

تغییرات بیان ژن کدکننده عوامل القایی هایپوکسی ($hif-1\alpha$, $hif-2\alpha$) در دوره تکامل لاروی ماهی قره برون (*Acipenser persicus* Borodin, 1897)

حامد کلنگی میاندره^{۱*}، امید جعفری^۲، مریم نصراله پورمقدم^۳

- ۱- استادیار، گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان
۲- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان
۳- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج

پذیرش: ۱۳۹۲/۱۱/۸

دریافت: ۱۳۹۲/۴/۵

*نویسنده مسئول مقاله: hkolangi@gau.ac.ir

چکیده:

غلظت اکسیژن موجود در محیط و سلول‌های زنده یکی از عوامل اصلی تأثیرگذار در روند تکاملی موجودات است. در این تحقیق بیان ژن عوامل القاکننده هایپوکسی ($hif-1$ و $hif-2$) در شرایط طبیعی اکسیژنی طی دوره تکامل لاروی ماهی قره برون (*Acipenser persicus*) ارزیابی شد. بررسی‌ها حاکی از بیان دو ژن $hif-1$ و $hif-2$ در تمامی مراحل تعریف شده در دوران تکاملی لاروی این ماهی بود. بیان ژن‌های هدف نیز با ژن رفرنس RPL6 عادی‌سازی شدند. تغییرات بیان ژن‌های مذکور در دوران تکامل لاروی نشان داد که بیان هر دو ژن پیش از تفریخ تخم‌ها پایین بوده ولی به محض تفریخ، بیان هر دو ژن $hif-1$ و $hif-2$ به‌طور معناداری افزایش یافت ($p < 0.05$). مقایسه میزان بیان این دو ژن بیانگر این موضوع بود که بالاترین میزان بیان ژن $hif-1$ و $hif-2$ به‌ترتیب ۱۵ و ۲۰ روز پس از تفریخ اتفاق افتاده است. روند افزایش بیان این ژن‌های حاکی از ارتباط آن‌ها با دو پدیده مهم در تکامل لاروی است؛ یعنی تغذیه داخلی (جذب زرده) و تغذیه خارجی که یک پدیده مهم در نمو است. بیان ژن‌های مذکور در دوره تکاملی لاروی ماهی قره برون می‌تواند نشان‌دهنده افزایش نیاز اکسیژنی باشد.

کلید واژگان: اندام‌زایی، بیان ژن، تکامل لاروی، ماهی قره برون

مقدمه

نقش اکسیژن در تکامل، فیزیولوژی و آسیب‌شناسی از موضوعات بیولوژیکی مهمی است که از گذشته تاکنون از مباحث مورد علاقه بسیاری از دانشمندان و محققان بوده است (Nikinmaa and Rees, 2005). شرایط کمبود اکسیژنی منجر به رونویسی ژن‌هایی می‌شود که باعث افزایش دریافت اکسیژن از محیط و متابولسیم بی‌هوازی و توقف رشد در تمام موجودات از بی‌مهرگان تا پستانداران می‌شود و در اکثر مواقع عوامل القای هایپوکسیا^۱ (*hif-1*) (*hif-2*) مسئول بیان این ژن‌ها هستند (Kajimura et al., 2006). شرایط کمبود اکسیژنی موجب تحریک استرس اکسایشی و تسهیل پایدارسازی *hif-1α* در شرایط استرس اکسیژنی می‌شود (Bell et al., 2007). عوامل القای هایپوکسی (*hifs*) از دو زیر واحد α و β تشکیل شده است. اشکال فرم‌های نوع آلفا شامل *hif-1α*، *hif-2α* و *hif-3α* بوده و نوع بتا در واقع همانی هستند که پیش‌تر با عنوان ARNT^۲ خوانده می‌شدند (Gu et al., 1998; Wiesener et al., 1998). شکل بتا علاوه بر نقشی که در سیگنال‌دهی در شرایط کمبود اکسیژنی دارد، باعث بیان ژن در سلول‌ها به واسطه قرارگیری در معرض دیوکسین‌ها و دیگر آلوده‌کننده‌های هیدروکربنی می‌شود. *hif-1β* در همه جا یافت می‌شود اما *hif-1α* در شرایط نورموکسیک به میزان خیلی کم وجود دارد. به‌طور ویژه *hif-1α* یک تنظیم‌کننده مهم برای پاسخ در برابر شرایط هایپوکسی شامل تکامل رگ‌های خونی و گلبول‌های قرمز است (Semenza, 2004; Nikinmaa and Rees, 2005; Wenger et al., 2005). *hif-2β* به‌عنوان ارتقادهنده فعالیت پروتئین‌هایی مانند VEGF، COL10A1 و MMP13 در نظر گرفته می‌شود. زیرواحد *hif-3α* براساس زنجیره

