



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 *klf4*، *lin28* 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 احتمالاً 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 سلول‌های بنیادی و زیست‌شناسی تکوینی، مرکز تحقیقات علوم سلولی، پژوهشکده زیست‌شناسی و فناوری سلول‌های بنیادی جهاددانشگاهی، پژوهشگاه رویان، تهران، ایران.
 - ۴- استادیار گروه سلول‌های 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

مقدمه

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 پیام‌رسانی 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

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^۱ از بلاستوسیست‌های در حال تکوین موش، واژه سلول‌های بنیادی جنینی^۲ 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

1- ICM

2- Embryonic Stem Cells (ESC)

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

(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 lin28 و c-myc, klf4, nanog, sox2, oct4 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

درمای مذکور، چهار دوره جنینی شامل دوره مورولایی^۱ (۲۵۶ سلولی) ۷۱ درجه ساعت، دوره بلاستولای میانی^۲ ۱۰۵/۵ درجه ساعت، مرحله شروع تمایز، گاسترولا ۳۱۰ درجه ساعت، سگمنتاسیون و فارنگولا^۳ ۶۸۴ درجه ساعت، برای مطالعه و مقایسه انتخاب شد (Kimmel et al., 1995).

نحوه نمونه برداری 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 منتقل شد. پس از این که آب اطراف تخم‌ها توسط پیپت ۱۰۰ میکرون کاملاً خشک شد، به میزان ۱ میلی لیتر (Gibco-TRIZol (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

در دمای ۲۸-۲۶ درجه قرار گرفتند. در این مرحله ماهیان ۳ بار در روز توسط ناپلی آرتمیما و خوراک کنستانتتره 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 ۵mM، 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 خون سرد است، بنابراین مدت زمان تکوین آن وابسته به دما است. طبق جداول استاندارد و مطالعات انجام شده در مورد مراحل تکوین در

1- Morulla

2- Midblastula (Oblong)

3- Pharyngula

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^۱ ۱۰ میکرومولار، ۱ میکرولیتر آغازگر برگشت^۲ 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 (Ct) انجام شد. به منظور نرمال کردن نمونه‌ها در روش کمی‌سازی نسبی، از ژن *-actin* به عنوان یک ژن Housekeeping برای کنترل درونی استفاده شد (Ho et al., 2014). برای هر نمونه سه تکرار

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.

1- Forward Primer

2- Reverse Primer

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

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

فرمول ۱: محاسبه نسبت

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

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

پردازش آماری داده‌ها

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 \pm انحراف معیار

جهت پردازش آماری داده‌ها از آنالیز واریانس دو طرفه با کمک نرم افزار GraphPad Prism 6.01 استفاده شد. برای

میانی بود اما این اختلاف هم مانند قبل از نظر آماری معنی‌دار نبود ($P > 0.05$; 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 سلولی مربوط به بلاستولای میانی بود. اما تفاوت مشاهده شده در مراحل مختلف تکوین در این دو ژن از نظر آماری معنی‌دار بود ($P < 0.05$; شکل ۱C و D).

بیان نسبی ژن *nanog* و *sox2*

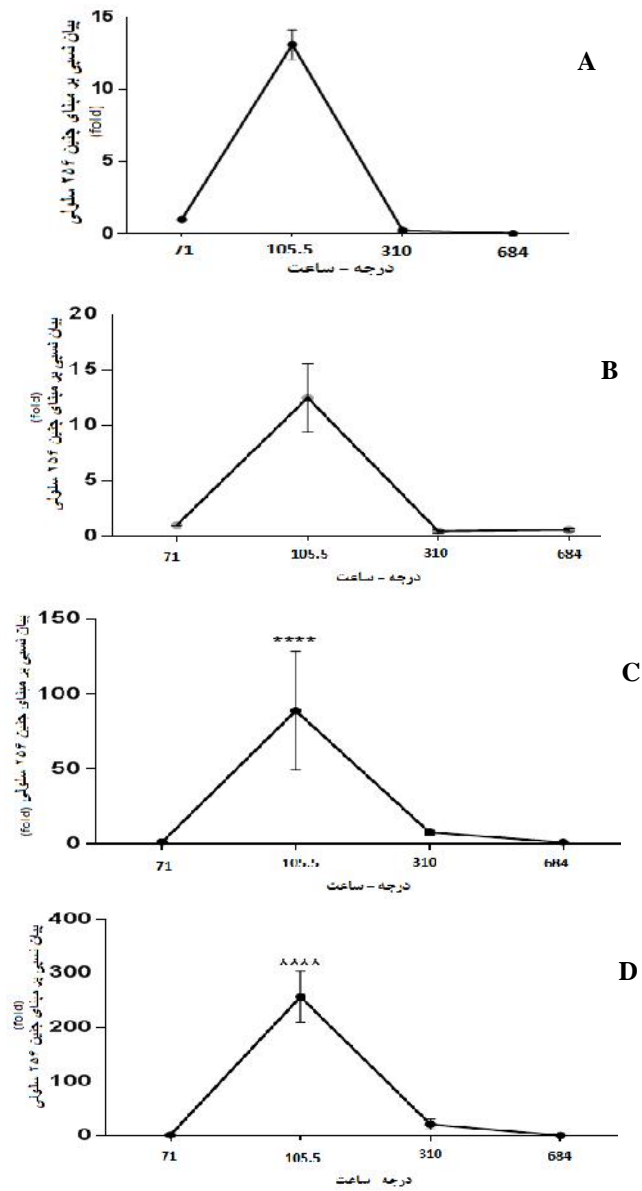
بیان رونوشت ژن *nanog* در این مطالعه در بین مراحل مختلف تکوین جنین ماهی گورخری در مرحله ۲۵۶ سلولی حداقل ۵۰ برابر بیش‌تر از مراحل دیگر بود و بیش‌ترین بیان را این مرحله به خود اختصاص داده است که البته اختلاف بیان نسبت به مراحل دیگر معنی‌دار نبود ($P > 0.05$; شکل ۲A). بیان رونوشت ژن *sox2* با تکوین جنین 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 ($P < 0.05$; شکل ۲B).

