



## بررسی نقش فاکتورهای مادری شبه اکتیوین در الگوی بیان فاکتورهای چندتوانی در طی روند تکوین اولیه ماهی زبرا

شقایق حسن پور<sup>۱</sup>، سهیل ایگدری<sup>۲\*</sup> و هادی پورباقر<sup>۲</sup>

۱. دکتری شیلات، گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، ۷۷۸۷-۳۱۵۸۷ کرج، ایران

۲. دانشیار گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، ۷۷۸۷-۳۱۵۸۷ کرج، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۳/۲۴

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۱/۰۶

### چکیده

نقش فاکتورهای شبه اکتیوین در روند تکوین اولیه ماهی زبرا جهت حفظ چندتوانی نامشخص است. در این مطالعه تخم‌ها به محض حذف کوریون از شروع تسهیم با اکتیوین تیمار شدند. بررسی بیان نانوغ و Oct4 در مراحل 1K، 256-cell، oblong، dome و سپر رویانی (shield) سه تکرار به‌ازای هر مقطع زمانی، انجام گرفت. با توجه به فعال بودن مسیرهای سیگنالینگ سلولی پیش از آغاز بیان زایگوتیک، بهره‌گیری از تیمار اکتیوین، منجر به فعال و فسفوریله شدن سطح بالاتری از Smad2/3 در قیاس با تیمار شاهد و متعاقباً بهبود سطح بیان نانوغ نسبت به گروه کنترل، در مرحله 1K گردید. در مرحله oblong سطح بیان نانوغ در تیمارهای اکتیوین به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. بنابراین، سطح بیان نانوغ می‌باید در زمانی زودتر از مرحله oblong به پیک خود رسیده باشد. افزایش فاکتورهای شبه اکتیوین با کاهش بیان Oct4 همراه بود. با توجه به محفوظ بودن مسیر سیگنالینگ فاکتورهای شبه اکتیوین در روند تکاملی، یافته‌های این تحقیق را می‌توان به سایر مهره‌داران تعمیم داد و به دلیل اهمیت سلول‌های بنیادی می‌تواند بستری برای مطالعات بعدی فراهم نماید.

واژگان کلیدی: زبرافیش، تکوین، نانوغ، Oct4، فاکتورهای شبه اکتیوین.



# Survey on the role of maternal Activin-like factors in expression pattern of the pluripotency factors during early zebrafish development

Shaghayegh Hasanpour<sup>1</sup>, Soheil Eagderi<sup>2\*</sup>, Hadi Poorbagher<sup>2</sup>

*1.Ph.D. Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj 31587-7787, Iran*

*1.Associate Professor, Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj 31587-7787, Iran*

**Received: 24-Jan-2020**

**Accepted: 13-Jun-2020**

## **Abstract**

The role of Activin-like factors in pluripotency maintenance is unknown during the zebrafish development. In this study, the embryos were treated with Activin A after dechorionation. Nanog and Oct4 expression patterns were evaluated during 256-cell, 1K, oblong, dome and shield stages (three replicates per stage). Due to the activation of cell signaling pathways before ZGA (zygotic genome activation), Activin treatment led to higher phosphorylation of Smad2/3 and progressively higher rate of Nanog expression in comparison to the control group at 1K-cell stage. At the oblong stage Nanog mRNA levels significantly decreased, therefore, Nanog mRNA levels should be reached to its peak in earlier time. Activin-like factors enhancement decreased Oct4 mRNA levels in contrast with Nanog. Due to the conservation of Activin-like factors pathway, the results can be generalized to other vertebrates and also provide a background for further studies, because of the stem cell importance.

**Key words:** Zebrafish, Development, Nanog, Oct4, Activin-like factors.

## ۱. مقدمه

سوپر خانواده  $TGF\beta$  شامل طیف وسیعی از فاکتورهای رشدی خارج سلولی است که فرآیندهای تکوینی و هم‌نووستازی را در مهره‌داران و غیرمهره‌داران تنظیم می‌کنند (Raftery and Sutherland, 1999; ten Dijke and Hill, 2004; Cavaleri and Schöler, 2009; Wu and Hill, 2009; Pauklin and Vallier, 2015). اعضای این سوپر خانواده به شدت در طی روند تکامل محفوظ مانده‌اند و در طیف وسیعی از فرآیندهای فرآینحی به ایفای نقش می‌پردازند. از جمله اعضای این سوپر خانواده می‌توان به نودال، اکتیوین و  $TGF\beta$  اشاره کرد. برخلاف پستانداران سه ژن ارتولوگ نودال در ماهی زبرا شامل *cyclops (cyc)/ndr2/znr1*، *squint (sqt)/ndr1/znr2* و *southpaw (spw)/ndr3/znr3* شنا سایی شده‌اند که مورد یک و دو دارای عملکرد هم‌پوشان هستند. مورد سه نیز عاملی برای القای عدم تقارن چپ و راست پس از گاسترولاسیون است (Munoz-Sanjuan, 2001; Yelon, 2001; Gore and Sampath, 2002; Bennett *et al.*, 2007; Hagos and Dougan, 2007; Hagos *et al.*, 2007). همو یا هتروداپمرهای نودال، به کمپلکس رسپتوری تترامریک خود باند می‌شوند که این کمپلکس رسپتوری مشتمل بر دو رسپتور تیپ I و دو رسپتور تیپ II سرین-ترئونین کیناز است و در این بین عملکرد اختصاصی رسپتور، به‌وسیله رسپتور تیپ I (*Alk4/5/7*) تعیین می‌شود. باند شدن لیگاند به رسپتور II، سبب فسفوریلاسیون رسپتور I توسط II و به دنبال فعال‌سازی *Smad2/3* می‌شود. به محض فعال شدن *Smad2/3* توسط رسپتور تیپ I (*Alk4/5/7*)، آن‌ها به صورت همو/هتروداپمر درآمده و سپس با *Smad4* به شکل کمپلکسی سه‌گانه به هسته منتقل می‌شوند، جایی که در آن با مشایعت و همکاری سایر عوامل رونویسی بیان ژن‌های هدف‌شان را القا می‌کنند. به جز نودال یا ارتولوگ‌های آن در ماهی زبرا، اکتیوین، *GDF1/3* و  $TGF\beta$  همگی از طریق رسپتور و افکتور یا تاثیر

گذارمشرکی به تنظیم بیان ژن‌های هدف‌شان می‌پردازند و از آن جایی که اثرات آن‌ها به صورت غیرقابل تفکیک از هم است، استفاده از اصطلاحات مسیر سیگنالینگ *Smad2/3* (*Smad2/3 pathway*) و فاکتورهای شبه‌نودال/اکتیوین کامل‌تر و جامعیت بیشتری دارد (Shen and Schier, 2000; Kramer, 2002; Gong and Korzh, 2004; Sun *et al.*, 2006; Hagos and Dougan, 2007; Hagos *et al.*, 2007; Shen, 2007; Grapin-Botton, 2009; Pauklin and Vallier, 2015).