ماریپچ ساختار پروتئینی با دو زیرواحد دیگر تفاوت داشته و نگاه غالبی که درباره آن وجود دارد، این است که *hif-3α* به‌عنوان یک ممانعت‌کننده در هنگام فعالیت دو زیرواحد دیگر عمل می‌کند، ولی مطالعات نشان داد که این ژن نیز تحت شرایط حاد اکسیژنی نیز بیان می‌شود و نقش مکملی دارد (Ivan et al., 2001). در شرایط طبیعی اکسیژنی، پروتئین *hif* بیان نشده و به‌صورت غیرفعال بوده و به سرعت در مسیر تخریب پروتئازومی قرار می‌گیرد. ولی در شرایط حاد اکسیژنی عوامل القای کمبود اکسیژنی در سلول تجمع یافته و در نهایت با تشکیل باند بین *hif-1α* و *hif-2β* بیان پروتئین‌های *hifs* صورت می‌گیرد (Maxwell et al., 1999; Ohh et al., 2000; Ivan et al., 2001; Jaakkola et al., 2001; Masson et al., 2001). همچنین عوامل القای هایپوکسیا به‌عنوان معبری برای افزایش بیان ژن IGFBP-1^۳ در شرایط هایپوکسی بوده و نقش کلیدی بر رشد جنین و مدت زمان تکاملی در پاسخ به اکسیژن محیطی دارد. هایپوکسی یک دیده طبیعی در طول مراحل تکامل جنینی (Embryogenesis) است. به نظر می‌رسد هایپوکسی موضعی هنگام ساخت اندام‌ها و به‌عنوان یک سیگنال برای تحریک تشکیل عروق خونی ضروری است و *hif-1α* نقش تنظیمی در رشد و عملکرد فیزیولوژیکی دستگاه‌های حیاتی مانند قلب و آبشش را بر عهده دارد. *hif-1β* به‌عنوان ARNT نیز شناخته شده است و با وجود اکسیژن به‌صورت غیرفعال است.

ماهی قره برون از ماهیان خاویاری بومی ایران بوده که سازمان شیلات ایران برای حفظ و بقای این گونه با ارزش اقتصادی اقدام به تکثیر و پرورش و رهاسازی این ماهی به دریای خزر کرده است. بنابراین مراحل لاروی و اولیه زندگی در ماهیان خاویاری بسیار حساس بوده و موفقیت

1. Hypoxia-inducible factors

2. Aryl hydrocarbon nuclear trans locator

3. Insulin-like growth factor binding protein 1

در این مرحله می‌تواند تا حدودی میزان بازماندگی را در شرایط اسارت افزایش دهد. از این‌رو، از آنجایی که ژن‌های درگیر در هایپوکسی نقش بسیار مهمی در فعالیت‌های مهم فیزیولوژیکی دوران تکاملی موجودات بر عهده دارند، مطالعه حاضر با هدف بررسی روند بیان این ژن‌ها در دوره تکاملی تاس ماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) به‌عنوان گونه بومی ایران صورت پذیرفت. مطمئناً این مطالعه می‌تواند راهگشای مطالعات متعددی در آینده باشد.

مواد و روش‌ها:

برای انجام آزمایش از تخم‌های لقاح‌یافته موجود در مرکز تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری شهید مرجانی واقع در آق‌قلا نمونه‌برداری شد. تخم‌های ماهی قره‌برون هفت روز پس از لقاح در دمای 18°C تفریخ شدند. پس از تفریخ تخم‌ها، لاروها تا زمان جذب زرده و شروع تغذیه خارجی در تانک‌های فایبرگلاس نگهداری و سپس تا زمان رهاسازی در استخرهای خاکی پرورش داده شدند. لاروهای ماهی قره‌برون تغذیه خارجی خود را در روز دهم پس از هیچ شروع کردند. نمونه‌های مورد آزمایش در ۱۰ مرحله زمانی به‌صورت دو روز پیش از تفریخ (تخم چشم‌زده)، لارو تازه هیچ شده (صفر) و لارو ۱، ۳، ۶، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵ و ۵۰ روز پس از هیچ در فاصله زمانی اسفند تا اردیبهشت ۱۳۸۹-۱۳۹۰ جمع‌آوری شدند. از هر مرحله بیش از ۶ عدد نمونه گرفته شده و در مراحل انجام PCR تعداد ۳ تکرار آزمایشگاهی، در مجموع برای هر مرحله ۱۸ تکرار وجود داشت. تمام نمونه‌های ماهی با غلظت بالای MS-222 کشته و تخم‌ها و لاروهای به‌سرعت در ازت مایع منجمد و پس از انتقال به آزمایشگاه در فریزر 80°C - تا زمان استخراج RNA نگهداری شدند.

استخراج RNA و سنتز cDNA

روش استخراج RNA، کنترل کیفیت و کمیت RNA و سنتز cDNA به اجمال در منابع مختلف شرح داده شده است (Akbarzadeh et al., 2011). به‌طور خلاصه، مجموع تخم‌ها و لاروهای حاصل شده به‌صورت جداگانه در بافر استخراج (Molecular Research Center, Inc., Tri Reagent (Cincinnati, OH, USA) قرار داده شدند و با دستگاه هموژنایزر کیاژن به‌طور کامل هضم شدند. استخراج RNA کل از ۱۸ تکرار زیستی و آزمایشگاهی برای هر مرحله از دوره تکاملی صورت پذیرفت و با استفاده از کیت Nucleospin (Macherey- Nagel, Germany) مطابق با دستورالعمل استریل شده، سپس از لحاظ کیفی و کمی بر روی ژل آگاروز یک درصد و دستگاه نانودراپ ND-1000 (ThermoScientific) ارزیابی شدند. برای سنتز cDNA ابتدا RNA ها تحت تیمار DNase (Invitrogen, CA, USA) قرار داده شدند. سپس یک میکروگرم از RNA با استفاده از کیت DyNamoTM (Finnzyme, Espoo, Finland)، برای سنتز اولین رشته cDNA به‌کار برده شد.

