاه رویان، تهران، ایران.
* نویسنده مسئول: kalbassi_m@modares.ac.ir و baharvand@Royaninstitute.org

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

تمرکز بر ماهی گورخری در مطالعات زیست‌شناسی مهره‌داران به عنوان یک زمینه جدید و قابل توجه به طور چشم‌گیری روبه‌رشد است. مزایای این گونه، از قبیل اندازه کوچک، لقاح خارجی، سهولت پرورش و نگهداری، دوره جنینی کوتاه (۹۶ ساعت) و زمان کوتاه بلوغ و تکثیر، موجب شده تا ماهی گورخری به عنوان یکی از حیوانات مهم آزمایشگاهی برای مطالعات ژنتیکی، ریخت‌زایی و بیماری‌ها مطرح شود (Stern and Zon, 2003). همچنین، به دلیل تولید جنین‌های شفاف، این گونه در بررسی‌های تکوینی نیز بسیار مورد توجه قرار گرفته است (Pelegri and Mullins, 2004). در سال ۱۹۸۱ به دنبال جداسازی و کشت توده سلولی داخل جنینی[1] از بلاستوسیست‌های در حال تکوین موش، واژه سلول‌های بنیادی جنینی[2] پیشنهاد شد (Evans and Kaufman 1981). سلول‌های بنیادی پرتوان، سلول‌هایی هستند که در کنار توان خودنوزایی، توانایی تمایز به انواع سلول‌ها در شرایط آزمایشگاهی و حتی دودمان زایا پس از پیوند به جنین میزبان را نیز داشته باشند. مطالعه بر روی تولید سلول‌های بنیادی جنینی ماهی گورخری از سال ۱۹۹۲ آغاز شده است و لایه‌های تغذیه‌کننده فراوانی تاکنون برای کشت این سلول‌ها معرفی شده‌اند، در موفق‌ترین مطالعه، سلول‌های کشت شده بر روی رده سلولی RTS34st تا ۶ پاساژ پرتوانی و توانایی انتقال به دودمان زایا را در خود حفظ کردند (Fan et al., 2004). در بحث تولید سلول‌های بنیادی جنینی به روش عاری از لایه تغذیه‌کننده نیز تاکنون پیشرفت اندکی وجود داشته است و پس از سال‌ها تلاش، تنها در یک مطالعه، آن هم به صورت اتفاقی و تکرار ناپذیر، یک رده سلولی ایجاد شده است (Ho et al., 2014). استفاده از ریزمولکول‌های PD184352 که مسیر پیام رسانی MEK1 و CHIR99021 که مسیر GSK3 را به عنوان دو مسیر تمایزی مهار می‌کنند و باعث حفظ پرتوانی می‌شوند نیز کمکی به این فرآیند نکرده است به طوری که استفاده از آن‌ها در محیط کشت تنها به مدت یک هفته موجب حفظ پرتوانی شده است (Robles et al., 2011). بنابراین در مطالعات گذشته می‌توان این احتمال را مطرح کرد که به جای سلول‌های بنیادی جنینی، رده سلول‌های بلاستولایی تولید شده است (Xing

1- ICM
2- Embryonic Stem Cells (ESC)

www.SID.ir

Archive of SID

et al., 2008). بخشی از این ناکامی‌ها به کمبود مطالعات لازم در مورد عوامل پرتوانی ماهی گورخری مرتبط می‌شود؛ چرا که مکانیسم عملکرد عوامل پرتوانی در گونه‌ها و جانوران مختلف الزاماً یکسان نیست. به عنوان مثال، آنتی‌ژن سطحی SSEA1 یک عامل پرتوانی در موش محسوب می‌شود، در انسان به عنوان یک عامل تمایز مطرح است (Shamblott et al., 1998; Brambrink et al., 2008). در پستانداران، پرتوانی به صورت گسترده‌ای مورد بررسی قرار گرفته تا جایی که امروزه تولید سلول‌های بنیادی جنینی در پستانداران کاملاً امکان‌پذیر و کاربردی شده است. هسته مرکزی عوامل رونویسی دخیل در پرتوانی سلول‌های بنیادی جنینی، عوامل oct4، sox2، nanog، klf4، c-myc و lin28 هستند که بیان چندین هزار ژن را کنترل می‌کنند (Yu et al., 2007). اهمیت این عوامل رونویسی در پرتوانی با فرایند بازبرنامه‌ریزی سلول‌های پیکری انسانی و موشی و ایجاد سلول‌های پرتوان القایی بسیار پررنگ‌تر از قبل شده است (Yu et al., 2007). دانش درباره مارکرهای پرتوانی در ماهیان بسیار ناچیز است و همین امر محدودیت‌های فراوانی را در مسیر تولید سلول‌های بنیادی جنینی در این موجودات ایجاد کرده است به طوری که تاکنون سلول‌های بنیادی جنینی واقعی در این موجودات تولید نشده است (Robles et al., 2011). با توجه به این که جنین تمام مهره‌داران در طی تکوین خود از یک دوره موقت پرتوانی عبور می‌کنند، هدف از این مطالعه بررسی بیان ژن‌های شاخص پرتوانی در مراحل مختلف تکوینی ماهی گورخری، در راستای یافتن نشانگرهای پرتوانی و ایجاد زیربنا برای تولید سلول‌های بنیادی جنینی در آبزیان بوده است.