مسیر سیگنالینگ *Smad2/3* مستقیماً ژن‌های کلیدی و محورهای اصلی دخیل در حفظ چندتوانی نظیر *Oct4* و *sox2* را در سلول‌های بنیادی موش و انسان بیان می‌کند. به علاوه همکاری میان *smad2/3* و هسته مرکزی عوامل رونویسی چندتوانی از سوی دیگر از طریق سرکوب رونویسی *SIP1* (*smad intracting protein1*) به حفظ خود ترمیمی نامحدود در این سلول‌ها منجر می‌شود (در حقیقت *SIP1* القاگر اکتودرم عصبی است) (Pauklin and Vallier, 2015; Vallier, 2016). اگر چه این روابط در پستانداران اثبات شده است، اما شواهدی در ماهیان استخوانی حقیقی در ارتباط با نقش این مسیر سیگنالینگ در حفظ چندتوانی در دست نیست.

ماهی زبرا (*Danio rerio* Hamilton-Buchanan, 1822)، به‌عنوان مدلی آزمایشگاهی در تحقیقات زیست‌شناسی و پزشکی شناخته می‌شود، چراکه مزایای متعددی دارد که از جمله ۱- لقاح خارجی، ۲- نرخ بالای رشد، ۳- شفافیت رویان، که امکان رصد حرکات مورفوژنیک و شکل‌گیری ارگان‌های مختلف را میسر می‌کند. ۴- سن بلوغ پایین، ۵- نرخ بالای همآوری ۶- سهولت دستکاری، ۷- امکان غربال‌گری ژنتیکی، ۸- امکان تزریق مورفولینو و در نتیجه بهره‌گیری از روش‌های ژنتیک معکوس و ۹- قرابت ژنتیکی با انسان (Mullins, 1998; Kodjabachian *et al.*, 1999; Raftery and Sutherland, 1999; Glickman and Yelon, 2002; Heisenberg and Tada, 2002; Moss *et al.*, 2002; Field *et al.*, 2003; Field *et al.*, 2003; Ober *et al.*, 2003; Gong and Korzh, 2004; Ulrich and Heisenberg, 2004; Zhiyuan and Vladimir, 2004; Kondo, 2007; Chan

۲۸/۵ سانتی‌گراد انکوبه شدند. کف پلت‌های مورد استفاده با آگارز ۲ درصد به ضخامت ۳-۲ میلی‌متر پوشیده شد (Kimmel *et al.*, 1995).

اکتیوین A سنتتیک انسانی، از شرکت Peprotech خریداری شد. به دلیل قرابت بالای توالی اکتیوین انسانی با ماهی زبرا، از ارتولوگ انسانی مذکور جهت تیمار بندی استفاده شد. تخم‌ها به محض حذف کورین، از شروع تسهیم (۴-۱ سلولی) بر مبنای دوزهای ۰ (گروه کنترل: ctl)، ۲/۵ (گروه A2) و ۵ ng/ml media (گروه A5) تیمار شدند (Tada *et al.*, 1998; Hyodo *et al.*, 2004; Melamed and Sherwood, 2005). به‌ازای هر تیمار ۱۵ تکرار (هر تکرار ۱۰۰ تخم) اتخاذ گردید. بررسی بیان نانوک و Oct4 در چهار نقطه زمانی 1K، oblong، dome و سپر رویانی (shield) (سه تکرار به‌ازای هر مقطع زمانی)، انجام گرفت. همچنین جهت بررسی بیان مادری ژن‌های هدف، بیان آن‌ها در تیمار شاهد، در مرحله ۲۵۶ سلولی سنجیده شد و بیان نسبی نسبت به سطح مادری تعریف شد تا روند تغییرات در حین بیان زایگوتیک ملموس گردد.

**بیان ژن:** تعداد ۱۰۰ رویان سالم، در مرحله تکوینی یکسان، توسط پیپت در زیر لوپ جدا و پس از شست‌وشو به تیوب‌های استریل منتقل شد. تیوب حاوی رویان‌ها در ازت مایع فریز شده و سپس در فریزر ۸۰- سانتی‌گراد تا زمان استخراج RNA و ارزیابی بیان ژن ذخیره گردید (Westerfield, 1995, 2000).

استخراج RNA، با استفاده از ترايزول (Gene all) انجام شد. در نهایت کمیت RNA با استفاده از نانودراپ-۲۰۰۰ سنجیده شد. علاوه بر ارزیابی کمی، اطمینان از کیفیت نمونه‌ها با ران کردن در ژل نیز ارزیابی شد و در نهایت باقی نمونه در ۸۰- سانتی‌گراد تا زمان سنتز cDNA ذخیره گردید. به منظور سنتز cDNA از کیت آریاتوس ۱۰۰ تایی استفاده شد. فرآیند سنتز cDNA طبق پروتکل شرکت سازنده انجام پذیرفت. cDNA حاصل مجدداً پس از ارزیابی کمی (نانودراپ) و کیفی

*et al.*, 2009; Wu and Hill, 2009; Liu and Stainier, 2012; Grove and Monuki, 2013; Brown *et al.*, 2016) را دارد.