طراحی پرایمر

پرایمرهای مورد نیاز برای ژن‌های *hif-1* و *hif-2* برای انجام qPCR، طبق توالی‌های موجود در بانک ژنی NCBI (*Acipenser gueldenstaedtii*-EF100701.1, *Acipenser persicus* JQ027715.1) طراحی شد. از میان پرایمرهای طراحی شده برای هر ژن بهترین پرایمر (حدود ۲۰۰ bp) برای مطالعه بیان ژن‌های مذکور انتخاب شد (جدول ۱). اندازه محصول PCR باتوجه به پرایمرها و میزان اختصاصی عمل کردن پرایمرهای مورد بررسی با استفاده از ژل آگارز یک درصد و توالی‌یابی ژن‌ها تأیید شد. لازم به ذکر است که از پرایمرهای مورد استفاده در

مطالعه کلنگی و همکاران (۲۰۱۳) به عنوان ژن مرجع در این پژوهش استفاده شد. همچنین از بین ژن های RPL6, EF, GAPDH, RPL13, BetaActin, کمترین واریانس و بیشترین پایداری در ژن RPL6 مشاهده شد و

جدول ۱ پرایمرهای به کار برده شده در انجام qPCR

نام پرایمر	توالی
<i>hif-2</i> F:	GAAGGTCCTGCACTGCACT
<i>hif-2</i> R:	CTTGGTGCACAAGTTCTGGT
<i>hif-1</i> F:	ACAGAGCTGATGGGATACCAG
<i>hif-1</i> R:	CCTGTGATGGCTTGCCTTT
<i>RPL6</i> F:	GTGGTCAAACCTCCGCAAGA
<i>RPL6</i> R:	GCCAGTAAGGAGGATGAGGA

های *hif-1* و *hif-2* با دو بار مشتق گیری از $Ct(2^{-\Delta\Delta Ct})$ محاسبه شد که در آن $\Delta\Delta Ct$ برابر است با ΔCt ژن هدف منهای ΔCt کالیبراتور $\Delta Ct - \Delta Ct_{\text{Target gene}}$ $[\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{calibrator}} - \Delta Ct_{\text{reference gene}}]$ Ct ژن هدف منهای Ct ژن رفرنس $Ct_{\text{reference gene}} - Ct_{\text{target gene}}$ $[\Delta Ct_{\text{Target gene}} = Ct_{\text{target gene}} - \Delta Ct_{\text{calibrator}}]$ کالیبراتور برابر است با ΔCt ژن هدف هر نمونه منهای ΔCt نمونه کنترل (Livak and Schmittgen, 2011). در بین نقاط زمانی مورد نظر در این تحقیق، زمانی که پایین ترین Ct را دارد به عنوان نمونه کالیبراتور برای ارزیابی نسبی بیان ژن هدف در نظر گرفته شد. کارامدی برای هر پرایمر ارزیابی شد، دامنه آن در حدود ۹۵-۹۹ درصد بوده که نشان دهنده اتصال صحیح پرایمرهاست. سطح بیان *hif-1* و *hif-2* بین مراحل مختلف تکاملی ماهی قره برون با استفاده از تجزیه واریانس یک طرفه (ANOVA) به حالت طبیعی درآمدند و سپس از آزمون Tukey برای تحلیل های چند مقایسه ای استفاده شد.

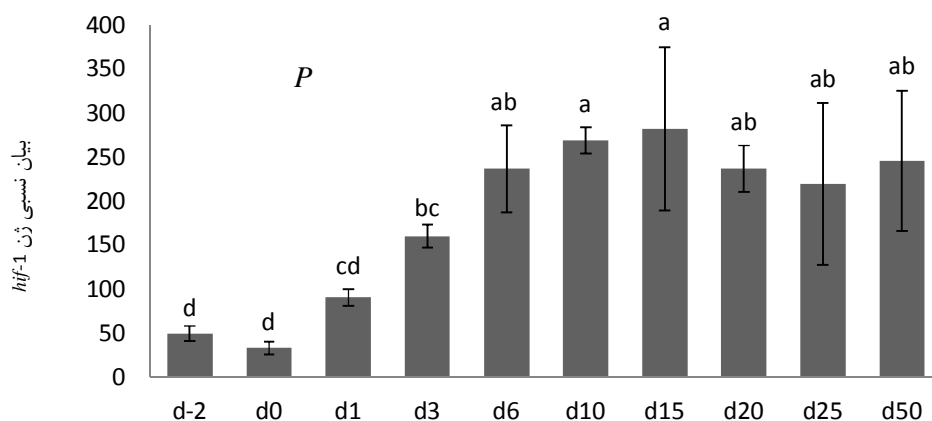
انجام Real-time PCR (qRT-PCR)

