

طرح تحلیل تعدادی از mRNA های مادری مخصوص اووسیت در جنین تک سلولی موش

دکتر زهره علیزاده*، دکتر پریچهر پاسبخش**

دریافت: ۸۴/۸/۲۶، پذیرش: ۸۵/۵/۲

چکیده:

مقدمه و هدف: در طی مرحله رشد در اووژنز مقدار زیادی mRNA ساخته و در اووسیت ذخیره می شود سپس نسخه برداری در طی تقسیم میوز متوقف می گردد. توقف نسخه برداری در مراحل اولیه جنینی تا قبل از شروع فعالیت ژنوم جنین ادامه دارد. بنابراین، اولین وقایع سلولی در طی امبریونز در پستانداران و گونه های دیگر جانوری به RNAها و پروتئین های مادری ذخیره شده در اووسیت وابسته است. یکی از راه های کنترل ترجمه mRNA های مادری ذخیره شده، تحلیل آنهاست. هدف از این مطالعه بررسی روند تحلیل تعدادی از این mRNA ها است.

روش کار: این بررسی از نوع تجربی می باشد و در طی آن تعدادی از ژن های خاص اووسیت شامل H100، tPA، c-mos و Gdf9 انتخاب شده و میزان نسبی این نسخه ها در اووسیت (متافاز II) و جنین، ۳، ۶، ۹ و ۱۲ ساعت بعد از افزودن اسپرم و با استفاده از Real-time PCR اندازه گیری شد و با میزان Cyclin A2 mRNA و Hprt مورد مقایسه قرار گرفت. نتایج: نتایج مطالعه نشان می دهد که mRNA های خاص اووسیت دارای مقاومت کمی بوده و در جنین ۱۲ ساعته تحلیل رفته و از سیتوپلاسم سلول حذف می شوند در حالیکه Cyclin A2 و Hprt در سلول باقی می مانند. نتیجه نهایی: یافته های این مطالعه نشان دهنده مقاومت متفاوت گروه های مختلف mRNA ها در اووسیت و جنین است.

mRNA های مادری، جنین موش، تحلیل mRNA، تخمک

مقدمه:

سلول رخ نمی دهد و می تواند مقادیر زیادی mRNA را بدون اینکه ترجمه شود، در خود ذخیره کند (۲). اووسیت اولیه که در دوره جنینی و بعد از تقسیم اووگونی ها ایجاد می شود، اولین تقسیم میوز را شروع کرده و در مرحله پروفاز از میوز اول باقی می ماند. در زمان بلوغ، اووسیت اولیه ابتدا مرحله رشد و بدنبال آن مرحله بلوغ را آغاز می کند. در مرحله رشد و قبل از ورود به مرحله بلوغ مقدار زیادی mRNA و پروتئین ساخته و ذخیره می کند زیرا زمانی که مرحله دیپلوتن را پشت سر می گذارد و وارد مرحله بلوغ می شود ساخت RNA کاهش یافته و در نهایت متوقف می شود (۳، ۴). بنابراین

تنظیم بیان ژن از فرایندهای مهم کنترل حیات سلول است. از آنجایی که هیچ موجود زنده ای در یک زمان نیازمند به بیان تمام ژن های خود نمی باشد، طرق مختلفی برای کنترل تولید محصولات ژنی و فعالیت های ژنتیکی وجود دارد. یکی از راه های کنترل بیان ژن، کنترل آن بعد از مرحله نسخه برداری است (Posttranscriptional regulation) (۱).

سلول تخم مثال خوبی برای کنترل بیان ژن در سطح ترجمه می باشد، زیرا بسیاری از مکانیسم هایی که باعث تحلیل mRNA ها در سلول سوماتیک می شوند در این

* استادیار گروه علوم تشریحی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی همدان (alizadeh@umsha.ac.ir)

** دانشیار گروه علوم تشریحی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران

جمع آوری شدند با این تفاوت که سلول های کومولوس جدا نشدند. سپس (در محیط وایتن) اسپرم از موش نر نژاد ICR به آنها اضافه شد. دو ساعت بعد از افزودن اسپرم، جنین ها در محیط CZB شستشو داده شدند و در محیط CZB جدید که حاوی آلفا-آمانیتین (20 µg/ml) بود منتقل گردیدند و در شرایط ۳۷°C، ۵٪ CO₂ و ۹۵٪ هوا کشت داده شدند. نمونه های مورد نظر به ترتیب ۳، ۶، ۹ و ۱۲ ساعت بعد جمع آوری گردیدند.