مواد و روش‌ها

گونه مورد مطالعه

در این مطالعه از ماهی گورخری معمولی (*Danio rerio*) موجود در بازار استفاده شد. ابتدا ماهیان مولد جهت آماده‌سازی برای تکثیر در آکواریوم‌های جداگانه، در بخش پرورش ماهیان مدل آزمایشگاه زیست‌شناسی ترمیمی پژوهشکده سلول‌های بنیادی پژوهشگاه رویان، قرار گرفتند و هفته‌ای سه بار به صورت یک وعده روزانه تغذیه شدند. جهت آماده‌سازی برای تکثیر، ماهیان از یک هفته قبل تحت شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی

www.SID.ir

Archive of SID

در دمای ۲۸-۲۶ درجه قرار گرفتند. در این مرحله ماهیان ۳ بار در روز توسط ناپلی آرتمیا و خوراک کنستانتره شرکت بیومار تغذیه می‌شدند. یک ساعت قبل از شروع تاریکی مولدین نر و ماده داخل توری‌های استوانه‌ای با ارتفاع ۲۰ سانتی‌متر و قطر ۳۰ سانتی‌متر قرار داده شدند تا از خورده شدن تخم‌ها پس از تکثیر جلوگیری شود. بلافاصله پس از شروع روشنایی، تکثیر آغاز و تخم‌ها توسط صافی با قطر چشمه ۳۰۰ میکرون جمع‌آوری شدند. تخم‌های جمع‌آوری شده ابتدا توسط آب معمولی شسته شده و سپس به ظروف ۹۰ میلی‌متری استریل حاوی محیط کشت جنینی استریل (کلرید سدیم 5mM، کلرید پتاسیم ۰/۱۷mM، کلرید کلسیم ۰/۳۳mM، سولفات منزیوم ۰/۳۳mM، متیلن بلو ٪۱۰-۵) انتقال داده شدند و در انکوباتور یخچال‌دار در دمای ۲۸/۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند (Westerfield, 1993).

مراحل تکوینی مورد مطالعه

با توجه به این که ماهی گورخری جانوری خون‌سرد است، بنابراین مدت زمان تکوین آن وابسته به دما است. طبق جداول استاندارد و مطالعات انجام شده در مورد مراحل تکوین در دمای مذکور، چهار دوره جنینی شامل دوره مورولایی[1] (۲۵۶ سلولی) ۷۱ درجه‌ساعت، دوره بلاستولای میانی[2] ۱۰۵/۵درجه‌ساعت، مرحله شروع تمایز، گاسترولا ۳۱۰ درجه‌ساعت، سگمنتاسیون و فارنگولا[3] ۶۸۴ درجه‌ساعت، برای مطالعه و مقایسه انتخاب شد (Kimmel et al., 1995).

نحوه نمونه‌برداری و تثبیت نمونه‌ها

برای هر مرحله سه تکرار در نظر گرفته شد و برای هر تکرار ۲۰۰ جنین سالم و دارای مرحله تکوینی یکسان توسط پیپت پاستور در زیر لوپ جدا شد و پس از شستشو به لوله‌های استریل منتقل‌شد. پس از این‌که آب اطراف تخم‌ها توسط پیپت ۱۰۰ میکرون کاملاً خشک شد، به میزان ۱ میلی لیتر TRIzol (Gibco-Invitrogen) به هر لوله اضافه شد و تا روز آزمایش در فریزر ۷۰- نگهداری شد.

ارزیابی بیان ژن‌های مورد مطالعه

استخراج RNA و ساخت DNA مکمل (cDNA)

در مرحله اول RNA جنین‌های ماهی گورخری توسط TRIzol طبق روش ارائه شده

1- Morulla
2- Midblastula (Oblong)
3- Pharyngula

www.SID.ir

Archive of SID

توسط شرکت تولیدکننده استخراج شد. کیفیت و کمیت RNA توسط دستگاه اسپکتوفوتومتر سنجیده شد و سپس به منظور کنترل کیفیت، RNA به دست آمده بر روی ژل ۱ درصد آگارز از نظر سلامت و آلودگی نمونه‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

مولکول‌های cDNA با استفاده از کیت RevertAidTM H Minus First Strand cDNA Fermentase) ساخته شد. بدین منظور، ۰/۲ میکروگرم از RNA برداشته شد و به مخلوطی شامل ۱ میکرولیتر از پرایمر Random Hexamer ۵۰ میلی‌مولار، ۲ میکرولیتر dNTP ۱۰ میلی‌مولار، ۴ میکرولیتر از 5X cDNA Buffer، ۱ میکرولیتر RNase Inhibitor و ۱ میکرولیتر RTase انتقال داده شد. سپس با استفاده از آب مقطر تیمار شده با DEPC به حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر رسانده شد. نمونه‌ها برای انجام رونویسی معکوس به مدت ۵ دقیقه در ۲۵ درجه سانتی‌گراد، ۶۰ دقیقه در ۴۲ درجه سانتی‌گراد و در نهایت به مدت ۵ دقیقه در ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. سپس نمونه‌ها تا زمان استفاده در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

بررسی کمی بیان ژن با استفاده از Real Time PCR

در این مطالعه از دستگاه Real Time PCR مدل Corbett استفاده شد. برنامه زمانی-گرمایی دستگاه در سه مرحله انجام شد. مرحله اول، فعال‌سازی آنزیم و واسرشت‌سازی اولیه DNA مکمل، به صورت ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه، مرحله دوم، دمای ۹۵ درجه به مدت ۱۵ ثانیه و مرحله سوم، دمای ۶۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، برای ۴۰ چرخه متوالی برنامه‌ریزی شد. واکنش‌ها در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر انجام شد. برای هر واکنش ۵ میکرولیتر SYBR Green، ۱ میکرولیتر آغازگر رفت[1] ۱۰ میکرومولار، ۱ میکرولیتر آغازگر برگشت[2] ۱۰ میکرومولار و ۱۱ میکرولیتر آب مقطر و ۲ میکرولیتر نمونه استفاده شد. دمای تکثیر ۶۲ درجه سانتی‌گراد در نظر گرفته شد. بیان نسبی محصولات PCR توسط روش Ct مقایسه‌ای (ΔΔCt) انجام شد. به منظور نرمال کردن نمونه‌ها در روش کمی‌سازی نسبی، از ژن β-*actin* به عنوان یک ژن Housekeeping برای کنترل درونی استفاده شد (Ho et al., 2014). برای هر نمونه سه تکرار

1- Forward Primer
2- Reverse Primer

www.SID.ir

Archive of SID

و یک کنترل بدون الگو (No Template Control (NTC) در نظر گرفته شد. از فرمول ۱ برای محاسبه نسبت استفاده شد. توالی پرایمرها در جدول ۱ آورده شده است.