واکنش qPCR با استفاده از دستگاه 7900 HT Fast Real-Time PCR system (Applied Biosystems) و با استفاده از کیت سایبر گرین (Fermentase) و بر اساس دستورالعمل استاندارد: در مرحله اول، واکنش qPCR به مدت ۱۰ دقیقه در دمای 95°C و با 40 چرخه در این دما در 30 ثانیه انجام شده است. در مرحله بعد، دما به 65°C در مدت 20 ثانیه کاهش یافت و پس از آن 40 ثانیه در دمای 74°C و در مرحله آخر به مدت هفت دقیقه در این دما نگه داشته شد. تمامی واکنش ها در سه تکرار آزمایشگاهی انجام پذیرفت. برای انجام Real Time پلیت های 384 خانه ای استفاده شد که تمامی مراحل زمانی ذکر شده ارزیابی گردید. میزان بیان ژن در دستگاه به صورت Ct ثبت می شود. منحنی استاندارد با استفاده از نسبت های مختلف رقیق سازی cDNA (سری های رقیق سازی از 1 به 10 تا 10000) رسم شد. بازدهی PCR از فرمول $E\% = (10^{1/\text{slope}} - 1) \times 100$ محاسبه شد (Radonic et al., 2004). تغییرات نسبی بیان ژن

نتایج

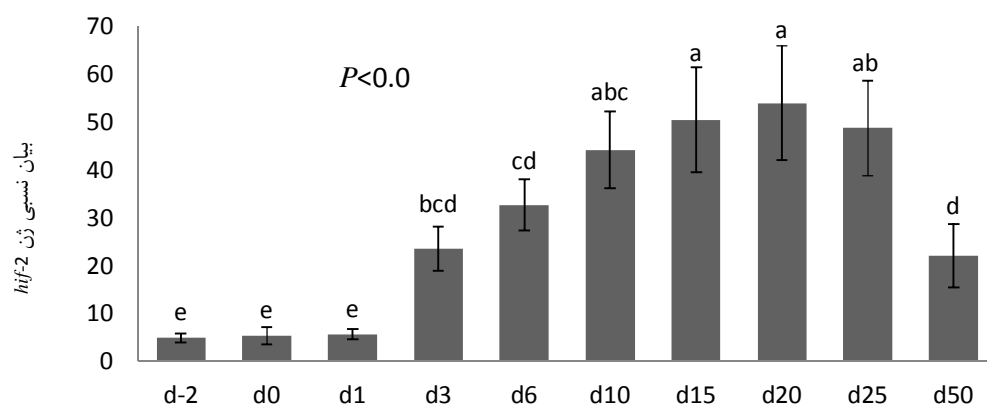
در مطالعه حاضر، بیان نسبی ژن‌های *hif-1* و *hif-2* در شرایط طبیعی اکسیژنی بررسی و ارزیابی شد و نتایج به دست آمده با استفاده از ژن RPL6، به عنوان ژن مرجع، عادی سازی شدند. نتایج نشان می دهد بیان ژن‌های مذکور در مراحل مختلف تکاملی لارو ماهی قره برون به لحاظ آماری اختلاف معناداری دارند ($p < 0.05$). بیان ژن *hif-1* در نقاط زمانی تکاملی لارو ماهی قره برون یک الگوی

افزایشی را پس از تفریخ شدن نشان داد و سپس در مرحله ۱۰ روز پس از تفریخ شدن سطح بیان این ژن، به نسبت تا آخر دوره تقریباً ثابت ماند (شکل ۱). نتایج بررسی الگوی بیان ژن *hif-2* در مراحل تکاملی لاروی ماهی قره برون روند افزایشی این ژن را تا مرحله ۲۰ روز پس از هچ شدن نشان داد و سپس در مرحله ۲۵ روز پس از تفریخ، کاهش معناداری در سطح بیان این ژن مشاهده شد (شکل ۲).



نقاط زمانی نمونه برداری در روند تکاملی لارو ماهی قره برون (روز)

شکل ۱ بیان نسبی ژن *hif-1* در مراحل تکاملی دوران لاروی ماهی قره برون.



نقاط زمانی نمونه برداری در روند تکاملی لارو ماهی قره برون (روز)

شکل ۲ بیان نسبی ژن *hif-2* در مراحل تکاملی دوران لاروی ماهی قره برون.