Real-time PCR: میزان نسبی mRNA های مورد مطالعه بوسیله دستگاه (Cepheid Sunnyvale, real-time PCR (USA. And TaKaRa, Shiga, Japan) مورد مطالعه قرار گرفت. در اولین مرحله RNA از تعداد ۳۰ تخمک یا جنین با استفاده از کیت (Nippon Gene, ISOGEN Tokyo, Japan) استخراج شده و سپس نسخه برداری معکوس (Reverse transcription) با استفاده از پرایمر Oligo dT (0.5 µg/µl) و مخلوط dNTP (10 mM) انجام شد. مخلوط فوق برای مدت ۴ دقیقه در ۷۰°C حرارت داده شد. این مرحله با افزودن بافر، (0.1 M) DTT و Reverse-Script II (200 units) ادامه یافت. نمونه ها سپس با برنامه زیر انکوبه شدند: ۴۲°C به مدت ۵۰ دقیقه، ۵۱°C به مدت ۳۵ دقیقه، ۷۰°C به مدت ۱۵ دقیقه.

جهت ارزیابی کارایی استخراج RNA و مرحله نسخه برداری معکوس، از mRNA گلوبین خرگوش (500 pg) (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) به عنوان کنترل استفاده شد و قبل از استخراج RNA به نمونه ها اضافه گردید.

برای انجام PCR معادل دو تخمک یا جنین به عنوان الگو برای هر واکنش PCR مورد استفاده قرار گرفت. سپس مخلوط اصلی (Reaction mixture) با استفاده از مواد زیر ساخته شد: مخلوط dNTP (10mM)، محلول Ex Tag R-PCR (5 U/µl) (TaKaRa, Mg⁺ (250 mM) (Biowhittaker, SYBER®GREE I, Shiga, Japan) و پرایمر Molecular Applications, Rockland, USA) اختصاصی (۱۰ pmol/ml) (جدول ۱) شرایط PCR در ۳۲-۴۰ سیکل و به ترتیب زیر بود:

مرحله دناتوره شدن اولیه در ۹۵°C برای مدت ۳۰ ثانیه، مرحله آنیلین در مدت ۱۵ ثانیه (دمای آنیلین برای هر ژن در جدول ۱ آمده است)، مرحله گسترش در

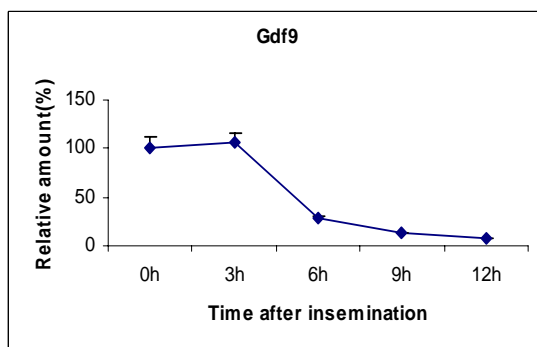
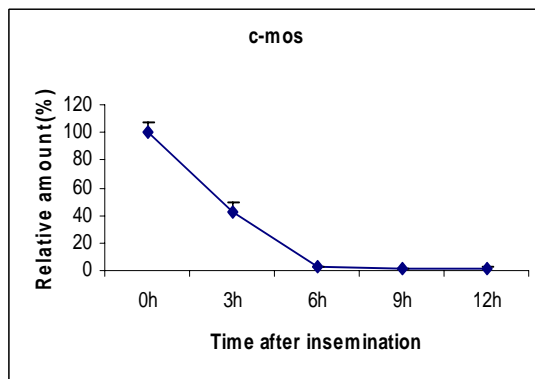
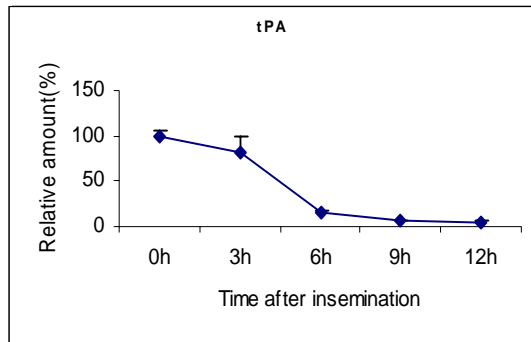
اووسیت در طی مرحله بلوغ از نظر نسخه برداری غیر فعال بوده و در حالت سکون به سر می برد. این وضعیت در مراحل اولیه جنینی و تا قبل از شروع فعالیت ژنوم جنین ادامه دارد (۵و۶). فعال شدن ژنوم جنینی (Zygotic genome activation-ZGA) بسته به گونه جاندار در مرحله ۲ تا ۱۶ سلولی آغاز می شود. در جنین موش این واقعه در مرحله دوسلولی رخ می دهد (۷).