بیان شدند و سطح معناداری ($P < 0.05$) در نظر گرفته شد.

نتایج

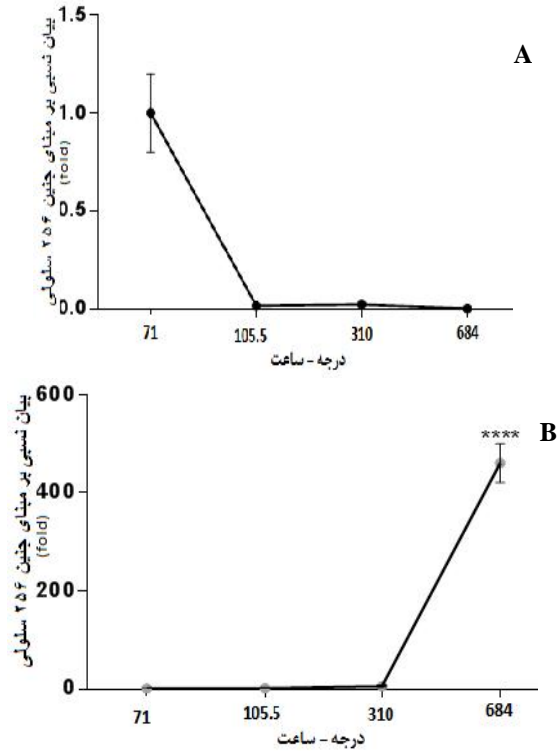
بیان نسبی ژن‌های احتمالی مرتبط با پرتوانی در طی تکوین جنینی ماهی گورخری

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 ($P > 0.05$) 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



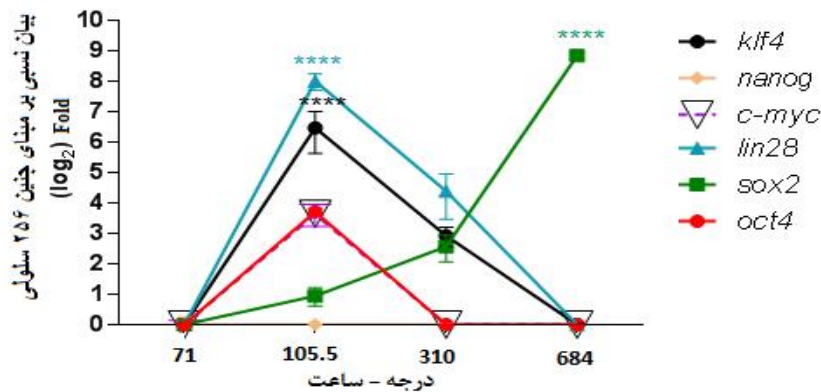
شکل ۱: بررسی میزان نسبی بیان ژن‌های دخیل در پرتوانی در جنین‌های ماهی گورخری طی مراحل مختلف تمایز. A: ژن *oct4*. B: ژن *c-myc*. C: ژن *klf4*. D: ژن *lin28*. مراحل مورولایی (۲۵۶ سلولی، ۷۱ درجه‌ساعت)، بلاستولایی (بلاستولای میانی، ۱۰۵/۵ درجه‌ساعت)، گاسترولا (۵۰ درصد اپی‌بولی، ۳۸۰

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 *sox2*; **B:** ژن *nanog*. 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.

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



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

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).

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).

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^۲ در موش، ماکا 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^۳ 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).

با توجه به مطالعات انجام شده چهار عامل بازبرنامه‌ریزی در تولید سلول‌های بنیادی پرتوان القایی^۱ موشی دخالت دارد که شامل oct4 (POU Class 5 Homeobox 1) یا pou5f1 (Sex-determining region Y Box2) klf4 (Krupple-like Region Y Box2) و Factor 4) c-myc (Proto Oncogene) بودند (Myc Takahashi and Yamanaka, 2006). به علاوه عامل بازبرنامه‌ریزی برای تولید سلول‌های پرتوان القایی انسانی شامل oct4، sox2، و lin28 نیز در نظر گرفته شدند (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 مراحل اولیه هر کدام 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.

2- Primordial Germ Cells (PGC)
3- Loss of Function

1- Induced Pluripotent Stem Cells (IPS)

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 تفریح ادامه پیدا می‌کند، شاهدی بر نقش تمایزی این ژن در 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.

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.,

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.

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

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.

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

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**

- M., Lomeli H., Nagy A., McLaughlin K.J., Scholer H.R. and Tomilin A. 2004.** *oct4* is required for primordial germ 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.
- Kunarseo 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* homologue PouV and *nanog* regulate pluripotency in chicken embryonic 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

- 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 expressed during early embryo development, and in primordial germ 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/zf_book.
- Xing J.G., Lee L.E.J., Fan L.C., Collodi P., Holt S.E. and Bols N.C. 2008.** Initiation of a

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., Gao J.U., Huang L., Wan J., Wu H., Qian J., Cheng X., Zhu H., Ming G., Jin P. and Song H. 2015. *lin28A* binds active promoters and recruits Tet1 to regulate gene expression. *Molecular Cell*, 61(1): 153-160.



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

Amir Hossein Esmaily¹, Mohammad Reza Kalbassi^{2*}, Hossein Baharvand^{3*},
Seyedeh Nafiseh Hassani⁴

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-blastula 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