شکل ۱ و ۲: بیان نسبی سطوح mRNA عادی شده *hif-1* (شکل ۱) و *hif-2* (شکل ۲) با استفاده از RPL6 طی مراحل اولیه تکامل لاروی ماهی قره برون. ۲-d: ۲ روز پیش از هچ؛ d0: تخم تازه هچ شده (روز صفر)؛ d۱: ۱ روز پس از هچ (۱dph)؛ d۳: ۳dph؛ d۶: ۶dph؛ d۱۰: ۱۰dph؛ d۱۵: ۱۵dph؛ d۲۰: ۲۰dph؛ d۲۵: ۲۵dph؛ d۵۰: ۵۰dph داده ها بیان کننده میانگین $\pm$ انحراف استاندارد هستند (n=۶). اختلاف معنادار آماری بین داده های تفکیکی عادی شده بین دو گروه با استفاده از ANOVA و آزمون چند مقایسه ای توکی تحلیل شدند. حروف متفاوت در ستون های نمودار بیانگر وجود اختلاف معنادار در سطح ۵ درصد است.

بحث

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که در مراحل مختلف تکاملی لاروی ماهی قره برون (*A. persicus*) بیان ژن های *hif-1* و *hif-2* از نظر آماری اختلاف معناداری دارند و رابطه مستقیمی بین بیان این ژن ها با مراحل تکامل لاروی مشاهده شد. از جمله مطالعات صورت گرفته درباره بیان ژن های *hifs* می توان به رابطه بیان ژن های هایپوکسی در دوره تکامل لاروی و نیز تأثیر آن در بیان ژن *IGFBP-1* در بسیاری از گونه های مهره داران از ماهی تا انسان اشاره کرد (Guillemin and Krasnow, 1997; Huang et al., 2004; Seta and Millhorn, 2004). آزمایش های صورت گرفته بر روی لارو ماهی زبرا (*Danio rerio*) نشان داد که بیان ژن های *hif-1* و *hif-2* به طور مؤثر یروی بیان ژن *IGFBP-1* تأثیر می گذارد؛ بدین صورت که تحت شرایط حاد اکسیژنی (هایپوکسی) فعالیت پروتئین های *hifs* شدت گرفته و باعث افزایش بیان ژن *IGFBP-1* می شود. اکسیژن موجود در محیط برای تولید انرژی به منظور انجام

فعالیت ها برای اکثر متازوآها بسیار مهم است و تنظیم بیان ژن ها با عوامل رونویسی نقش مهمی را در تکامل دوره لاروی بازی می کند. الگوی بیان ژن های *hif-1* و *hif-2* به طور معناداری پس از تفریح افزایش یافته و این افزایش تا مراحل نهایی دوره لاروی در سطح به نسبت ثابتی باقی مانده که این افزایش بیان ژن های مذکور رابطه مستقیمی با ارگانوژنز مراحل ابتدایی لاروی در ماهی ها دارد. این موضوع که آیا هر سه نوع زیر واحد آلفا در پروتئین های *hif* به شرایط اکسیژنی حساسیت متفاوتی نشان می دهند، هنوز به درستی بررسی نشده است (Nikinmaa and Rees, 2005). در شرایط طبیعی اکسیژنی، بیان پروتئین *hif* به صورت غیرفعال بوده و به سرعت در مسیر تخریب پروتئازومی قرار می گیرد. تحت شرایط هایپوکسیا، *hif-1a* در سلول تجمع می یابد، سپس به همراه ARNT^۱ ها به سمت هسته منتقل می شود و با *hif-1b* دایمر می شوند. این دایمرها سپس با عوامل مسئول هایپوکسیا (HREs^۲) در نواحی تنظیمی ژن های هدف باند می شوند و باندهای رونویسی با عملکرد هم زمان، منجر به بیان ژن های هدف می شوند (Bracken et al., 2003). همچنین در شرایط استرس اکسیژنی میزان پروتئین *HSP*^۳ برای مقابله با شرایط حاد اکسیژنی افزایش می یابد و در نهایت با پروتئین *hif* باند می شود و باعث پایداری اثر این پروتئین در شرایط استرس می شود (Katschinski et al., 2004). مطالعات متعددی رابطه بین بیان ژن هایپوکسی و تکامل عروق و مجاری و در نهایت بقا در دوره لاروی را نشان می دهد (Blancher et al., 2000; Bonventre et al., 2011). *Hif-1a* یکی از اجزای عوامل رونویسی bHLH-PAS^۴ است که بیان ژن های القای عوامل محیطی و کنترل تکاملی را تنظیم

1. aryl hydrocarbon nuclear trans locator
2. hypoxia response elements
3. heat shock protein
4. basic-helix-loop-helix-PAS