$$Ratio = \frac{(E_{target})^{\Delta C_T,target(calibrator-test)}}{(E_{ref})^{\Delta C_T,ref(calibrator-test)}}$$

فرمول ۱: محاسبه نسبت

جدول ۱: توالی پرایمرهای استفاده شده جهت بیان ژن‌های پرتوانی مورد مطالعه در ماهی گورخری

نام ژن	Accession Number		توالی آغازگرها 5´-3´	دمای اتصال	طول قطعه سنتز شده
Oct4	**NM1311121**	رفت	**GGTTCGGAAGCCCAGGATT**	۵۵	۵۸
		برگشت	**TGAGCTGAGGGAATGTTTTGC**		
		منبع	**(Robles et al., 2011)**		
Nanog	**NM001098392**	رفت	**CCAAAAGGCCAAAGATGCAG**	۵۷	۱۰۵
		برگشت	**GGAACCCCTTCTCGACTGCT**		
		منبع	**(Ho et al., 2014)**		
Lin28	**NM201091**	رفت	**TACCCAAAAGAGGCGGTCAA**	۵۶	۱۸۴
		برگشت	**CGATTTGCCCTGAGATCCTG**		
		منبع	**(Robles et al., 2011)**		
Klf4	**NM131723**	رفت	**GAACCACTGCGGGCAAAT**	۵۵	۵۶
		برگشت	**GATGGTGGAGTCAGCATCACA**		
		منبع	**(Robles et al., 2011)**		
Sox2	**NM213118,1**	رفت	**ACCCCGGAGGAAAACCAA**	۵۵	۵۴
		برگشت	**CCCGGCAGGGTGTACTTG**		
		منبع	**(Robles et al., 2011)**		
c-myc	**L11710**	رفت	**CCCGGCAGGGTGTACTTG**	۵۶	۶۰
		برگشت	**GATTGTTGCTAGCCTCAAGTCGTA**		
		منبع	**(Robles et al., 2011)**		

پردازش آماری داده‌ها

جهت پردازش آماری داده‌ها از آنالیز واریانس دو طرفه با کمک نرم افزار GraphPad Prism 6.01 استفاده شد. برای مقایسه دو به دو بین هر گروه با گروه شاهد (۲۵۶ سلولی) آزمون فیشر (Fisher's Least Significant Difference (LSD) test) انجام شد. کلیه نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار

www.SID.ir

Archive of SID

بیان شدند و سطح معناداری (P<۰/۰۵) در نظر گرفته شد.

نتایج

بیان نسبی ژن‌های احتمالی مرتبط با پرتوانی در طی تکوین جنینی ماهی گورخری

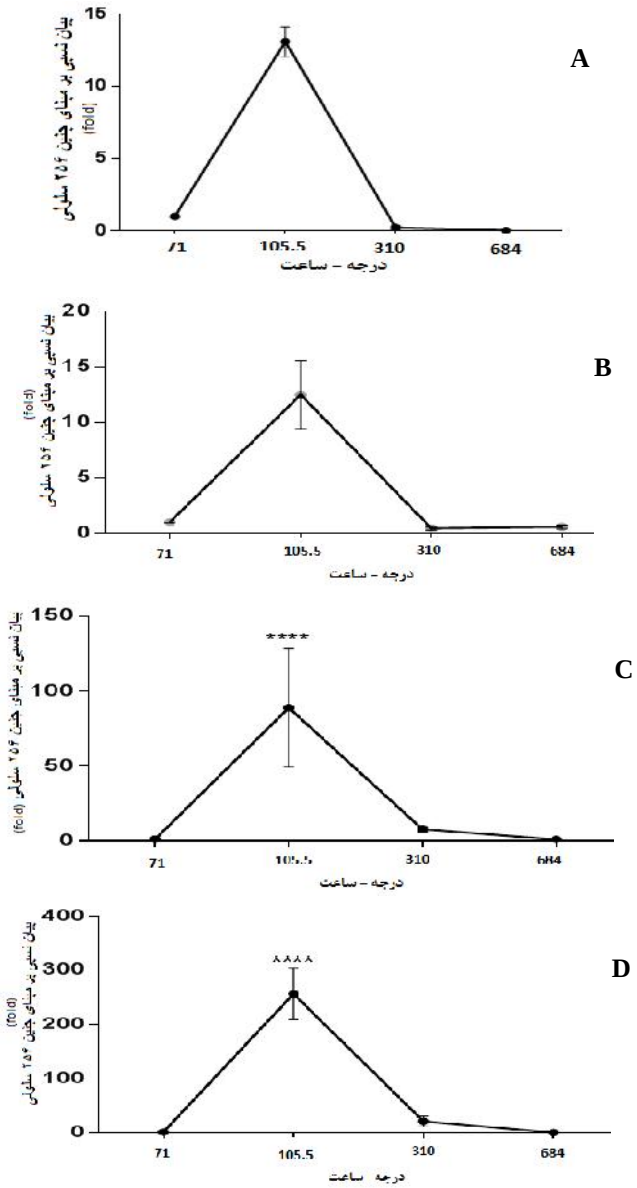
در این پژوهش به منظور مطالعه فرآیند پرتوانی در ماهی گورخری، بیان ژن‌های oct4، c-myc، lin28، klf4، sox2 و nanog مرتبط با شبکه پرتوانی در موجودات مختلف در چهار مرحله مختلف از نظر وضعیت تمایزی شامل مراحل مورولایی (۲۵۶ سلولی)، بلاستولا (بلاستولای میانی)، گاسترولا (۵۰ درصد اپی‌بولی) و سگمنتاسیون (۲۴ ساعت پس از لقاح) مورد بررسی قرار گرفتند و بیان نسبی ژن‌های oct4 (pou5f1)، c-myc، klf4، lin28 بررسی شد. نتایج حاصل از آنالیز Real-Time PCR نشان داد، بالاترین میزان بیان رونوشت ژن oct4، ۱۳ برابر مرحله ۲۵۶ سلولی، مربوط به بلاستولای میانی بود اما این اختلاف از نظر آماری (P>۰/۰۵) معنی‌دار نبود (شکل ۱A). همچنین میزان بیان نسبی رونوشت ژن c-myc نیز کاملاً مشابه ژن oct4 بود و بیش‌ترین بیان آن ۱۲/۴ برابر مرحله ۲۵۶ سلولی نیز مربوط به مرحله بلاستولای میانی بود اما این اختلاف هم مانند قبل از نظر آماری معنی‌دار نبود (P>۰/۰۵؛ شکل ۱B). بیش‌ترین بیان ژن‌های klf4 و lin28 نیز کاملاً مشابه با ژن‌های c-myc و oct4 بود که بیش‌ترین بیان به ترتیب با افزایش ۸۹ و ۲۵۶ برابری نسبت به مرحله ۲۵۶ سلولی مربوط به بلاستولای میانی بود. اما تفاوت مشاهده شده در مراحل مختلف تکوین در این دو ژن از نظر آماری معنی‌دار بود (P<۰/۰۵؛ شکل ۱C و D).