با توجه به نامعلوم بودن نقش مسیر سیگنالینگ Smad2/3 در حفظ چندتوانی و ابهام در نقش فاکتورهای مادری شبه‌نودال/اکتیوین در ماهیان استخوانی حقیقی، در این مطالعه تلاش بر آن است که تاثیر تشدید مسیر سیگنالینگ Smad2/3 پیش از شروع بیان زایگوتیک، از طریق افزودن اکتیوین به محیط کشت، در بیان ژن‌های چندتوانی کلیدی اعم از نانوک و Oct4 ارزیابی گردد.

## ۲. مواد و روش

### ۲.۱. نگهداری و تکثیر مولدین

مولدین در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و با دوره نوری ۱۴ ساعت روشنایی به ۱۰ ساعت تاریکی به صورت مختلط و با نسبت جنسی دو ماده به سه نر نگهداری شدند. تخم‌ها پس از تکثیر طبیعی و تا حداکثر یک ساعت پس از شروع دوره نوری، جمع‌آوری شدند.

### ۲.۲. تیمارهای اکتیوین و طرح آزمایش

به منظور تماس سلول‌های رویان با اکتیوین A، نیاز به حذف کوریون است. بنابراین به منظور سهولت و تسریع روند حذف کوریون با استفاده از پنس، از محلول پروناز (Roche) به‌میزان ۲ mg/ml of media میلی گرم در میلی لیتر، به مدت یک دقیقه یا کم‌تر استفاده شد تا کوریون را ضعیف و شکننده‌تر کند. جهت حذف کامل آنزیم، تخم‌ها ۳-۴ بار و هر بار با حجم ۲۰۰ ml از محلول 8X water (محلول 8X water: ۱۲ ml محلول مادری در یک لیتر آب مقطر (محلول مادری شامل ۴۰ گرم نمک دریا در یک لیتر آب مقطر)) شست‌وشو داده شدند. سپس رویان‌های بدون کورین طبق برنامه زمانی ارائه شده توسط Kimmel و همکاران (۱۹۹۵) دسته‌بندی شده و در پتری‌دیش‌های ۳/۵ سانتی‌متری و با تراکم ۱۰۰ تخم در هر پلت در مدیای رویانی حاوی اکتیوین در دمای

### ۳. نتایج

#### ۱.۳. بررسی الگوی بیان نانوغ و Oct4 و تغییرات آن در تیمارهای مختلف

سطح بیان نانوغ در مرحله 1K، در گروه A5 بیش‌تر از گروه کنترل و A2 بود ( $P < 0.05$ ) (شکل ۱-ا). بیان نانوغ در مرحله oblong در گروه کنترل نسبت به هر دو تیمار A5 و A2 بیش‌تر بود ( $P < 0.05$ ) (شکل ۱-ا). میانگین بیان نانوغ در مرحله dome در گروه‌های آزمایشی اعم از کنترل، A2 و A5 اختلافی معنی‌دار نشان نداد (شکل ۱-ا) و میانگین بیان نانوغ نیز در مرحله Shield، میان گروه‌های آزمایشی اختلاف معنی‌دار نشان نداد ( $P > 0.05$ ).

مقایسه بیان Oct4 در مرحله 1K میان تیمارهای کنترل، A2 و A5 اختلاف معنی‌دار نشان داد ( $P < 0.05$ ) (شکل ۱-ب). بیان Oct4 در گروه کنترل نسبت به هر دو تیمار اکتیوین از سطح بالاتری برخوردار بود (شکل ۱-ب). تیمارهای کنترل، A2 و A5 در بیان Oct4 در مرحله oblong، اختلاف معنی‌دار داشتند ( $P < 0.05$ ). تیمار اکتیوین سطح بیان Oct4 را در مرحله oblong کاهش داد، اگرچه اختلاف گروه‌های A2 و A5 با یکدیگر معنی‌دار نبود (شکل ۱-ب). تیمارهای اکتیوین، هر دو بیان Oct4 را نسبت به گروه شاهد در مرحله dome کاهش دادند ( $P < 0.05$ )، ولی اختلاف A2 و A5 معنی‌دار نبود. بیان Oct4 در مرحله سپر رویانی میان شاهد و مجموعه تیمارهای اکتیوین تفاوت معنی‌دار نشان نداد ( $P > 0.05$ ) (شکل ۱-ب).

#### ۲.۳. بررسی الگوی بیان نانوغ و Oct4 و تغییرات آن در تیمارهای مختلف

بیان نانوغ در گروه کنترل در مراحل تکوینی مختلف تفاوت معنی‌دار نشان داد ( $P < 0.05$ ). سطح بیان نانوغ از مرحله 1K به صورت معنی‌داری تا مرحله oblong افزایش

(ژل) در فریزر  $-80^{\circ}\text{C}$  - سانتی‌گراد تا زمان ریل‌تایم ذخیره شدند.

جهت انجام ریل‌تایم PCR، از مسترمیکس سایبرگرین 2X (Ampliqon) استفاده گردید. واکنش‌ها در حجم نهایی  $20\ \mu\text{l}$  تنظیم شد. برای هر واکنش  $10\ \mu\text{l}$  سایبرگرین 2X،  $0.5\ \mu\text{l}$  پرایمر رفت و  $0.5\ \mu\text{l}$  پرایمر برگشت (غلظت  $20\ \mu\text{M}$ )،  $7\ \mu\text{l}$  آب و  $2\ \mu\text{l}$  از cDNA استفاده شد. لیست پرایمرهای طراحی شده شامل

nanog-F: TCTGAGCTGGCCCGATGC  
 nanog-R: GAATCACTGGGTGTACTACTGCTG  
 oct4-F: ACGCAGGCAGATGTGGGACTC  
 oct4-R: AGGGTTCTCGGAGTTTTTCGGC  
 gapdh-F: TGTTCAGTACGACTCCACC  
 gapdh-R: ACCTGCATCACCCCACTTAA