می‌کند (Crews and Fan, 1999; Gu et al., 2000). *Hif-1* یکی از تنظیم‌کننده‌های کلیدی برای تکامل مجاری و عروق خونی است و برای تکامل لاروی شامل آنژیوژنز، تشکیل سلول‌های خونی و تکامل طبیعی در جنین پستانداران مورد نیاز است (Ryan et al., 1998). بدین صورت افزایش بیان ژن‌های مذکور در دوره لاروی تکامل ماهی قره‌برون را می‌توان مربوط به نقش آن‌ها در توسعه اندام‌ها و تکامل مجاری و رگ‌زایی و عروق خونی در دوره جنینی دانست. بررسی‌ها بر روی ماهی زبرا بیان می‌کند که تنظیم *hif-1* در ارتباط با سطح غلظت اکسیژن محیط خیلی زود و در مراحل ابتدایی زندگی (دوران لاروی) پایه‌گذاری می‌شود (Kajimura et al., 2006). مطالعات روی موش به‌عنوان الگو نیز نشان داد که ژن‌های *hifs* برای تکامل طبیعی جنینی پستانداران ضروری است و نقش کلیدی در هموستازی اکسیژن دارد (Adelman et al., 1999; Iyer et al., 1998; Maltepe et al., 1997). مشکلات قلبی عروقی در جنین پستانداران هنگامی که عملکرد رونویسی عوامل القای هایپوکسی (*hif-1α*) یا ژن هدف مختل شده، مشاهده شده است (Ryan et al., 1998; Carmeliet et al., 1996; Maltepe et al., 1997). به‌طور ویژه *hif-1α* یک تنظیم‌کننده مهم برای پاسخ در برابر شرایط هایپوکسی شامل تکامل رگ‌های خونی و گلبول‌های قرمز است (Semenza 2004; Nikinmaa and Rees, 2005; Wenger et al., 2005) و برای تکامل طبیعی بدن شامل آنژیوژنز، تکامل سلول‌های خونی و تکامل عصبی ضروری است (Ryan et al., 1998). عوامل القای هایپوکسی در مهره‌داران در چندین فرایند تکاملی مانند آنژیوژنز، تکامل مجاری خونی، قلب و سیستم عصبی مرکزی شرکت دارند (Ryan et al., 1998; Sipe et al., 2007). در مطالعاتی بر روی ۹ گونه

از خانواده آزادماهیان (Salmonidae) بیان شد که افزایش رونویسی هموگلوبول‌های خون (HBA, HBB) لاروهای دارای کیسه زرده در ارتباط تنگاتنگ با افزایش رونویسی ژن‌های *hif-1* و *hif-2* است (Vuori et al., 2009). همچنین ماندگاری و افزایش و یا کاهش مشاهده شده در بیان ژن‌های مذکور در نقاط زمانی مورد مطالعه می‌تواند ناشی از مکانیسم‌هایی باشد که در آن حضور اسیدآمین‌هایی مانند پرولین و آسپارژین و یا ممانعت کننده‌های پروتئازومی نقش دارند (Soitamo et al., 2001). مطالعات بیش‌تری روی فرایندهای تنظیم اکسیژن به‌خصوص مکانیسم‌های احتمالی مرتبط با بیان ژن‌های *hifs* در شرایط حاد اکسیژنی نیاز است. برای مثال نقش کاتکولامین‌ها در پاسخ‌های هایپوکسی در ماهی به‌طور گسترده مطالعه شده است. کاتکولامین‌ها عمل تهویه را تنظیم می‌کنند و همین‌طور میزان pH سلول‌های قرمز خون و مقدار هماتوکریت را تحت تأثیر خود قرار می‌دهند و در انجام گلیکوژنوژنز در شرایط کمبود اکسیژنی نقش مهمی را ایفا می‌کنند. همچنین بیان شده است که بین رونویسی ژن‌های *hifs* با آدنوزین مونوفوسفات حلقوی ارتباط وجود دارد و نیز بیان پذیرنده‌های آدرنالینی به‌عنوان تنظیم‌کننده *hifs* در پستانداران مطرح شده‌اند (Michelotti et al., 2003)، بنابراین جای تعجب ندارد که چنین مکانیسمی در پاسخ‌های کمبود اکسیژنی در ماهیان یافت شود.

در نهایت، بر اساس مطالعات صورت گرفته مشخص شده است که ژن‌های *hif-1* و *hif-2* که تنظیم هموستازی اکسیژن را بر عهده دارند، نقش مؤثر و کلیدی بر رشد و نمو در دوره جنینی پستانداران و ماهیان استخوانی دارند. همچنین بر اساس نتایج این مطالعه می‌توان بیان داشت که ژن‌های *hifs* در ماهیان غضروفی - استخوانی که جزو ماهیانی قدیمی هستند، نیز عملکردی می‌باشند. به همین

environmental and developmental signals. *Annual Reviews of Pharmacology and Toxicology*, 40: 519-561.

Gu, Y. Z., Moran, S. M., Hogenesch, J. B., Wartman, L., and Bradfield, C. A. 1998. Molecular characterization and chromosomal localization of a third- class hypoxia inducible factor subunit, HIF3, *Gene Expression*, 7: 205-213.

Guillemin, K., and Krasnow, M. A. 1997. The hypoxic response: huffing and HIFing. *Cell*, 89: 9-12.

Huang, S. T., Vo, K. C., Lyell, D. J., Faessen, G. H., Tulac, S., Tibshirani, R., Giaccia, A. J., and L. Giudice, C. 2004. Developmental response to hypoxia. *FASEB Journal* (Federation of American Societies for Experimental Biology). 18: 1348-1365.

Ivan, M., Kondo, K., Yang, H., Kim, W., Valiando, J., Ohh, M., Salic, A., Asara, J. M., Lane, W. S., and Kaelin, W. G., Jr. 2001. HIF-targeted for VHL mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing. *Science*, 292: 464-468.

