

## 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<sup>۱\*</sup>، امید جعفری<sup>۲</sup>، مریم نصراله پورمقدم<sup>۳</sup>

- 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](mailto: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 تفریح تخم‌ها پایین بوده ولی به محض تفریح، 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  $hif-2$  به ترتیب ۱۵ و ۲۰ روز پس از تفریح 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

ماریپیچ ساختار پروتئینی با دو زیرواحد دیگر تفاوت داشته و نگاه غالبی که درباره آن وجود دارد، این است که *hif-3 $\alpha$*  به عنوان یک ممانعت کننده در هنگام فعالیت دو زیرواحد دیگر عمل می کند، ولی مطالعات نشان داد که این ژن نیز تحت شرایط حاد اکسیژنی نیز بیان می شود و نقش مکملی دارد (Ivan et al., 2001). در شرایط طبیعی اکسیژنی، پروتئین *hif* بیان نشده و به صورت غیرفعال بوده و به سرعت در مسیر تخریب پروتئازومی قرار می گیرد. ولی در شرایط حاد اکسیژنی عوامل القای کمبود اکسیژنی در سلول تجمع یافته و در نهایت با تشکیل باند بین *hif-1 $\alpha$*  و *hif-2 $\beta$*  بیان پروتئین های *hifs* صورت می گیرد (Maxwell et al., 1999; Ohh et al., 2000; Ivan et al., 2001; Jaakkola et al., 2001; Masson et al., 2001). همچنین عوامل القای هایپوکسیا به عنوان معبری برای افزایش بیان ژن *IGFBP-1<sup>3</sup>* 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 می رسد هایپوکسی موضعی هنگام ساخت اندامها و به عنوان یک سیگنال برای تحریک تشکیل عروق خونی ضروری است و *hif-1 $\alpha$*  نقش تنظیمی در رشد و عملکرد فیزیولوژیکی دستگاه های حیاتی مانند قلب و آبشش را بر عهده دارد. *hif-1 $\beta$*  به عنوان ARNT نیز شناخته شده است و با وجود اکسیژن به صورت 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

نقش اکسیژن در تکامل، فیزیولوژی و آسیب شناسی 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 ژن هایی می شود که باعث افزایش دریافت اکسیژن از محیط و متابولسیم بی هوازی و توقف رشد در تمام موجودات از بی مهرگان تا پستانداران می شود و در اکثر مواقع عوامل القای هایپوکسیا<sup>۱</sup> (*hif-1*، *hif-2*) مسئول بیان این ژن ها هستند (Kajimura et al., 2006). شرایط کمبود اکسیژنی موجب تحریک استرس اکسایشی و تسهیل پایدارسازی *hif-1 $\alpha$*  در شرایط استرس اکسیژنی می شود (Bell et al., 2007). عوامل القایی هایپوکسی (*hifs*) از دو زیر واحد  $\alpha$  و  $\beta$  تشکیل شده است. اشکال فرم های نوع آلفا شامل *hif-1 $\alpha$* ، *hif-2 $\alpha$*  و *hif-3 $\alpha$*  بوده و نوع بتا در واقع همانی هستند که پیش تر با عنوان ARNT<sup>۲</sup> خوانده می شدند (Gu et al., 1998; Wiesener et al., 1998). شکل بتا علاوه بر نقشی که در سیگنال دهی در شرایط کمبود اکسیژنی دارد، باعث بیان ژن در سلول ها به واسطه قرارگیری در معرض دیوکسین ها و دیگر آلوده کننده های هیدروکربنی می شود. *hif-1 $\beta$*  در همه جا یافت می شود اما *hif-1 $\alpha$*  در شرایط نورموکسیک به میزان خیلی کم وجود دارد. به طور ویژه *hif-1 $\alpha$*  یک تنظیم کننده مهم برای پاسخ در برابر شرایط هایپوکسی شامل تکامل رگ های خونی و گلبول های قرمز است (Semenza, 2004; Nikinmaa and Rees, 2005; Wenger et al., 2005). *hif-2 $\beta$*  به عنوان ارتقادهنده فعالیت پروتئین هایی مانند VEGF، COL10A1 و MMP13 در نظر گرفته می شود. زیرواحد *hif-3 $\alpha$*  براساس زنجیره

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 این رو، 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  $18^{\circ}\text{C}$  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  $80^{\circ}\text{C}$  - تا زمان استخراج RNA نگهداری شدند.

#### استخراج RNA و سنتز cDNA

روش استخراج RNA، کنترل کیفیت و کمیّت 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., ) (Cincinnati, OH, USA) Tri Reagent 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) I 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, 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

بنابراین پیشنهاد می‌گردد که در مطالعات بیان ژن در ماهیان خاویاری از ژن رفرنس RPL6 به دلیل متفاوت نبودن نرخ بیان در بافت‌های متعدد و مراحل مختلف استفاده شود.