mRNA های مادری را می توان بر اساس سنتز مجدد آنها بعد از ZGA به دو گروه تقسیم کرد. گروه اول نسخه هایی را شامل می شود که بین جنین و اووسیت مشترک بوده و بعد از ZGA مجددا ساخته می شوند. برای مثال بعد از لقاح mRNA اکتین به تدریج تحلیل می رود و مجددا بعد از فعال شدن ژنوم جنینی ساخته می شود. گروه دوم از mRNA های مادری مخصوص اووسیت بوده و بعد از ZGA ساخته نمی شود. مقاومت متفاوت این گونه از mRNA ها راهی جهت حذف نسخه هایی است که پروتئین حاصل از آنها برای سلول مضر است (۸). بنابراین باید مکانیسمی وجود داشته باشد که به طور انتخابی باعث حذف نسخه هایی شود که مورد نیاز جنین نمی باشد. از جمله این مکانیسم ها تحلیل زمان بندی شده تعدادی از mRNA ها می باشد که در دروزوفیلا (Drosophilla) و زنوپوس (Xenopus) گزارش شده است (۹،۱۰). اگر چه به نظر می رسد که تحلیل انتخابی و زمان بندی شده mRNA های مادری در پیشبرد رشد و نمو جنین مهم و ضروری می باشد، لیکن اطلاعات کمی در این زمینه در جنین پستانداران وجود دارد. در این مطالعه روند تحلیل ژن های tPA، c-mos، H100، Gdf9 که خاص اووسیت هستند (۱۱) در ساعات اولیه جنین مورد بررسی قرار می گیرد.

روش کار:

این مطالعه از نوع تجربی می باشد. تهیه و کشت تخمک و جنین موش: برای گرفتن تخمک (متافاز II) از موش نژاد BDF1 با سن سه هفته استفاده شد. برای این کار به موش های ماده ۵ IU PMSG (Pregnant mare's serum gonadotropin) و ۴۸ ساعت بعد ۵ IU hCG (human chorionic gonadotropin) به طریق داخل صفاقی تزریق شد. سپس تخمک ها در محیط وایتن (Whitten) (۱۲) جمع آوری گردیده و سلولهای کومولوس با استفاده از هیالورونیداز برداشته شد. برای بدست آوردن جنین، تخمک ها به طریق فوق

زمانی، میزان نسخه های Cyclin A2 و HPRT نیز اندازه گیری شد. همانطور که در نمودار ۱ مشخص است این نسخه ها بعد از لقاح به آهستگی تحلیل می روند و تنها حدود ۲۰٪ از آن ها از سلول حذف می شود.



۷۲° C برای مدت ۲۰ ثانیه. شدت و میزان فلورسنسی در طی هر سیکل اندازه گیری شد (۱۳). میزان نسبی هر نسخه با استفاده از یک منحنی استاندارد که بوسیله تکثیر سری هایی با ۱۰ برابر اختلاف غلظت از cDNA آماده شده بود، تعیین گردید.