بیان نسبی ژن nanog و sox2

بیان رونوشت ژن nanog در این مطالعه در بین مراحل مختلف تکوین جنین ماهی گورخری در مرحله ۲۵۶ سلولی حداقل ۵۰ برابر بیش‌تر از مراحل دیگر بود و بیش‌ترین بیان را این مرحله به خود اختصاص داده است که البته اختلاف بیان نسبت به مراحل دیگر معنی‌دار نبود (P>۰/۰۵؛ شکل ۲A). بیان رونوشت ژن sox2 با تکوین جنین ماهی گورخری افزایش پیدا کرد و از گاسترولا به بعد روند افزایشی به خود گرفت و در ۲۴ ساعت بعد از لقاح به بیش‌ترین مقدار خود یعنی ۴۶۰ برابر مرحله ۲۵۶ سلولی رسید که با مراحل تکوینی دیگر اختلاف معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵؛ شکل ۲B).

www.SID.ir

Archive of SID

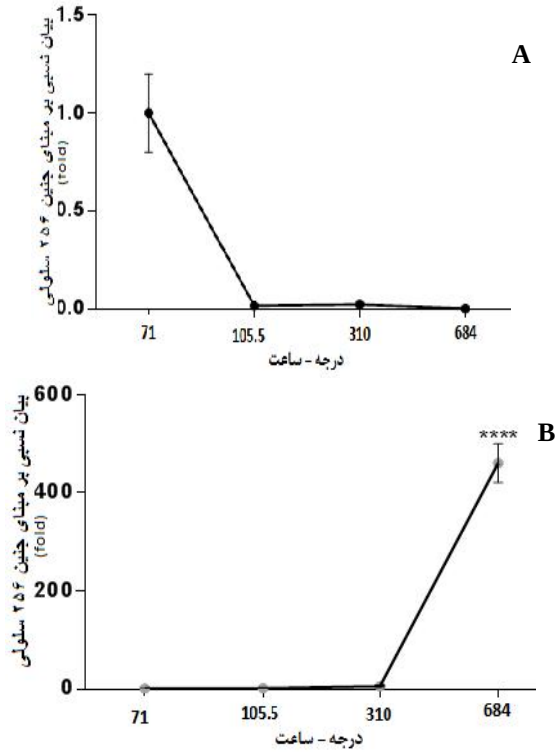


شکل ۱: بررسی میزان نسبی بیان ژن‌های دخیل در پرتوانی در جنین‌های ماهی گورخری طی مراحل مختلف تمایز. A: ژن oct4. B: ژن c-myc. C: ژن klf4. D: ژن lin28. مراحل مورولایی (۲۵۶ سلولی، ۷۱ درجه‌ساعت)، بلاستولایی (بلاستولای میانی، ۱۰۵/۵ درجه‌ساعت)، گاسترولا (۵۰ درصد اپی‌بولی، ۳۸۰

www.SID.ir

Archive of SID

درجه‌ساعت)، سگمنتاسیون (۲۴ ساعت پس از لقاح، ۶۸۴ درجه‌ساعت). بیان در مرحله بلاستولای میانی به عنوان مرحله شاخص پرتوانی، نشان از عملکرد پرتوانی ژن مورد نظر است، اختلاف‌های معنی‌دار در شکل با اطمینان ۹۵ درصد با علامت ستاره مشخص شده‌اند.

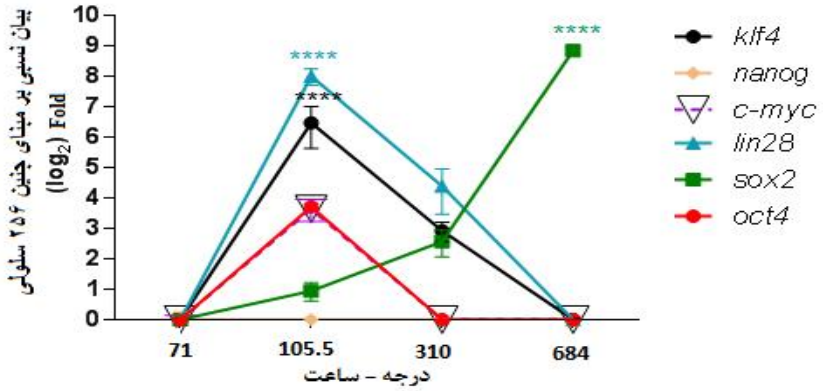


شکل ۲: میزان نسبی بیان ژن‌های مورد مطالعه در جنین‌های ماهی گورخری طی مراحل مختلف تمایز. A: ژن nanog. B: ژن sox2. مراحل مورولایی (۲۵۶ سلولی، ۷۱ درجه‌ساعت)، بلاستولایی (بلاستولای میانی، ۱۰۵/۵ درجه‌ساعت)، گاسترولا (۵۰ درصد اپی‌بولی، ۳۸۰ درجه‌ساعت)، سگمنتاسیون (۲۴ ساعت پس از لقاح، ۶۸۴ درجه‌ساعت). افزایش بیان در مرحله بلاستولای میانی شاخصی برای عملکرد پرتوانی و در مراحل تمایزی گاسترولا و بعد از آن شاخصی برای تمایز است. اختلاف‌های معنی‌دار در شکل با اطمینان ۹۵ درصد با علامت ستاره مشخص شده‌اند.

www.SID.ir

Archive of SID

روند بیان تمامی ژن‌ها در مراحل مختلف تکوین به منظور مقایسه و یافتن ژن‌های موثر در پرتوانی در شکل ۳ آورده شده است.