Iyer, N. V., Kotch, L. E., Agani, F., Leung, S. W., Laughner, E., Wenger, R. H., Gassmann, M., J. Gearhart, D., Lawler, A. M., Yu, A. Y., and Semenza, G. L. 1998. Cellular and developmental control of O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 alpha. *Genes and Development*, 12: 149-162.

Jaakkola, P., Mole, D. R., Tian, Y. M., Wilson, M. I., Gielbert, J., Gaskell, S. J., Kriegsheim, A., Hebestreit, H. F., Mukherji, M., Schofield, C. J., Maxwell, P. H., Pugh, C. W., and Ratcliffe, P. J. 2001. Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. *Science*, 292: 468-472.

Kajimura, S., Aida, K. and Duan, C. 2006. Understanding Hypoxia-Induced Gene Expression in Early Development: In Vitro and In Vivo Analysis of Hypoxia-Inducible Factor 1-Regulated Zebra Fish Insulin-Like Growth Factor Binding Protein 1 Gene Expression. *Molecular and Cellular Biology*, 26 (3): 1142-1155.

Katschinski, D. M., Le, L., Schindler, S. G., Thomas, T., Voss, A. K. and Wenger, R. H. 2004. Interaction of the PAS B domain with HSP90 accelerates hypoxia-inducible factor-1 stabilization. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 14: 351-360.

Kolangi, M. H., Farahmand, H., Akbarzadeh, A., Ramezanzpour, S., Kaiya, H., Miyazato, M.,

دلیل می‌توان ذکر نمود ژن‌های *hifs* جزو ژن‌هایی هستند که از لحاظ عملکرد در طول تکامل فعالیت خود را حفظ نموده اند.

منابع

Adelman, D. M., Maltepe, E. and M. Simon, C. 1999. Multilineage embryonic hematopoiesis requires hypoxic ARNT activity. *Genes and Development*, 13: 2478-2483.

Akbarzadeh, A., Farahmand, H., Mahjoubi, F., Nematollahi, M. A., Leskinen, P., Ryttonen, K. and Nikinmaa, M. 2011. The transcription of L-gulonono-gamma-lactone oxidase, a key enzyme for biosynthesis of ascorbic acid, during development of Persian sturgeon *Acipenser persicus*. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part B*, 158: 282-288.

Bell, E. L., Klimova, T. A., Eisenbart, J., Schumacker, P. T. and Chandel, N. S. 2007. Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia inducible factor-dependent extension of the replicative life span during hypoxia. *Molecular and Cellular Biology*, 27(16): 5737-5745.

Blancher, C., Moore, J. W., Talks, K. L., Houlbrook, S. and Harris, A. L. 2000. Relationship of Hypoxia-inducible Factor *hif-1a* and *hif-2a* Expression to Vascular Endothelial Growth Factor Induction and Hypoxia Survival in Human Breast Cancer Cell Lines. *Cancer research*, 60: 7106-7113.

Bonventre, J. A., White, L. A. and Cooper, K. R. 2011. Methyl tert butyl ether targets developing vasculature in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Aquatic Toxicology*, 105: 29-40.

Carmeliet, P., Ferreira, V., Breier, G., Pollefeyt, S., Kieckens, L., Gertsenstein, M., Fahrig, M., Vandenhoek, A., Harpal, K., Eberhardt, C., Declercq, C., Pawling, J., Moons, L., Collen, D., Risau, W. and Nagy, A. 1996. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature*, 380: 435-439.

Crews, S. T., and Fan, C. M. 1999. Remembrance of things PAS: regulation of development by bHLH-PAS proteins. *Current Opinions in Genetics and Development*, 9: 580-587.

Gu, Y. Z., Hogenesch, J. B. and Bradfield, C. A. 2000. The PAS superfamily: sensors of