جدول ۱: توالی پرایمرهای استفاده شده و شرایط PCR

پرایمر	توالی	درجه آنیلین/ذوب (°C)
H1oo sense	5'-GATGGAGAAAGGGCAGAAGA-3'	60/85
H1oo anti-sense	5'-ATTTGCTTCTTGCTGCTCC-3'	
Gdf9 sense	5'-TGAGATTGATGTGACCTCCC-3'	60/85
Gdf9 antisense	5'-AGTAGCTTCTTTCACGG-3'	
tPA sense	5'-TACCACGGAGTTCTGTAGCA-3'	59/85.5
tPA antisense	5'-GTGAGGTGATGTCTGTGTAG-3'	
c-mos sense	5'-CTCCGGAGATCCTGAAAGGA-3'	58/87
c-mos anti-sense	5'-CAGTGTCTTCCAGTCAGGG-3'	
Hprt sense	5'-AAACTTTGCTTTCCTGGTTA-3'	56/83
Hprt antisense	5'-AGGCTTTGTATTGGCTTTTC-3'	
cyclin A2 sense	5'-GAGGTGGGAGAAGAATATAA-3'	56.4/84
cyclin A2 anti-sense	5'-ACTAGGTGCTCCATTCTCAG-3'	
rabbit globin sense	5'-GCAGCCACGGTGCGAGTAT-3'	58/91
rabbit globin anti-sense	5'-GTGGGACAGGAGCTTGAAT-3'	

این آزمایش برای هر یک از نسخه ها سه بار تکرار شد و متوسط داده های بدست آمده برای ترسیم منحنی، مورد استفاده قرار گرفت.

قابل ذکر است برای مقایسه روند تحلیل ژنهای مورد مطالعه که همگی ژنهای خاص اووسیت (oocyte specific) هستند از دو ژن Cyclin A2 و Hprt (یک House keeping gene) استفاده شد.

نتایج:

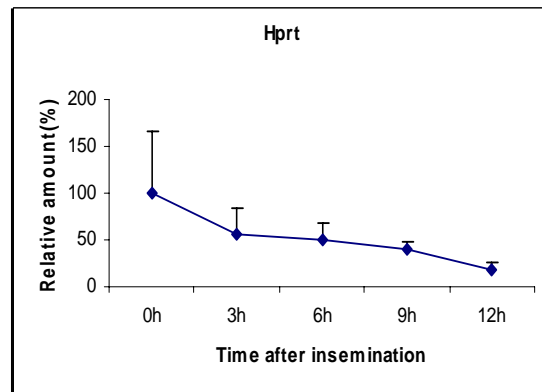
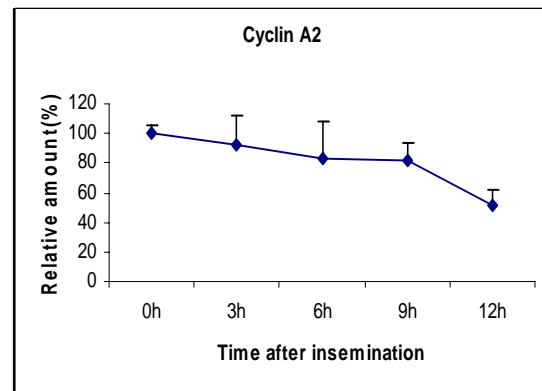
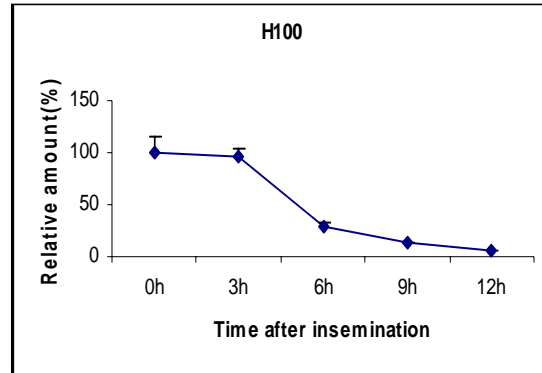
نمودار ۱ میزان نسبی نسخه های H1oo, Gdf9, c-mos و tpa را نشان می دهد. همانطور که در این شکل دیده می شود تحلیل این mRNA ها طرح مشابهی را نشان می دهد. بدین معنی که این گروه از mRNA های مادری به سرعت تحلیل رفته و در ۹-۱۲ ساعت بعد از لقاح به سطح غیر قابل تشخیصی می رسند. برای مقایسه روند تحلیل این گروه با نسخه های دیگر در این فاصله