شکل ۳: مقایسه میزان بیان تمامی ژن‌های مورد مطالعه طی مراحل مختلف تمایزی تکوین، مورولایی (۲۵۶ سلولی، ۷۱ درجه‌ساعت)، بلاستولایی (بلاستولای میانی، ۱۰۵/۵ درجه‌ساعت)، گاسترولا (۵۰ درصد اپی‌بولی، ۳۸۰ درجه‌ساعت)، سگمنتاسیون (۲۴ ساعت پس از لقاح، ۶۸۴ درجه‌ساعت). افزایش بیان در مرحله بلاستولای میانی شاخصی برای عملکرد پرتوانی و در مراحل تمایزی گاسترولا و بعد از آن شاخصی برای تمایز است. اختلاف‌های معنی‌دار در شکل با اطمینان ۹۵ درصد با علامت ستاره مشخص شده‌اند.

بحث

سلول پرتوان به سلولی اطلاق می‌شود که از نظر تکوینی غیرمتعهد و دارای توان تکثیر نامحدود باشد. مطالعه پیوند سلول‌های پرتوان در موش، جوجه، ماهی گورخری و قورباغه نشان داده که این سلول‌ها تا مرحله گاسترولا ویژگی‌های پرتوانی خود را حفظ می‌کنند (Okabayashi and Asashima, 2003).

مطالعات پرتوانی در پستانداران بسیار مورد بررسی قرار گرفته و هسته مرکزی پرتوانی در پستانداران مشخص شده است. این امر کمک شایانی به تولید رده سلول‌های بنیادی جنینی در این موجودات کرده است. از طرف دیگر مطالعه شبکه ژن‌های تنظیم کننده پرتوانی در پستانداران مختلف، تفاوت زیادی را نشان داده است (Kunarso et al., 2010).

www.SID.ir

Archive of SID

با توجه به مطالعات انجام شده چهار عامل بازبرنامه‌ریزی در تولید سلول‌های بنیادی پرتوان القایی[1] موشی دخالت دارد که شامل oct4 (POU Class 5 Homeobox 1) یا pou5f1، sox2 (Sex-determining Region Y Box2)، klf4 (Krupple-like Factor 4) و c-myc (Proto Oncogene Myc) بودند Takahashi and Yamanaka, (2006). به علاوه عامل بازبرنامه‌ریزی برای تولید سلول‌های پرتوان القایی انسانی شامل oct4، sox2، nanog و lin28 نیز در نظر گرفته‌شدند (Yu et al., 2007) که علاوه بر عوامل فوق‌الذکر، nanog و lin28 نیز به مجموعه ژن‌های مورد مطالعه در ماهی گورخری اضافه شدند. افزایش بیان هر کدام از ژن‌ها در مراحلی که هرکدام شاخصی برای پرتوانی و تمایز محسوب می‌شدند نقش آن ژن را در فرآیند مذکور مشخص می‌کرد و انتظار این بود که ژن‌های موثر در پرتوانی در بلاستولای میانی بیش‌ترین بیان را داشته باشند. نتایج نشان داد، چهار ژن oct4، c-myc، klf4 و lin28 از ۶ ژن انتخابی در مرحله بلاستومری دارای بیش‌ترین بیان بودند.

طبق مطالعات گذشته مهم‌ترین عامل شبکه پرتوانی در موجودات مورد مطالعه ژن oct4 است و بیان آن در مراحل ابتدایی جنینی تا انتهای مرحله گاسترولا به اثبات رسیده است (Lavial et al., 2007; Downs, 2008) و در رده‌های سلول‌های بنیادی جنینی نیز یکی از عوامل مهم تعیین کننده پرتوانی است. از طرف دیگر بیان این ژن در رده‌های پرتوان دیگر نیز مشاهده شده است. به عنوان مثال در سلول‌های جنسی اولیه[2] در موش، مداکا و جوجه نیز بیان بالایی دارد اما در قورباغه و ماهی گورخری بیان نمی‌شود (Kehler et al., 2004; Reim and Brand, 2006; Lavial et al., 2007; Sanchez-Sanchez et al., 2010). حذف عملکرد[3] این ژن در مهره‌داران مدل، ضرورت این ژن جهت تکوین اولیه جنینی را به اثبات رسانید. بازخوردهای مختلفی ناشی از حذف عملکرد این ژن بین ماهی گورخری، موش و قورباغه مشاهده شد مثلاً در ماهی گورخری منجر به تشکیل نشدن لایه زاینده آندودرم شد. (Burgess et al., 2002; Lunde et al., 2004; Reim et al., 2004). عملکرد یکسان

1- Induced Pluripotent Stem Cells (IPS)

2- Primordial Germ Cells (PGC)

3- Loss of Function

www.SID.ir

Archive of SID

oct4 در *Xenopus* و موش گزارش شده است به طوری که ژن‌های تحت کنترل این ژن در سلول‌های بنیادی جنینی موشی و *Xenopus* تقریباً یکسان هستند (Onichtchouk et al., 2010). در مطالعه مشابهی نیز در ماهی گورخری بیان این ژن در بلاستومرها بسیار بیش‌تر از سلول‌های تمایز یافته بود و همچنین در آن مطالعه، مشابه با نتایج حاصل از مطالعه حاضر، بیش‌ترین بیان oct4 مربوط به مرحله بلاستولای میانی است و نتایج حاکی از آن است که بیان oct4 در رابطه مستقیم با پدیده پرتوانی در این گونه است (Robles et al., 2011).