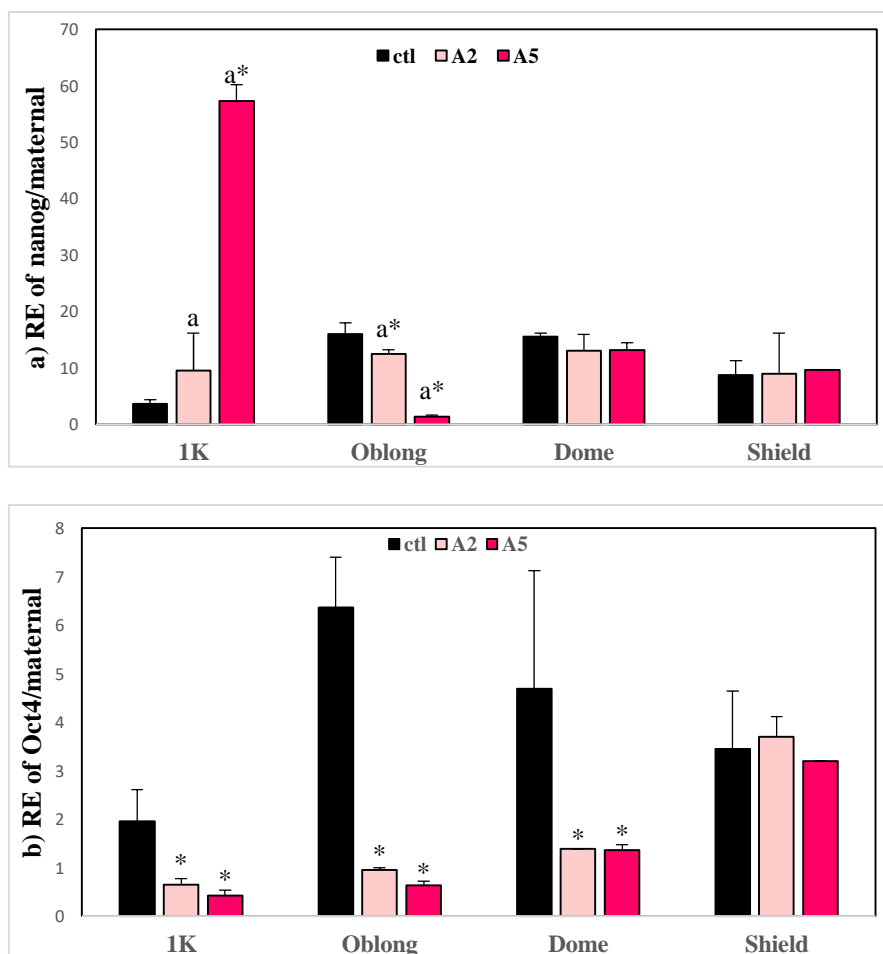
برنامه زمانی-گرمایی شامل  $15$  دقیقه دمای  $95^{\circ}\text{C}$  درجه سانتی‌گراد،  $35$  سیکل (شامل  $15$  ثانیه  $95^{\circ}\text{C}$ ،  $10$  ثانیه دمای  $58^{\circ}\text{C}$ ،  $10$  ثانیه دمای  $72^{\circ}\text{C}$ )،  $10$  ثانیه دمای  $95^{\circ}\text{C}$ ،  $60$  ثانیه دمای  $65^{\circ}\text{C}$  و  $15$  ثانیه  $93^{\circ}\text{C}$  درجه سانتی‌گراد. در نهایت محصولات نهایی با استفاده از ژل آگارز  $2\%$  درصد نیز ارزیابی شدند. بیان نسبی محصولات PCR توسط روش Ct مقایسه‌ای  $\Delta\Delta\text{Ct}$  انجام شد و به‌منظور نرمال کردن نمونه‌ها در روش کمی سازی نسبی از ژن gapdh (به‌عنوان ژن خانه‌دار) برای کنترل درونی استفاده شد (Darr et al., 2006; Camp et al., 2009; Zhendong, 2009; Wang et al., 2011; Yoshinari et al., 2012). بیان نسبی ژن‌ها نسبت به سطح مادری سنجیده شد.

#### ۳.۲. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

آنالیز آماری داده‌ها با استفاده از آنالیز واریانس یک‌طرفه، با کمک نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ انجام شد. از دانکن جهت مقایسه میانگین تیمارها استفاده شد. کلیه نتایج به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار بیان شدند. ترسیم نمودارها در برنامه Excel 2016 انجام پذیرفت.

بیان نانوغ در مرحله oblong نسبت به مرحله 1K معنی دار نبود (شکل ۲-ا). بیان نانوغ در تیمار A5 در مرحله 1K از سایر مراحل بالاتر بود ( $P < 0.05$ ) و پس از افت شدید در مرحله oblong، سطح نانوغ میان مراحل dome، سپر و نیز oblong اختلاف معنی دار نشان نداد ( $P > 0.05$ ) (شکل ۲-ا).

یافت (شکل ۲-ا) و بیان آن در مرحله oblong به پیک خود رسید، چراکه سطح بیان نانوغ در این مرحله، از کلیه مراحل تکوینی دیگر به استثنای dome با اختلاف، بالاتر بود. بیان نانوغ در مرحله سپر رویانی کاهش یافت ( $P < 0.05$ ). بیان نانوغ در گروه A2 در مراحل تکوینی مختلف اختلاف معنی دار نشان نداد ( $P = 0.701$ ). افزایش