می گیرد. در این فاصله زمانی برای فعال شدن ژنوم جنینی mRNA های مادری از جنین حذف میشوند، علاوه بر آن برنامه ریزی جدید (Reprogramming) برای طراحی بیان ژن های جدیدی که در اووسیت بیان نمی شوند، انجام می گردد (۱۴).

فعال شدن ژنوم جنینی با تحلیل کنترل شده mRNA های مادری همراه است. تخریب این نسخه ها مدت زمانی که این ژن ها می توانند عمل کنند را محدود می کند (۱۵). ثابت شده است که حذف mRNA های خاص در زمان مناسب برای نمو طبیعی جنین ضروری می باشد برای مثال در مورد دروزوفیلا گزارش شده است که حذف نسخه های twin و string که تولید Cdc phosphatase را کد می کنند، برای انجام تقسیم سلولی بعد از فعال شدن ژنوم جنینی ضروری است (۱۶). در زنبوس xlhbox2b mRNA در زمان تقسیم میوز تحلیل می رود در حالیکه بقیه نسخه های مادری در مرحله بلاستولا ناپدید می شوند (۱۷).

با توجه به اهمیت تحلیل زمان بندی شده mRNA های مادری در این مطالعه از ژن هایی استفاده شد که از مطالعه قبل بدست آمده و همگی خاص اووسیت (Oocyte specific) بوده و در تقسیم میوز و رشد و نمو اووسیت دخالت دارند و در مراحل بعدی رشد و نمو جنین مورد نیاز نیستند (۱۸). مطالعه روند تحلیل این گروه از mRNA ها نشان داد که همه آنها در ۹-۱۲ ساعت بعد از لقاح به حد غیر قابل تشخیص می رسد. در حد اطلاعات ما می توان گفت مطالعه ای که در این دوره زمانی تحلیل mRNA ها را در پستانداران بررسی کند، وجود ندارد. مطالعه پینتون و همکاران (۱۹) در مورد تعدادی از mRNA های مادری در اووسیت ژرمینال وزیکول، تخمک بالغ و مرحله دو سلولی انجام شده است. مطالعه بچوارووا نیز در اووسیت و جنین در اواخر مرحله تک سلولی و دو سلولی انجام شده است (۲۰). آنها در مطالعه خود از mRNA های مختلفی استفاده کردند و بیان کردند که در اواخر مرحله دوسلولی همه نسخه های مادری تحلیل می روند.

پینتون و همکاران به بررسی آدنیلایسیون و تحلیل mRNA α -Tubulin و actin و Hprt پرداختند و بیان کردند که هر یک از mRNA ها دارای الگوی خاص خود در آدنیلایسیون و تحلیل می باشند (۱۹). هنریسون و



نمودار ۱: روند تحلیل H100, Gdf9, c-mos, tPA, Hprt, Cyclin A2 mRNAs در تخم لقاح نیافته (oh) و جنین ۳، ۶، ۹ و ۱۲ ساعت بعد از افزودن اسپرم. میزان mRNA در تخم لقاح نیافته به طور قراردادی ۱۰۰ در نظر گرفته شده است.

بحث:

در بسیاری از موجودات، اولین وقایع سلولی در طی امبریونز به فاکتورهای مادری وابسته است و جنین نیازی به ساخت RNA ندارد. فاکتورهای مادری نیز در طی اووژنز در اووسیت ساخته و ذخیره شده است. بعد از مدتی که بسته به گونه جاندار دارد، ژنوم جنینی فعال شده و کنترل فعالیت های جنین که تا این زمان توسط مولکولهای به ارث رسیده از مادر هدایت می شد، به عهده

روند تحلیل mRNA های مورد مطالعه باشد.