بیان بالای sox2 عامل اصلی فرآیند پرتوانی در موش است به طوری که به عنوان یک عامل مرکزی پرتوانی در پستانداران محسوب می‌شود. رونوشت‌های این ژن در ماهی مداکا از مادر به ارث می‌رسد (Cui et al., 2011) اما در ماهی گورخری بیان آن وابسته به جنین بوده و از مادر به ارث نمی‌رسد (Okuda et al., 2006). مطالعات مختلف در تایید نتایج حاصله از این آزمایش حاکی از آن است که در ماهی گورخری بیان این ژن در اواخر گاسترولا بالا می‌رود و در تمام نواحی سیستم عصبی بیان می‌شود (Okuda et al., 2006; Cui et al., 2011). مطالعات دیگر نیز موید نتایج این پژوهش است. بدین صورت که بیان این عامل در ماهی گورخری با افزایش زمان پس از لقاح افزایش می‌یابد و روند بیان آن از مرحله اپی‌بولی به طور چشم‌گیری صعودی است، بطوری که بیان آن در این آزمایش در ۲۴ ساعت پس از لقاح به طور معنی‌داری به حداکثر خود می‌رسد. این افزایش بیان همگام با افزایش فرآیندهای تمایز جنینی که از گاسترولا شروع می‌شود و تا تفریخ ادامه پیدا می‌کند، شاهدی بر نقش تمایزی این ژن این گونه است (Robles et al., 2011). روند تغییرات این ژن در ماهی طلایی نیز همانند الگوی بیان آن در ماهی گورخری است. بیان آن در ماهی طلایی از مرحله ۵۰ درصد اپی‌بولی آغاز می‌شود به طوری که فرضیه انتقال مادری رونوشت sox2 را منتفی می‌کند (Okuda et al., 2006). بنابراین ژن sox2 در ماهی گورخری به عنوان مارکر پرتوانی مطرح نیست و احتمالاً در فرآیند تمایز دخیل است.

c-myc متعلق به خانواده عوامل رونویسی myc است. این ژن بیان ۱۵ درصد از کل ژن‌های بدن از قبیل ژن‌های دخیل در تقسیم سلولی، رشد سلولی و آپاپتوز را تنظیم می‌کند.

www.SID.ir

Archive of SID

افزایش بیان c-myc نیز مسیرهای تمایزی را متوقف می‌کند (Selvakumaran et al., 1996; Canelles et al., 1997; Pelengaris et al., 1999; Schreiner et al., 2001; Knoepfler et al., 2002). در سلول‌های بنیادی جنینی انسانی بر عکس انتظار، این ژن باعث آپاپتوز و القای تمایز می‌شود (Sumi et al., 2007). در مطالعه حاضر بیان آن در مرحله بلاستولای میانی افزایش یافت. نحوه بیان c-myc در این مطالعه و بیان حداکثری آن در مرحله بلاستولا بر نقش این ژن در هسته مرکزی پرتوانی در ماهی گورخری دلالت دارد.

lin28 به عنوان یک پروتئین متصل شونده به RNA شناخته می‌شود و صفات سلولی را کنترل می‌کند. کمپلکس tet1، در متیلاسیون DNA و بیان ژن نقش دارد و باعث پرتوانی سلول‌های بنیادی جنینی در موش و انسان می‌شود (Zeng et al., 2015) در مطالعه حاضر با بیان بسیار زیاد آن در مرحله بلاستولا، همخوانی نقش این ژن در پرتوانی ماهی گورخری مشابه با موش و انسان تایید می‌شود.

klf4 نیز همانند الگوی oct4 در بلاستولای میانی بیش‌ترین بیان را داشت و با پیشرفت فرآیند تمایز، بیان این ژن‌ها نیز کاهش یافت. مطالعات بیانگر آن است که klf4 به عنوان یک سازمان دهنده ژنوم برای تنظیم رونویسی به ویژه در رابطه با عملکرد oct4 عمل می‌کند و نقش کلیدی در پرتوانی و بازبرنامه‌ریزی دارد (Onichtchouk et al., 2010). در مطالعه حاضر بیش‌ترین بیان اندازه‌گیری شده مربوط به ژن nanog در مرحله مورولا بود. بیان آن در بین مراحل مختلف معنی‌دار نبود و به نظر می‌رسد که نقش آن در پرتوانی کمرنگ باشد. از طرفی با توجه به الگوی بیانی nanog، به نظر می‌رسد که این ژن نقش دیگری غیر از عملکرد پرتوانی در این گونه داشته باشد.

این یافته در توافق با مطالعه Camp و همکاران در سال ۲۰۰۹ می‌باشد که بیان داشت nanog ماهی گورخری فقط در تکثیر سلولی نقش دارد و نقش آن در پرتوانی حداقل است. در مطالعه‌ای دیگر بیان nanog در ماهی گورخری مربوط به ذخیره مادری دانسته شده و به همین دلیل در مراحل اولیه تکوین به راحتی قابل بررسی و اندازه‌گیری است و بر خلاف مداکا نقش آن در عملکرد پرتوانی در این گونه ناچیز است (Dosch, 2015). بیان این ژن در این مطالعه نیز حاکی از آن است که این ژن فاقد عملکرد پرتوانی است.

www.SID.ir

Archive of SID

برای جمع‌بندی نهایی می‌توان اظهار کرد که بیان حداکثری oct4، klf4، c-myc و lin28 در بلاستولای میانی شاخصی برای مرحله پرتوانی در این ماهی محسوب می‌شود. افت بیان در مراحل دیگر بر شروع فرآیند تمایز در ماهی گورخری دلالت دارد. با دانستن این نکات می‌توان به کمک این عوامل به سمت تولید سلول‌های بنیادی جنینی و تولید سلول‌های پرتوان القایی در آینده قدم برداشت. با توجه به بیان حداکثری چهار ژن oct4، c-myc، klf4 و lin28 در مرحله بلاستولای میانی که شاخصی از تکوین برای پرتوانی در تمامی موجودات است، می‌توان آن‌ها را در فرآیند پرتوانی در این گونه دخیل دانست. همچنین با توجه به الگوی بیانی و حداکثر بیان ژن sox2 در مراحل شاخص تمایز جزء شبکه پرتوانی در این گونه محسوب نمی‌شود و ژن nanog هم که در مرحله بلاستولای میانی کم‌ترین بیان را داشت مارکر پرتوانی نبوده و به نظر می‌رسد که نقش دیگری غیر از عملکرد پرتوانی در ماهی گورخری داشته باشد.