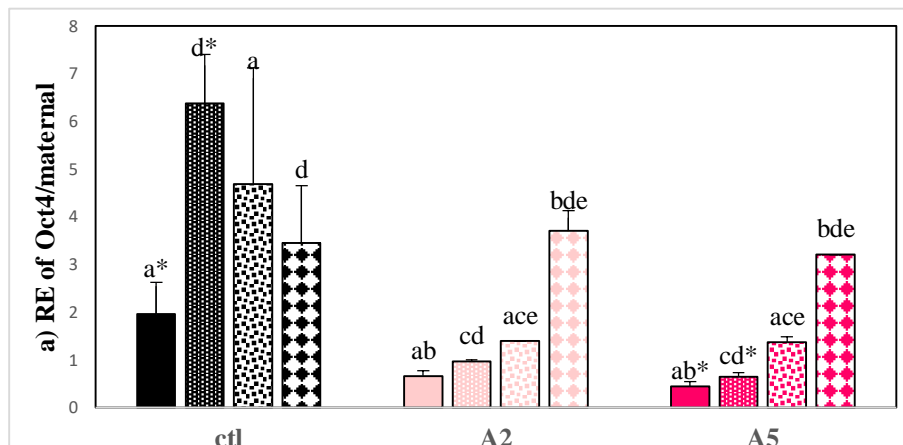
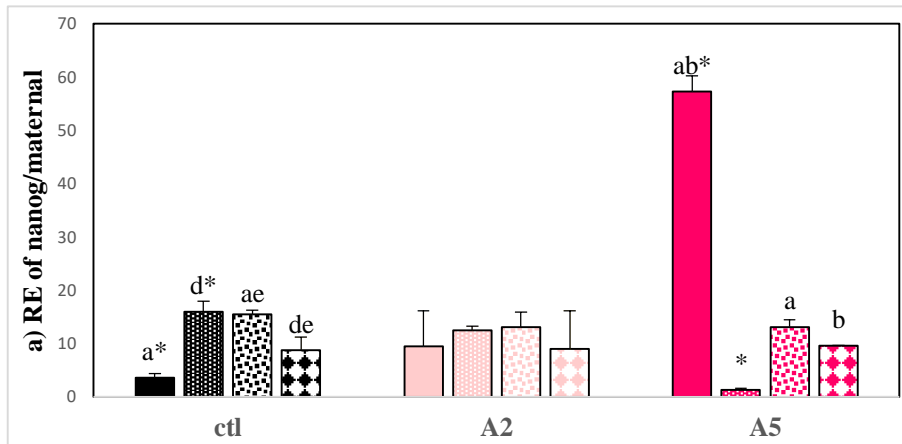
شکل ۱- بیان نانوغ و Oct4 (a) بیان نسبی نانوغ به سطح مادری. (b) بیان نسبی Oct4 به سطح مادری. \*:  $P < 0.05$  در برابر کنترل، a:  $P < 0.05$  میان A2 و A5.

سپر رویانی به ترتیب غیر معنی دار و معنی دار بود (شکل ۲-ب). سطح بیان Oct4 در گروه A2 در مراحل 1K و oblong با یکدیگر اختلاف معنی داری نشان نداد ( $P > 0.05$ ). در حقیقت تیمار اکتیوین پیک بیان Oct4 در مرحله oblong را سرکوب نموده است. در ادامه روند

بیان Oct4 در گروه کنترل از مرحله 1K تا oblong افزایش یافته ( $P = 0.007$ ) و به پیک خود در میان ایستگاه‌های زمانی ارزیابی شده در این آزمایش رسید. در ادامه سپر تکوین، بیان Oct4 سیری تدریجی نزولی نشان داد، به طوری که اختلاف میان oblong با مراحل dome و

تفاوت معنی‌دار داشتند ( $P < 0.05$ ). آزمون دانکن نشان داد که سطح بیان Oct4 از مرحله 1K تا سپر رویانی روندی صعودی داشته، و در هر مرحله بیان Oct4 نسبت به کلیه مراحل قبل و بعد خود اختلافی معنی‌دار داشته است ( $P < 0.05$ ) (شکل ۲-ب).

تکوین، بیان Oct4 روندی صعودی داشت، به نحوی که در مرحله dome نسبت به مراحل 1K و oblong اختلافی معنی‌دار نشان داد و مجدداً در مرحله سپر رویانی نیز فزونی یافته و با هر سه مرحله قبلی تفاوتی معنی‌دار داشت (شکل ۲-ب). مراحل مختلف تکوین در تیمار A5



شکل ۲- الگوی بیان نانوغ و Oct4 (a) بیان نسبی نانوغ به سطح مادری. (b) بیان نسبی Oct4 به سطح مادری. الگوهای در نمودارهای مستطیلی الگوهای استفاده شده از چپ به راست مراحل 1K، oblong، dome و shield هستند. اختلاف معنی‌دار میان مرحله 1K با مراحل بعدی به ترتیب با \*، a و b نشان داده شده است. تفاوت معنی‌دار میان مرحله oblong با مراحل dome و shield به ترتیب با c و d نمایش داده شده است. اختلاف معنی‌دار میان dome و shield با e نشان داده شد.

سطح مادری و در مرحله oblong، تقریباً به ۱۶ برابر رسید و در نهایت در مرحله سپر رویانی شدیداً کاهش یافت. مطالعه‌ای نشان داد که ترانس کریپت‌های مادری

#### ۴. بحث و نتیجه‌گیری

در این تحقیق، بیان عامل رونویسی نانوغ در مرحله 1K، همزمان با شروع بیان زایگوتیک به بیش از ۳/۵ برابر

رسیده‌اند. همچنین بیان زایگوتیک Oct4 نیز در بلاستولا شروع شده و سپس شدیداً تا انتهای گاسترولاسیون کاهش پیدا می‌کند (Gao *et al.*, 2017).

با توجه به فعال بودن مسیرهای سیگنالینگ سلولی پیش از آغاز بیان زایگوتیک (maternal to zygotic transition: MZT)، بهره‌گیری از تیمار اکتیوین پیش از آن، منجر به فعال و فسفوریل شدن سطح بالاتری از Smad2/3 در قیاس با تیمار شاهد و متعاقباً بهبود سطح بیان نانوغ نسبت به گروه کنترل، در مرحله 1K شده است، اگرچه تجزیه و تحلیل آماری اختلاف مذکور را تنها به ازای تیمار A5 معنی‌دار دانست. براساس مطالعات در سلول‌های بنیادی موش و انسان در پروکسیمال پروموتور نانوغ، ۴ دومین، جهت اتصال Smad (SBE) شناسایی شده‌اند. بنابراین Smad2/3 به‌عنوان یک عامل رونویسی مستقیماً در بالادست نانوغ قرار دارد (Kramer, 2002; Fritsch and Singer, 2008; Gordon and Blobel, 2008; Chng *et al.*, 2011; Donahue and Dawson, 2011; Shin *et al.*, 2011; Chen and Zhang, 2012; Marcon and Sharpe, 2012; Sun *et al.*, 2014; Bertero *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2016). با توجه به افزایش سطح بیان نانوغ در تیمارهای اکتیوین، رابطه ساختاری مذکور در پستانداران، در ماهی زبرا نیز دور از انتظار نیست. در این تحقیق، در ادامه در مرحله oblong سطح بیان نانوغ در تیمارهای اکتیوین با اطمینان ۹۵ درصد کاهش یافت. بنابراین، چنین استنتاج می‌شود که سطح بیان نانوغ می‌باید در زمانی زودتر از مرحله oblong به پیک خود رسیده باشد. در ادامه روند تکوین بیان نانوغ میان تیمارهای اکتیوین با کنترل نسبت به مرحله متناظر خود، اختلافی معنی‌دار را نشان نداد و اساساً چنین به نظر می‌رسد که موجود به سیر طبیعی تکوین نظیر گروه کنترل بازگشته است. چنین به نظر می‌رسد که Oct4 و نانوغ به‌صورت دوسویه به تنظیم بیان یکدیگر می‌پردازند. تاکنون در سلول‌های بنیادی موش و انسان نشان داده شده است که رابطه نانوغ و Oct4 رابطه‌ای دوفازی است، به نحوی که این دو فاکتور در فاز اول و به‌ازای سطح