نتیجه نهایی:

گروه های مختلف mRNA در جنین موش دارای مقاومت متفاوتی بوده و بسته به عمل کرد آن ها، هر یک در زمان خاصی تحلیل رفته و از سیتوپلاسم سلول حذف می شوند.

سپاسگزاری:

از آزمایشگاه Bioresource regulation دانشگاه توکیو که هزینه و امکانات لازم برای انجام این طرح را فراهم نمودند و همچنین از همکاری مدیر گروه محترم گروه علوم تشریحی تهران کمال تشکر و سپاس را داریم.

منابع:

1. Richter JD. Cytoplasmic polyadenylation in development and beyond. *Mol Biol Rev* 1999; 63:446-456
2. Gandolfi TALB, Gandolfi F. The molecular legacy to the embryo: Cytoplasmic components and their effects on early development. *Theriogenology* 2001; 55:1255-1276
3. Bashirullah A, Cooperstock RL, Lipshitz HD. Spatial and temporal control of RNA stability. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001; 19: 7025-8
4. Curtis D, Lehmann R, Zamore PD. Translational regulation in development. *Cell* 1995; 81:171-178
5. Audic Y, Garbrecht M, Fritz B, Sheetts MD. Zygotic control of maternal Cyclin A1 translation and mRNA stability. *Dev Dyn* 2002; 225:511-521
6. Schultz RM. Regulation of Zygotic gene activation in mouse. *Bioessay* 1993; 15: 531-538
7. Telford NA, Watson AJ, Schultz GA. Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development: A comparison of several species. *Mol Reprod Dev* 1990; 26:90-100
8. Zeng F, Schultz RM. Requirement for RNA-binding activity of MYS2 for cytoplasmic localization and retention in mouse oocytes. *Dev Biol* 2003; 255:249-262
9. Charlesworth A, Ridge JA, King AL, Macnicol MC, Macnicol A. A novel regulatory element determines the timing of mos mRNA translation during *Xenopus* oocyte maturation *EMBO*. 2002; 21:2798-2806
10. Bashirullah A, Hallsel SR, Cooperstock RL, Kloc M, Karaiskakis A, Fisher WW, et al. Joint action of two RNA degradation pathways controls the timing of maternal transcript elimination at the midblastula transition in *drosophila melanogaster*.

همکاران نیز معتقد بودند که mRNA های مادری در جنین موش به طور گروهی و در یک زمان تحلیل می روند (۲۱) که بر خلاف نتایج حاصل از این مطالعه می باشد زیرا نتایج مطالعه حاضر نشان می دهد که نسخه های خاص اووسیت روند مشابهی در تحلیل نشان می دهند در حالیکه نسخه های Hprt و Cyclin A2 به سرعت از سلول حذف نمی شوند.

تفاوت در سرعت تحلیل نسخه های Cyclin A2 و Hprt با mRNA های c-mos، H1oo، Gdf9 و tPA نشان می دهد که در پستانداران نیز مانند دوزیستان و دروزوفیلیا، مقاومت متفاوت mRNA های مختلف می تواند نقش اساسی در کنترل و تنظیم بیان ژن ها در مدتی که اووسیت و جنین از نظر نسخه برداری غیر فعال است، داشته باشد. تخریب این mRNA ها مدت زمانی که این نسخه ها فعال هستند را محدود می کند.

مطالعات مختلف نشان داده است که نسخه برداری در جنین موش در اواخر مرحله یک سلولی آغاز می شود، اگر چه ثابت شده است که در این مرحله نسخه های تولید شده به صورت فعال ترجمه نمی شوند (۲۲). در این مطالعه برای متوقف کردن احتمالی عمل نسخه برداری، جنین ها در محیط حاوی آلفا-آمانیتین کشت داده شدند. آلفا-آمانیتین مهار کننده RNA پلیمراز II است و نسخه برداری را مهار می کند. نشان داده شده است که در پستانداران بکار بردن آلفا-آمانیتین در جنین یک سلولی خرگوش موجب طولانی شدن زمان سنتز تعدادی از پروتئین ها می گردد که توسط mRNA های مادری کد می شوند. این امر می تواند به علت افزایش مقاومت این mRNA ها تحت تاثیر آلفا-آمانیتین باشد. اما چنین تاثیری در جنین موش گزارش نشده است (۲۳).