تشکر و قدردانی

نگارندگان وظیفه خود می‌دانند که از زحمات پرسنل خدوم آزمایشگاه مولکولی پژوهشکده سلول‌های بنیادی پژوهشگاه رویان و جناب آقای دکتر بصیری و آقای مهندس محمد رضایی جهت همکاری در اجرای این کار تشکر و قدردانی نماید.

www.SID.ir

Archive of SID

منابع

Brambrink T., Foreman R., Welstead G.G., Lengner C.J., Wernig M., Suh H. and Jaenisch R. 2008. Sequential expression of pluripotent markers during direct reprogramming of mouse somatic cells. Cell Stem Cell, 2: 151–159.

Burgess S., Reim G., Chen W., Hopkins N. and Brand M. 2002. The zebrafish spiel-ohne-grenzen (spg) gene encodes the POU domain protein Pou2 related to mammalian Oct4 and is essential for formation of the midbrain and hindbrain, and for pre-gastrula morphogenesis. Development, 129(4): 905–916.

Camp E., Sanchez-Sanchez A.V., Garcia-Espana A., Desalle R., Odqvist L., Enrique O'.Connor J. and Mullor J.L. 2009. *nanog* regulates proliferation during early fish development. Stem Cells, 27: 2081–2091.

Canelles M., Delgado M.D., Hyland K.M., Lerga A., Richard C., Dang C.V. and Leon J. 1997. Max and inhibitory c-myc mutants induce erythroid differentiation and resistance to apoptosis in human myeloid leukemia cells. Oncogene, 14: 1315–1327.

Cui J., Shen X., Zhao H. and Nagahama Y. 2011. Genome-wide analysis of Sox genes in Medaka (*Oryzias latipes*) and their expression pattern in embryonic development. Cytogenetic and Genome Research, 134: 283–294.

Dosch R. 2015. Next generation mothers: Maternal control of germline development in zebrafish. Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology, 50(1): 54–68.

Downs K.M. 2008. Systematic localization of Oct-3/4 to the gastrulating mouse conceptus suggests manifold roles in mammalian development. Development Dynamics, 237: 464–475.

Evans M.J. and Kaufman M.H. 1981. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. Nature, 292: 154–156.

Fan L., Crodian J., Alestrom A., Alestrom P. and Collodi P. 2004. Zebrafish embryo cells remain pluripotent and germ-line competent for multiple passages in culture. Zebrafish, 1: 21–26.

Ho S.Y., Goh C.W., Gan J.Y., Lee Y.S., Lam M.K., Hong N., Hong Y., Chan W.K. and Shu-Chien A.C. 2014. Derivation and long-term culture of an embryonic stem cell-like line from zebrafish blastomeres under feeder-free condition. Zebrafish, 11(5): 407–420.

Kehler J., Tolkunova E., Koschorz B., Pesce M., Gentile L., Boiani

www.SID.ir

Archive of SID

M., Lomeli H., Nagy A., McLaughlin K.J., Scholer H.R. and Tomilin A. 2004. *oct4* is required for primordialgerm cell survival. EMBO Reports, 5: 1078–1083.

Kimmel C.B., Ballard W.W., Kimmel S.R., Ullmann B. and Schilling T.F. 1995. Stages of embryonic development of the zebrafish. Developmental Dynamics, 203: 253–310.

Knoepfler P.S., Cheng P.F. and Eisenman R.N. 2002. N-myc is essential during neurogenesis for the rapid expansion of progenitor cell populations and the inhibition of neuronal differentiation. Genes and Development, 16: 2699–2712.

Kunarso G., Chia N.Y., Jeyakani J., Hwang C., Lu X., Chan Y.S., Ng H.H. and Bourque G. 2010. Transposable elements have rewired the core regulatory network of human embryonic stem cells. Nature Genetics, 42: 631–634.

Lavial F., Acloque H., Bertocchini F., Macleod D.J., Boast S., Bachelard E., Montillet G., Thenot S., Sang H.M., Stern C.D., Samarut J. and Pain B. 2007. The *oct4* homologuePouV and *nanog* regulate pluripotency in chickenembryonic stem cells. Development, 134: 3549–3563.

Lunde K., Belting H.G. and Driever W. 2004. Zebrafish pou5f1/pou2, homolog of mammalian oct4, functions in the endoderm specification cascade. Current Biology, 14(1): 48–55.

Okabayashi K. and Asashima M. 2003. Tissue generation from amphibian animal caps. Current and Opinion Genetics and Development, 13: 502–507.

Okuda Y., Yoda H., Uchikawa M., Furutani-Seiki M., Takeda H., Kondoh H. and Kamachi Y. 2006. Comparative genomic and expression analysis of group B1 sox genes in zebrafish indicates their diversification during vertebrate evolution. Developmental Dynamics, 235: 811–825.

Onichtchouk D., Geier F., Polok B., Messerschmidt D.M., Mossner R., Wendik B., Song S., Taylor V., Timmer J. and Driever W. 2010. Zebrafish Pou5f1-dependent transcriptional networks in temporal control of early development. Molecular Systems Biology, 6: 1–18 (354).

Pelegri F. and Mullins M.C. 2004. Genetic screens for maternal-effect mutations. Methods in Cell Biology, 77: 21–51.