نانوغ که در تخم حاضر هستند، در حین فعال‌سازی ژنوم زایگوتیک (ZGA)، افزایش یافته و در ادامه، این روند افزایشی-تدریجی تا ابتدای گاسترولا، امتداد یافته و نهایتاً در حلقه زاینده به اوج می‌رسد، لیکن هم‌زمان با وقوع سگمنتاسیون در ۹ hpf نانوغ به میزان شایان توجهی کاهش یافته و در نهایت پس از سومیت‌زایی ناکاوت می‌گردد (الگوی بیان طبیعی). همچنین نانوغ در حین گاسترولاسیون در مرحله سپر رویانی به سرعت کاهش یافته و در انتهای گاسترولاسیون، در مرحله جوانه دمی (tail bud) دیگر قابل تشخیص نخواهد بود (Sánchez-Sánchez *et al.*, 2011; Zhou *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2016). در ماکا هر دو mRNA های مادری مربوط به نانوغ و oct4 در اوو سیت قابل رویت هستند و اساساً بیان این فاکتورها را تا مرحله گاسترولا می‌توان دنبال کرد، اگرچه از اواخر گاسترولا قابل تشخیص نخواهند بود. در موش نیز، ترانس‌کریپت‌های مادری نانوغ در همه سلول‌های به‌هم فشرده مورولا قابل ملاحظه است، اگرچه در مطالعه‌ای دیگر حضور نسخ مادری نانوغ رد شده است (Wang *et al.*, 2011). در مجموع چنین استنتاج می‌شود که الگوی بیان نانوغ در گروه کنترل با مشاهدات پیشین همراستا است و اهمیت حضور نسخ مادری نانوغ به نقش کلیدی آن در اکتیواسیون رونویسی بیش از ۸۰ درصد زن‌ها در آغاز بیان زایگوتیک برمی‌گردد (Gong and Korzh, 2004; Zhiyuan and Vladimir, 2004; Xu *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2013; Leichsenring *et al.*, 2013; Voronina and Pshennikova, 2016; Xiao *et al.*, 2016).

بیان oct4 در مرحله 1K با شروع بیان زایگوتیک به حدود دوبرابر سطح مادری رسید. در مطالعات دیگر Oct4 به عنوان یک فاکتور مادری به صورت سراسری و یکنواخت در مورولا ملاحظه شد (در ماهی زبرا و در موش) و با شروع بیان زایگوتیک افزایش شایان توجهی را نشان داد (Wang *et al.*, 2011; Xu *et al.*, 2012). الگوی بیان Oct4 در ماهی پهن *Paralichthys olivaceous* نیز نشان داد که ترانس‌کریپت‌های مادری Oct4 در اووسیت به ارث



کاهش می‌دهد. بنابراین، علی‌رغم آن که سطح Oct4 در گروه شاهد در مرحله oblong از 1K با اختلاف، بالاتر بود و در نگاه اول چنین به نظر می‌آید که همگام با نانوغ به پیکر رسیده است، ولی باید پیکر اصلی این فرایند را در زمانی بین 1K تا oblong جست‌وجو کرد، به نحوی که پس از آن و تا رسیدن به oblong کاهش یافته است. در ادامه روند تکوین با توجه به سیر طبیعی آن و مداخله عوامل اپی‌ژنتیک و هماهنگی با نانوغ، Oct4 نیز به آهستگی کاهش پیدا می‌کند. با توجه به این که در تیمارهای اکتیوین سطح نانوغ از همان ابتدا، معادل با سطح آغازین افزایش ناگهانی در روند طبیعی است، نوع رابطه Oct4 و نانوغ نیز از همان بدو به صورت منفی بوده و بیان Oct4 را سرکوب کرده و کاهش داده است.

پایداری از بیان Oct4، اثر مثبتی در بیان یکدیگر القا می‌کنند، به عبارت دیگر دارای فیدبک مثبت بوده و به بهبود یکدیگر متقابلاً کمک می‌نمایند، لیکن با رسیدن به آستانه نامشخصی رابطه میان آن دو به فاز دوم سوق نموده و به‌ازای آن نانوغ یک اثر القایی منفی در بیان Oct4 نشان می‌دهد ( Gong and Korzh, 2004; Zhiyuan and Vladimir, 2004; Lee et al., 2013; Leichsenring et al., 2016; Xiao et al., 2016). طبق نتایج حاضر در این مطالعه و بررسی کلیه تیمارها با یکدیگر، چنین استنتاج شد که تا پیش از افزایش ناگهانی نانوغ، وجود خودتنظیمی مثبت بین نانوغ و Oct4 به نحوی است که به بهبود و افزایش سطح یکدیگر کمک کرده و هم‌سو با یکدیگر هستند. لیکن با افزایش ناگهانی نانوغ تا oblong، رابطه به سمت فیدبک منفی سوق نموده و Oct4 را