- PCR. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 313: 856-862.
- Rojas, D. A., Perez-Munizaga, D. A., Centanin, L., Antonelli, M., Wappner, P., Allende, M. L. and Reyes, A. E. 2007.** Cloning of hif-1 α and hif-2 α and mRNA expression pattern during development in zebrafish. *Gene Expression Patterns*, 7: 339-345.
- Ryan, H. E., Lo, J. and Johnson, R. S. 1998.** hif-1 α is required for solid tumor formation and embryonic vascularization. *EMBO Journal*, 17: 3005-3015.
- Seta, K. A. and Millhorn, D. E. 2004.** Functional genomics approach to hypoxia signaling. *Journal of Applied Physiology*, 96: 765-773.
- Semenza, G. L. 2004.** Hydroxylation of HIF-1: oxygen sensing at the molecular level. *Physiology* (Bethesda, Maryland), 19: 176-182.
- Sipe, C. W., Gruber, E. J. and Saha, M. S. 2004.** Short upstream region drives dynamic expression of hypoxia-inducible factor 1 α during *Xenopus* development. *Developmental Dynamics*, 230: 229-238.
- Soitamo, A. J., Rabergh, C. M. I., Gassmann, M., Sistonen, L. and Nikinmaa, M. 2001.** Characterization of a hypoxia-inducible factor (HIF-1 α) from rainbow trout. Accumulation of protein occurs at normal venous oxygen tension. *Journal of Biology Chemistry*, 276: 19699-19705.
- Vuori, K. A., Paavilainen, T. and Nikinmaa, M. 2009.** Molecular Markers of Yolk Sac Fry Development in Nine Families of Lake Trout. *Journal of Aquatic Animal Health*, 21: 279-289.
- Wenger, R. H., Stiehl, D. P. and Camenisch, G. 2005.** Integration of oxygen signaling at the consensus HRE. *Science STKE*. 2005 (306), 12.
- Wiesener, M. S., Turley, H., Allen, W.E., Willam, C., Eckardt, K.U., Talks, K.L., Wood, S.M., Gatter, K.C., Harris, A.L., Pugh, C.W., Ratcliffe, P.J. and Maxwell, P.H. 1998.** Induction of endothelial PAS domain protein-1 by hypoxia: Characterization and comparison with hypoxia-inducible factor-1. *Blood Journal*, 92: 2260-2268.
- Rytkönen, K. T. and Nikinmaa, M. 2013.** Developmental transcription of genes putatively associated with growth in two sturgeon species of different growth rate, *General and Comparative Endocrinology*, 182: 41-47.
- Livak, K. J. and Schmittgen, T. D. 2001.** Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{- $\Delta\Delta C_T$} method. *Methods*, 25: 402-408.
- Maltepe, E., Schmidt, J. V., Baunoch, D., Bradfield, C. A., and Simon, M. C. 1997.** Abnormal angiogenesis and responses to glucose and oxygen deprivation in mice lacking the protein ARNT. *Nature*, 386: 403-407.
- Masson, N., Willam, C., Maxwell, P. H., Pugh, C. W., and Ratcliffe, P. J. 2001.** Independent function of two destruction domains in hypoxia-inducible factor- α chains activated by prolyl hydroxylation. *EMBO Journal*, 20: 5197-5206.
- Maxwell, P. H., Wiesener, M. S., Chang, G. W., Clifford, S. C., Vaux, E. C., Cockman, M. E., Wykoff, C. C., Pugh, C. W., Maher, E. R. and Ratcliffe, P. J. 1999.** The tumor suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature*, 399: 271-275.
- Michelotti, G. A., Bauman, M. J., Smith, M. P. and Schwinn, D. A. 2003.** Cloning and characterization of the rat α_1 -adrenergic receptor gene promoter demonstration of cell specificity and regulation by hypoxia. *Journal of Biological Chemistry*, 278: 8693-8705.
- Nikinmaa, M. and Rees, B. B. 2005.** Oxygen-dependent gene expression in fishes. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 288: 1079-1090.
- Ohh, M., Park, C. W., Ivan, M., Hoffman, M. A., Kim, T. Y., Huang, L. E., Pavletich, N., Chau, V., and Kaelin, W. G. 2000.** Ubiquitination of hypoxia-inducible factor requires direct binding to the beta-domain of the von Hippel-Lindau protein. *Nature Cell Biology*, 2: 423-427.
- Radonic, A., Thulke, S., Mackay, I. M., Landt, O., Siegert, W. and Nitsche, A. 2004.** Guideline to reference gene selection for quantitative real-time

Fluctuations in Gene Expression of Hypoxia-Inducible Factors (*hif-1*, *hif-2*) During Ontogeny of Persian Sturgeon (*Acipenser persicus* Borodin, 1897)

Hamed Kolangi Miandare^{1*}, Omid Jaafari¹ and Maryam Nasrolah Pourmoghadam³

1-Assistant Professor, Department of Fisheries, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agriculture Science and Natural Resources, Gorgan

2-M.Sc. student, Department of Fisheries, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan

3- M.Sc. student, Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj

Received: 2013/6/26

Accepted: 2014/1/28

*Corresponding author: hkolangi@gau.ac.ir

Abstract:

Oxygen concentration the environment and cellular organisms is one of the effective factors during normal development of organisms. In the present study, the transcription levels of the hypoxia-inducible factors (*hif-1*, *hif-2*) were evaluated during development of an ancient fish species *Acipenser persicus*, in the normal oxygen density of environment. The transcription of *hif-1*, *hif-2* detected in all developmental time-points defined, from embryo to juvenile stages. Target genes transcriptions were normalized using *RPL6* as reference gene. Changes in normalized *hif-1*, *hif-2* mRNA expression were statistically significant throughout developmental points ($p < 0.05$). Our data revealed that the mRNA expression of *hifs* were low during embryonic development and then upregulated significantly at hatching and early larval time-points. Then, in the late larval development and juvenile stage the expression of *hifs* started to decline. The comparison between *hif-1* and *hif-2* mRNA transcription showed that maximum gene expressions of *hif-1* and *hif-2* occurred in 15 and 20 days after hatching, respectively. The increased expression of *hifs* suggests their association with two important events in the larval evolution, viz. internal feeding (yolk absorption) and external feeding. Also, the observed increase in mRNA expression of *hifs* during larval development of *A. persicus* can be attributed to increase in oxygen demand.

Keywords: *Acipenser persicus*, Larval Development, mRNA Expression, Organogenesis