مطالعه کلنگی و همکاران (۲۰۱۳) به‌عنوان ژن مرجع در این پژوهش استفاده شد. همچنین از بین ژن‌های RPL6, EF, GAPDH, BetaActin, RPL13, 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
RPL6 F:	GTGGTCAAACCTCCGCAAGA
RPL6 R:	GCCAGTAAGGAGGATGAGGA

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

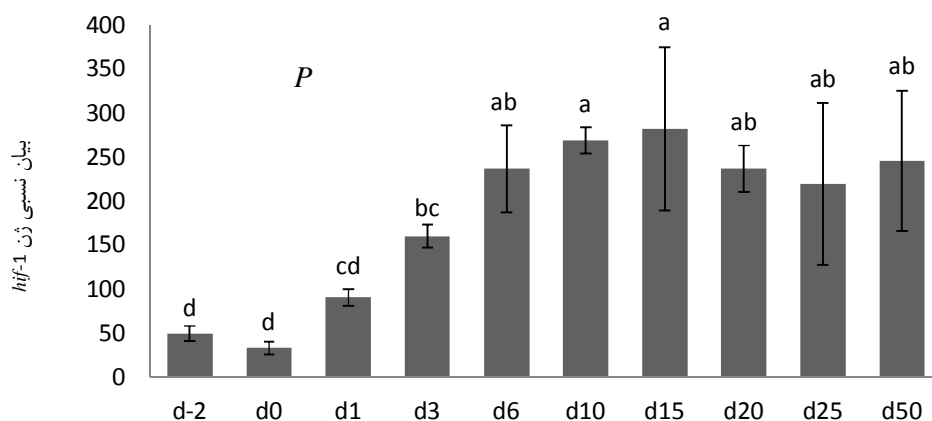
#### انجام Real-time PCR (qRT-PCR)

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  $95^{\circ}\text{C}$  و با  $40$  چرخه در این دما در  $30$  ثانیه انجام شده است. در مرحله بعد، دما به  $65^{\circ}\text{C}$  در مدت  $20$  ثانیه کاهش یافت و پس از آن  $40$  ثانیه در دمای  $74^{\circ}\text{C}$  و در مرحله آخر به مدت هفت دقیقه در این دما نگه داشته شد. تمامی واکنش‌ها در سه تکرار آزمایشگاهی انجام پذیرفت. برای انجام Real Time پلیت‌های  $384$  خانه‌ای استفاده شد که تمامی مراحل زمانی ذکر شده ارزیابی گردید. میزان بیان ژن در دستگاه به صورت  $Ct$  ثبت می‌شود. منحنی استاندارد با استفاده از نسبت‌های مختلف رقیق‌سازی cDNA (سری‌های رقیق‌سازی 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

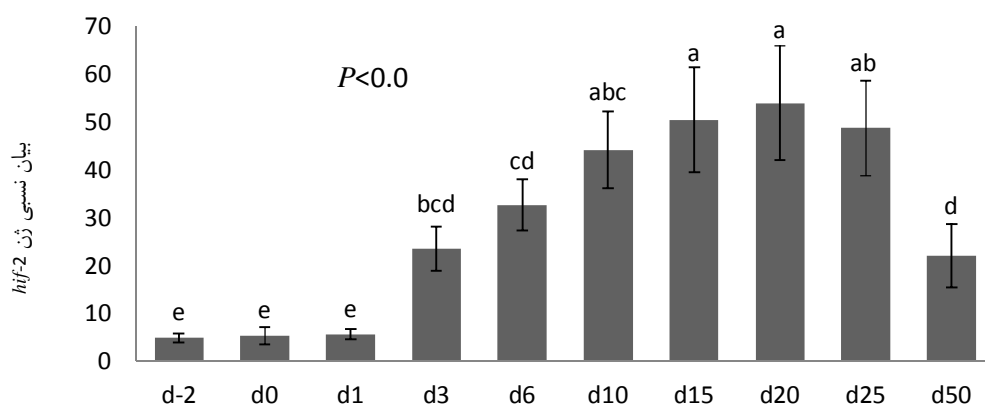
افزایشی را پس از تفریخ شدن نشان داد و سپس در مرحله ۱۰ روز پس از تفریخ شدن سطح بیان این ژن، به نسبت تا آخر دوره تقریباً ثابت ماند (شکل ۱). نتایج بررسی الگوی بیان ژن *hif-2* در مراحل تکاملی لاروی ماهی قره‌برون روند افزایشی این ژن را تا مرحله ۲۰ روز پس از هچ شدن نشان داد و سپس در مرحله ۲۵ روز پس از تفریخ،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

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 می‌دهد بیان ژن‌های مذکور در مراحل مختلف تکاملی لارو ماهی قره‌برون به لحاظ آماری اختلاف معناداری دارند ( $p < 0.05$ ). بیان ژن *hif-1* در نقاط زمانی تکاملی لارو ماهی قره‌برون یک الگوی