## References

## ۵. منابع

- Bennett, J.T., Joubin, K., Cheng, S., Aanstad, P., Herwig, R., Clark, M., Lehrach, H., Schier, A.F., 2007. Nodal signaling activates differentiation genes during zebrafish gastrulation. *Developmental Biology* 304(2), 525-540.
- Bertero, A., Madrigal, P., Galli, A., Hubner, N.C., Moreno, I., Burks, D., Brown, S., Pedersen, R.A., Gaffney, D., Mendjan, S., 2015. Activin/nodal signaling and NANOG orchestrate human embryonic stem cell fate decisions by controlling the H3K4me3 chromatin mark. *Genes & Development* 29(7), 717-702.
- Brown, D.R., Samsa, L.A., Qian, L., Liu, J., 2016. Advances in the study of heart development and disease using zebrafish. *Journal of Cardiovascular Development and Disease* 3(2), 13.
- Camp, E., Sánchez-Sánchez, A.V., García-España, A., DeSalle, R., Odqvist, L., Enrique O'Connor, J., Mullor, J.L., 2009. Nanog regulates proliferation during early fish development. *Stem Cells* 27(9), 2081-2091.
- Cavaleri, F., Schöler, H., 2009. Molecular bases of pluripotency. In: (Eds.), *Essentials of Stem Cell Biology*. Elsevier, pp. 37-60.
- Chan, T.-M., Longabaugh, W., Bolouri, H., Chen, H.-L., Tseng, W.-F., Chao, C.-H., Jang, T.-H., Lin, Y.-I., Hung, S.-C., Wang, H.-D., 2009. Developmental gene regulatory networks in the zebrafish embryo. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanism* (-) 279-298.
- Chen, L., Zhang, L., 2012. A balanced network: transcriptional regulation in pluripotent stem cells. *Journal of Stem Cell Research & Therapy* 10, 004.
- Chng, Z., Vallier, L., Pedersen, R., 2011. Activin/nodal signaling and pluripotency. *Vitamins & Hormones* 85 (7), 39-58.
- Darr, H., Mayshar, Y., Benvenisty, N., 2006. Overexpression of NANOG in human ES cells enables feeder-free growth while inducing primitive ectoderm features. *Development* 133(1), 1193-1201.
- Donahue, T.R., Dawson, D.W., 2011. Nodal/Activin signaling: a novel target for pancreatic cancer stem cell therapy. *Cell Stem Cell* 9(-), 383-4.
- Field, H.A., Dong, P.S., Beis, D., Stainier, D.Y., 2003a. Formation of the digestive system in zebrafish. II. pancreas morphogenesis. *Developmental Biology* 261(-), 197-208.
- Field, H.A., Ober, E.A., Roeser, T., Stainier, D.Y., 2003b. Formation of the digestive system in zebrafish. I. Liver morphogenesis. *Developmental Biology* 253(-), 279-290.
- Fritsch, M.K., Singer, D.B., 2008. Embryonic stem cell biology. *Advances in Pediatrics* 55 (-), 43-77.
- Gao, J., Wang, X., Zhang, Q., 2017. Evolutionary conservation of pou5f3 genomic organization and its dynamic distribution during embryogenesis and in adult gonads in Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *International*

- Journal of Molecular Sciences* 18 (1), 1-20.
- Glickman, N.S., Yelon, D., 2002. Cardiac development in zebrafish: coordination of form and function. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 13(6), 507-513.
- Gong, Z., Korzh, V., 2004. Fish development and genetics: the zebrafish and medaka models. World Scientific Pub Co Inc. 688 p.
- Gordon, K.J., Blobbe, G.C., 2008. Role of transforming growth factor- $\beta$  superfamily signaling pathways in human disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease* 1782(-), 197-228.
- Gore, A.V., Sampath, K., 2002. Localization of transcripts of the zebrafish morphogen Squint is dependent on egg activation and the microtubule cytoskeleton. *Mechanisms of Development* 112(-), 153-156.
- Grapin-Botton, A., 2009. Endoderm specification. In: StemBook [Internet]. Cambridge (MA): Harvard Stem Cell Institute; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27052>.
- Grove, E., Monuki, E., 2013. Morphogens, patterning centers, and their mechanisms of action. In: Rubenstein J, Rakic P (Eds.). *Patterning and Cell Type Specification in the Developing CNS and PNS*. San Diego: Academic Press. pp. 25-44.
- Hagos, E.G., Dougan, S.T., 2007. Time-dependent patterning of the mesoderm and endoderm by Nodal signals in zebrafish. *BMC Developmental Biology* 7, 22.
- Hagos, E.G., Fan, X., Dougan, S.T., 2007. The role of maternal Activin-like signals in zebrafish embryos. *Developmental Biology* 309(-), 245-258.
- Heisenberg, C.-P., Tada, M., Year. Zebrafish gastrulation movements: bridging cell and developmental biology. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 13(6), 471-479.
- Hyodo, M., Makino, S., Awaji, Y., Sakurada, Y., Ohkubo, T., Murata, M., Fukuda, K., Tsuda, M., 2004. A novel in vitro system for studying cardiomyocyte differentiation with medaka embryonic cells. *International Journal of Developmental Biology* 53(-), 615-622.
- Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann, B., Schilling, T.F., 1995. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental Dynamics* 203(-), 253-310.
- Kodjabachian, L., Dawid, I.B., Toyama, R., 1999. Gastrulation in zebrafish: what mutants teach us. *Developmental Biology* 213(-), 231-245.
- Kondo, M., 2007. Bone morphogenetic proteins in the early development of zebrafish. *The FEBS Journal* 274, 2960-2967.
- Kramer, I.M., 2002. Signal Transduction. Academic Press, 840 p.
- Lee, M.T., Bonneau, A.R., Takacs, C.M., Bazzini, A.A., DiVito, K.R., Fleming, E.S., Giraldez, A.J., 2013. Nanog, Pou5f1 and SoxB1 activate zygotic gene expression during the maternal-to-zygotic transition. *Nature* 503(-), 360-364.
- Leichsenring, M., Maes, J., Mössner, R., Driever, W., Onichtchouk, D., 2013. Pou5f1 transcription factor controls zygotic gene activation in vertebrates. *Science* 341(-), 1005-1009.
- Liu, J., Stainier, D.Y., 2012. Zebrafish in the study of early cardiac development. *Circulation Research* 110(-), 870-874.
- Marcon, L., Sharpe, J., 2012. Turing patterns in development: what about the horse part? *Current Opinion in Genetics & Development* 22(-), 578-584.
- Melamed, P., Sherwood, N., 2005. Hormones and their receptors in fish reproduction. World Scientific. 297 p.
- Moss, J.B., Sbrogna, J.L., Karlstrom, R.O., Moss, L.G., 2002. Sonic hedgehog is required early in pancreatic islet development. *Developmental Biology* 244(-), 75-84.
- Mullins, M.C., 1998. Embryonic axis formation in the zebrafish. *Methods in Cell Biology* 15(-), 159-178.
- Munoz-Sanjuan, I., 2001. Early posterior/ventral fate specification in the vertebrate embryo. *Developmental Biology* 237(-), 1-17.
- Ober, E.A., Field, H.A., Stainier, D.Y., 2003. From endoderm formation to liver and pancreas development in zebrafish. *Mechanisms of Development* 120(-), 5-18.
- Pauklin, S., Vallier, L., 2015. Activin/Nodal signalling in stem cells. *Development* 142(-), 607-619.
- Raftery, L.A., Sutherland, D.J., 1999. TGF- $\beta$  family signal transduction in Drosophila development: from Mad to Smads. *Developmental Biology* 210(-), 251-268.
- Sánchez-Sánchez, A.V., Camp, E., Mullor, J.L., 2011. Fishing pluripotency mechanisms *in vivo*. *International Journal of Biological Sciences* 7, 410.
- Shen, M.M., 2007. Nodal signaling: developmental roles and regulation. *Development* 134(-), 1023-1034.
- Shen, M.M., Schier, A.F., 2000. The EGF-CFC gene family in vertebrate development. *Trends in Genetics* 16(-), 303-309.
- Shin, M., Alev, C., Wu, Y., Nagai, H., Sheng, G., 2011. Activin/TGF-beta signaling regulates Nanog expression in the epiblast during gastrulation. *Mechanisms of Development* 128(-), 268-278.