Pelengaris S., Littlewood T., Khan M., Elia G. and Evan G. 1999. Reversible activation of *c-myc* in skin: Induction of a complex neoplastic phenotype by a single

www.SID.ir

Archive of SID

oncogenic lesion. Molecular Cell, 3: 565–577.

Reim G. and Brand M. 2006. Maternal control of vertebrate dorsoventral axis formation and epiboly by the POU domain protein Spg/Pou2/ *oct4*. Development, 133: 2757–2770.

Reim G., Mizoguchi T., Stainier D.Y., Kikuchi Y. and Brand M. 2004. The POU domain protein spg (pou2/ *oct4*) is essential for endoderm formation in cooperation with the HMG domain protein casanova. Developmental Cell, 6: 91–101.

Robles V., Marti M. and Belmonte J. 2011. Study of pluripotency markers in zebrafish embryos and transient embryonic stem cell cultures. Zebrafish, 8: 57–63.

Sanchez-Sanchez A.V., Camp E., Garcia-Espana A., Leal-Tassias A. and Mullor J.L. 2010. Medaka oct4 is expressedduring early embryo development, and in primordialgerm cells and adult gonads. Developmental Dynamics official publications of the American Association of Anatomists, 239: 672–679.

Selvakumaran M., Liebermann D. and Hoffman B. 1996. The proto-oncogene c-myc blocks myeloid differentiation independently of its target gene ornithine decarboxylase. Blood, 88 (4): 1248–1255**.**

Schreiner S., Birke M., Garcia-Cuellar M.P., Zilles O., Greil J. and Slany R.K. 2001. MLL-ENL causes a reversible and myc-dependent block of myelomonocytic cell differentiation. Cancer Research, 61: 6480–6486.

Shamblott M.J., Axelman J., Wang S., Bugg E.M., Littlefield J.W. and Donovan P.J. 1998. Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. Proceedings of the National Academy of Sciences, 95: 13726–13731.

Stern H.M. and Zon L.I. 2003. Cancer genetics and drug discovery in the zebrafish. Nature Reviews Cancer, 3: 533–539.

Sumi T., Tsuneyoshi N., Nakatsuji N. and Suemori H. 2007. Apoptosis and differentiation of human embryonic stem cells induced by sustained activation of c-myc. Oncogene, 26: 5564–5576.

Takahashi K. and Yamanaka S. 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. Cell, 126: 663–676.

Westerfield M. 1993. The zebrafish. University of Oregon Press, from: http://zfish.uoregon.edu/zf_info/zfbook.

Xing J.G., Lee L.E.J., Fan L.C., Collodi P., Holt S.E. and Bols N.C. 2008. Initiation of a

www.SID.ir

Archive of SID

zebrafish blastula cell line on rainbow trout stromal cells and subsequent development under feeder-free conditions into a cell line, ZEB2J. Zebrafish, 5:49–60.

Yu J. and Thomson J.A. 2008. Pluripotent stem cell lines. Genes and Development, 22: 1987–1997.

Yu J., Vodyanik M.A., Smuga Otto K., Antosiewicz-Bourget J., Frane J.L., Tian S., Nie J., Jonsdottir G.A., Ruotti V. and Stewart R. 2007. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. Science, 318: 1917–1920.

Zeng Y., Yao B., Shin J., Lin L., Kim N., Song Q., Liu S., Su Y., Gua J.U., Huang L., Wan J., Wu H., Qian J., Cheng X., Zhu H., Ming G., Jin P. and Song H. 2015. *lin28*A binds active promoters and recruits Tet1 to regulate gene expression. Molecular Cell, 61(1): 153-160.

www.SID.ir

Archive of SID

Aquatic Physiologyand Biotechnology
Vol. 3, No. 1, Spring 2015

Study the expression of pluripotency associated genes at the developmental stages of zebrafish embryos

Amir Hossein Esmaily[1], Mohammad Reza Kalbassi[2]*, Hossein Baharvand[3]*, Seyedeh Nafiseh Hassani[4]

Received: March 2015 Accepted: May 2015

Abstract

Although pluripotency markers are well known in mammals, our knowledge concerning them is still shallow about fish and other aquatic organisms. In this regard, the expression of nanog oct4, sox2, klf4, lin28, c-myc genes considered as a core circuit of pluripotency in various organisms were investigated in different developmental embryonic stages of zebrafish *Danio rerio*, including morulla, mid-blastula, gastrula and segmentation with 71, 105.5, 310 and 684 degree/hour post fertilization, respectively. The results of quantitative gene expression using Real Time PCR techniques revealed that In mid-blastulla stage, the lin28 and klf4 had maximum significant expression but no significant expression was observed for oct4 and c-myc. In addition, maximum expression of sox2 gene, known as pluripotency key in mouse and human, were observed after gastrula stage in zebrafish. Moreover, nanog showed significant expression in morulla stage, but no difference was observed in the other stages. In conclusion, lin28, klf4, oct4 and c-myc markers could be considered as the most important pluripotency markers in zebrafish but the sox2 is probably involved in the differentiation process and It seems that nanog has other roles beyond maintaining pluripotency according to its expression pattern.

Key words: *Gene Expression, Pluripotency, Embryonic Development, Zebrafish.*

1- Ph.D. Student in Department of Aquaculture, Faculty of Marine Sciences, Tarbiat Modares University, Noor, Mazandaran, Iran.
2- Professor in Department of Aquaculture, Faculty of Marine Sciences, Tarbiat Modares University, Noor, Mazandaran, Iran.
3- Professor in Department of Stem Cells and Developmental Biology, Cell Science Research Center, Royan Institute for Stem Cell Biology and Technology, ACECR, Tehran, Iran.
4- Assistant professor in Department of Stem Cells and Developmental Biology, Cell Science Research Center, Royan Institute for Stem Cell Biology and Technology, ACECR, Tehran, Iran.
*Corresponding Author: kalbassi_m@modares.ac.ir and baharvand@Royaninstitute.org

www.SID.ir