گزارش های مختلف نشان داده است که طول دم پلی (Poly A tail) A در بعضی از mRNA ها بعد از لقاح کاهش می یابد و میزان کارایی سنتز cDNA نیز در صورت استفاده از پرایمر dT در مرحله RT، بستگی به طول دم پلی A دارد (۲۴). در این مطالعه نیز از پرایمر dT در مرحله نسخه برداری معکوس استفاده شد اما در مطالعه قبل (۲۵) که در آن از پرایمر اختصاصی و dT در مرحله RT استفاده شد بود، نتایج مورد مقایسه قرار گرفت و کاهش سریع mRNA مورد نظر نشان داده شده بود. بنابراین استفاده از پرایمر dT می تواند نشان دهنده

- EMBO. 1999; 18(9):2610-2620
11. Alizadeh Z, Kageyama S, Aoki F. Degradation of maternal mRNA in mouse embryos: selective degradation of specific mRNA after fertilization. *Mol Reprod Dev* 2005; 72: 281-290
 12. Whitten WK. Nutrient requirement for culture of preimplantation embryos. *Adv Bio-Sci* 1971; 61:129-139
 13. Hara TK, Sakuma Y, Sakai AA. Dynamic changes in the expression of protein tyrosine phosphates during preimplantation mouse development: semi-quantification by real-time PCR. *J Reprod Dev* 2003; 49: 323-328
 14. Schultz RM. The regulation and reprogramming of gene expression in preimplantation embryo. *Adv Dev Biochem*. 1999; 5:127-162
 15. Gosden RG. Oogenesis as a foundation for embryogenesis. *Mol Cell Biol Endocrin* 2002; 186:149-153
 16. Edgar BA, Datar SA. Zygotic degradation of two maternal Cdc25 mRNA terminate drosophila's early cell cycle program. *Genes Dev* 1996; 10: 1966-77
 17. Brown BD, Zipkin ID, Haraland RM. Sequence-specific endonucleotic cleavage and protection of mRNA in *Xenopus* and *Drosophila*. *Genes Dev* 1993;7:1620-1631
 18. Dean J. Oocyte specific genes regulate follicle formation, fertility and early mouse development. *J Reprod Immun* 2002; 53: 171-180
 19. Paynton BV, Rempel R, Bachvarova R. Changes in state of adenylation and time course of degradation of maternal mRNAs during oocyte maturation and early embryonic development in mouse. *Dev Biol* 1988; 129:304-314
 20. Bachvarova R, Cohen EM, Delon V, Tuku-naga K, Sakiyama S, Paynton BV. Amounts and modulation of actin mRNA in mouse oocytes and embryos. *Dev Biol* 1989; 106: 561-565
 21. Henrion G, Brunet A, Renard JP, Duran-thon V. Identification of maternal transcripts that progressively disappear during the cleavage period of rabbit embryos. *Mol Reprod Dev* 1997; 47: 353-362
 22. Aoki F, Worrad D.M, Schultz RM, Regulation of transcriptional activity during the first and second cell cucle in preimplantation mouse embryo. *Dev Biol* 1997; 181: 296-307
 23. Richoux V, Renard JP, Bahinet C. Synthesis and developmental regulation of an egg specific protein translated from maternal mRNA. *Mol Reprod Dev* 1991; 28: 218-229
 24. Moore GD, Ayabe T, Kopf GS, Schultz RM. Temporal patterns of gene expression of G1-S cyclins and cdks during the first and second mitotic cell cycles in mouse embryos. *Mol Reprod Dev* 1996; 45:264-75
 25. Alizadeh Z, Pasbakhsh P, Sobhani A, Barbarestani M, Ghafari M, Etasam F. Time course of degradation and deadenylation of maternal c-mos and Cyclin A2 mRNA during early development of one-cell embryo in mouse. *Iranian Biochem J* 2004; 8(