- Sun, L.T., Yamaguchi, S., Hirano, K., Ichisaka, T., Kuroda, T., Tada, T., 2014. Nanog co-regulated by Nodal/Smad2 and Oct4 is required for pluripotency in developing mouse epiblast. *Developmental Biology* 392(-), 182-192.
- Sun, Z., Jin, P., Tian, T., Gu, Y., Chen, Y.-G., Meng, A., 2006. Activation and roles of ALK4/ALK7-mediated maternal TGF $\beta$  signals in zebrafish embryo. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 345(-), 694-703.
- Tada, T., Hirono, I., Aoki, T., Takashima, F., 1998. Cloning and sequencing of carp and medaka activin subunit genes. *Fisheries Science* 64(-), 680-685.
- ten Dijke, P., Hill, C.S., 2004. New insights into TGF- $\beta$ -Smad signalling. *Trends in Biochemical Sciences* 29(5), 265-273.
- Ulrich, F., Heisenberg, C.-P., 2004. Gastrulation in zebrafish. *Molecular Aspects of Fish and Marine Biology* 2(-), 39-87.
- Vallier, L., 2016. {TGF}- $\beta$  Superfamily Signaling}. In: R. Bradshaw, P. Stah (Eds.), *Encyclopedia of Cell Biology*. Elsevier, pp. 1-37.
- Voronina, A., Pshennikova, E., 2016. The Vox mRNA and protein expression in zebrafish Pou5f3 MZspg mutant embryos. *Stem Cell Investigation* 3(10), 79-87.
- Wang, D., Manali, D., Wang, T., Bhat, N., Hong, N., Li, Z., Wang, L., Yan, Y., Liu, R., Hong, Y., 2011. Identification of pluripotency genes in the fish medaka. *International Journal of Biological Sciences* 7, 440.
- Wang, H., Liu, Y., Ye, D., Li, J., Liu, J., Deng, F., 2016. Knockdown of zebrafish Nanog increases primordial germ cells during early embryonic development. *Development, Growth & Differentiation* 58(4), 355-366.
- Westerfield, M., 1995. *The zebrafish book: a guide for the laboratory use of zebrafish (Brachydanio rerio)*. University of Oregon press, p.
- Westerfield, M., 2000. *The zebrafish book: a guide for the laboratory use of zebrafish*. [http://zfin.org/zf\\_info/zfbook/zfbk.html](http://zfin.org/zf_info/zfbook/zfbk.html).
- Wu, M.Y., Hill, C.S., 2009. TGF- $\beta$  superfamily signaling in embryonic development and homeostasis. *Developmental Cell* 16(3), 329-343.
- Xiao, Y., Gao, M., Gao, L., Zhao, Y., Hong, Q., Li, Z., Yao, J., Cheng, H., Zhou, R., 2016. Directed differentiation of zebrafish pluripotent embryonic cells to functional cardiomyocytes. *Stem Cell Reports* 7(3), 370-382.
- Xu, C., Fan, Z.P., Müller, P., Fogley, R., DiBiase, A., Trompouki, E., Unternaehrer, J., Xiong, F., Torregroza, I., Evans, T., 2012. Nanog-like regulates endoderm formation through the Mxtx2-Nodal pathway. *Developmental Cell* 22, 625-638.
- Yelon, D., 2001. Cardiac patterning and morphogenesis in zebrafish. *Developmental Dynamics* 222(4), 552-563.
- Yoshinari, N., Ando, K., Kudo, A., Kinoshita, M., Kawakami, A., 2012. Colored medaka and zebrafish: Transgenics with ubiquitous and strong transgene expression driven by the medaka  $\beta$ -actin promoter. *Development, Growth & Differentiation* 54(9), 818-828.
- Zhendong, L., 2009. Nanog in the twin fish models medaka and zebrafish: Functional divergence or pleiotropy of vertebrate pluripotency gene. National University of Singapore Doctoral thesis.
- Zhiyuan, G., Vladimir, K., 2004. *fish development and genetics: the zebrafish and medaka models*. World Scientific, 688 p.
- Zhou, Y., Li, S., Huang, Q., Xie, L., Zhu, X., 2013. Nanog suppresses cell migration by downregulating thymosin  $\beta$ 4 and Rnd3. *Journal of Molecular Cell Biology* 5(4), 239-49.