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

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



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

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

فعالیت‌ها برای اکثر متازوآها بسیار مهم است و تنظیم بیان ژن‌ها با عوامل رونویسی نقش مهمی را در تکامل دوره لاروی بازی می‌کند. الگوی بیان ژن‌های *hif-1* و *hif-2* به‌طور معناداری پس از تفریح افزایش یافته و این افزایش تا مراحل نهایی دوره لاروی در سطح به‌نسبت ثابتی باقی مانده که این افزایش بیان ژن‌های مذکور رابطه مستقیمی با ارگانوژنز مراحل ابتدایی لاروی در ماهی‌ها دارد. این موضوع که آیا هر سه نوع زیر واحد آلفا در پروتئین‌های *hif* به شرایط اکسیژنی حساسیت متفاوتی نشان می‌دهند، هنوز به‌درستی بررسی نشده است (Nikinmaa and Rees, 2005). در شرایط طبیعی اکسیژنی، بیان پروتئین *hif* به‌صورت غیرفعال بوده و به‌سرعت در مسیر تخریب پروتئازومی قرار می‌گیرد. تحت شرایط هایپوکسیا، *hif-1a* در سلول تجمع می‌یابد، سپس به همراه ARNT<sup>۱</sup> ها به سمت هسته منتقل می‌شود و با *hif-1β* دایمر می‌شوند. این دایمرها سپس با عوامل مسئول هایپوکسیا (HREs<sup>۲</sup>) در نواحی تنظیمی ژن‌های هدف باند می‌شوند و باندهای رونویسی با عملکرد هم‌زمان، منجر به بیان ژن‌های هدف می‌شوند (Bracken et al., 2003). همچنین در شرایط استرس اکسیژنی میزان پروتئین HSP<sup>۳</sup> برای مقابله با شرایط حاد اکسیژنی افزایش می‌یابد و در نهایت با پروتئین *hif* باند می‌شود و باعث پایداری اثر این پروتئین در شرایط استرس می‌شود (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 می‌دهد (Blancher et al., 2000; Bonventre et al., 2011). *Hif-1a* یکی از اجزای عوامل رونویسی bHLH-PAS<sup>۴</sup> است که بیان ژن‌های القای عوامل محیطی و کنترل تکاملی را تنظیم

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 قره‌برون. ۲-d: ۲ روز پیش از هج؛ d0: تخم تازه هج‌شده (روز صفر)؛ d۱: ۱ روز پس از هج (۱dph)؛ d۳: ۳dph؛ d۶: ۶dph؛ d۱۰: ۱۰dph؛ d۱۵: ۱۵dph؛ d۲۰: ۲۰dph؛ d۲۵: ۲۵dph؛ d۵۰: ۵۰dph داده‌ها بیان‌کننده میانگین  $\pm$  انحراف استاندارد هستند (n=۶). اختلاف معنادار آماری بین داده‌های تفکیکی عادی شده بین دو گروه با استفاده از ANOVA و آزمون چند مقایسه‌ای توکی تحلیل شدند. حروف متفاوت در ستون‌های نمودار بیانگر وجود اختلاف معنادار در سطح ۵ درصد است.

#### بحث

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که در مراحل مختلف تکاملی لاروی ماهی قره‌برون (*A. persicus*) بیان ژن‌های *hif-1* و *hif-2*، از نظر آماری اختلاف معناداری دارند و رابطه مستقیمی بین بیان این ژن‌ها با مراحل تکامل لاروی مشاهده شد. از جمله مطالعات صورت گرفته درباره بیان ژن‌های *hifs* می‌توان به رابطه بیان ژن‌های هایپوکسی در دوره تکامل لاروی و نیز تأثیر آن در بیان ژن *IGFBP-1* در بسیاری از گونه‌های مهره‌داران از ماهی تا انسان اشاره کرد (Guillemin and Krasnow, 1997; Huang et al., 2004; Seta and Millhorn, 2004). آزمایش‌های صورت گرفته بر روی لارو ماهی زبرا (*Danio rerio*) نشان داد که بیان ژن‌های *hif-1* و *hif-2* به‌طور مؤثر نیروی بیان ژن *IGFBP-1* تأثیر می‌گذارد؛ بدین صورت که تحت شرایط حاد اکسیژنی (هایپوکسی) فعالیت پروتئین‌های *hifs* شدت گرفته و باعث افزایش بیان ژن *IGFBP-1* می‌شود. اکسیژن موجود در محیط برای تولید انرژی به‌منظور انجام

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

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 گلیکوئئوژنز در شرایط کمبود اکسیژنی نقش مهمی را ایفا می‌کنند. همچنین بیان شده است که بین رونویسی ژن‌های *hifs* با آدنوزین مونوفسفات 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

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., 1997; Iyer et al., 1998; Maltepe et al., 1999). 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

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 O<sub>2</sub> 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 O<sub>2</sub> 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 O<sub>2</sub>-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., Ramezani, 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 نموده‌اند.

#### 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., Rytkonen, 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., Vandenhoock, 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 $\alpha$  and hif-2 $\alpha$  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 $\alpha$  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 $\alpha$  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 $\alpha$ ) 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- $\alpha$  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  $\alpha_b$ -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<sup>1\*</sup>, Omid Jaafari<sup>1</sup> and Maryam Nasrolah Pourmoghadam<sup>3</sup>

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