



مطالعه الگوی بیان ژن‌های کد کننده فاکتور القایی هایپوکسی (*hif-1*, *hif-2*) در دوره تکامل لاروی فیل ماهی (*Huso huso* Linnaeus, 1758)

حامد کلنگی میاندره^{۱*}، امید جعفری^۱، آرش اکبرزاده^۲

^۱گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان

^۲گروه شیلات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس

نوع مقاله:	چکیده
پژوهشی	در این تحقیق، بیان ژن کد کننده فاکتورهای القا کننده هایپوکسیا <i>hif-1</i> و <i>hif-2</i> در دوره تکامل لاروی گونه فیل ماهی (<i>Huso huso</i>) در شرایط نرمال اکسیژن ارزیابی گشت. در تمام زمان‌های تکاملی ماهی بلوگا، بیان ژن <i>hif-1</i> و <i>hif-2</i> از جنین تا ماهی جوان مشاهده شد. بیان ژن‌های هدف با استفاده از ژن رفرنس <i>RPL6</i> نرمال سازی گشت. میزان تغییرات سطوح بیان ژن‌های <i>hif-1</i> و <i>hif-2</i> در تمامی دوره تکاملی از لحاظ آماری معنادار بود ($P < 0.05$). نتایج نشان داد که بیان نسبی ژن‌های <i>hif-1</i> و <i>hif-2</i> در دوره تکاملی در مرحله جنینی یا قبل از هج شدن پایین بوده و پس از آن افزایش معنا داری در زمان هج و تکامل ابتدایی لارو نشان دادند، در حالیکه در مراحل تکامل بعدی لاروی و مراحل نهایی لاروی رو به کاهش گذاشتند. افزایش میزان بیان ژن‌های مورد مطالعه با گذشت زمان لاروی به دلیل توسعه و تکامل عروق خونی و کاهش حجم کیسه زرده افزایش یافت. در این مطالعه مشخص گردید که دو ژن مذکور ارتباط تنگاتنگی با توسعه و تکامل لاروی به خصوص رگزایی (آنژیوژنز) دارند.
تاریخچه مقاله:	
دریافت: ۹۳/۰۱/۲۴	
اصلاح: ۹۳/۰۷/۲۰	
پذیرش: ۹۳/۰۷/۲۵	
کلمات کلیدی:	
بیان ژن	
تکامل لاروی	
فیل ماهی	

مقدمه

ماهیان خاویاری در حدود ۲۵۰ میلیون سال پیش تکوین و تکامل یافته و دریای خزر بیش از ۹۰ درصد ذخایر جهانی این ماهیان را در خود جای داده است (Coad, 2014). به دلایل مختلف مانند عوامل فعالیت‌های انسانی (آلودگی‌ها، تخریب زیستگاه‌ها و مهم‌تر از همه صید بی‌رویه) و عوامل زیستی مانند سن بلوغ بالا و شکارچیان تخم ماهیان خاویاری مانند اسبله، گاو ماهی و ماهی سیم، ساختار ذخایر ماهیان خاویاری در معرض خطر انقراض قرار گرفته است (Ludwig et al., 2001). فیل‌ماهی (*Huso huso* Linnaeus, 1758) بزرگترین موجود زنده دریای خزر است که علاوه بر اهمیت بالای اکولوژیک و ضرورت حفظ این گونه، به لحاظ اقتصادی نیز ضریب رشد بالای آن نسبت به دیگر گونه‌های ماهیان خاویاری اهمیت این گونه را دو چندان کرده است (Coad, 2014). یکی از عوامل مهم تکامل دوره لاروی نیاز اکسیژنی ماهیان می‌باشد. ماهیان در مراحل ابتدایی دارای شرایط فیزیولوژیک متنوعی بوده و نیازمند بررسی‌های دقیق تکاملی و آنژیوژنی می‌باشند. توانایی احساس و پاسخ به تغییرات غلظت اکسیژن محلول، نیاز اساسی برای بقای همه ارگانیسم‌ها است (Mirdar et al., 2012). فاکتورهای القای هایپوکسیا (*hifs*)، تنظیم کننده‌های کلیدی در پاسخ به شرایط هایپوکسیک در ارگانیسم‌ها می‌باشد (Bracken et al., 2003).

* نویسنده مسئول، پست الکترونیک: hkolangi@gau.ac.ir

hif-1 تنظیم کننده کلیدی برای القای ژن‌هایی است که سازگاری و بقای سلول‌ها و همه ارگانسیم‌ها را تحت شرایط نرمال اکسیژنی تا هایپوکسیک تسهیل می‌نماید (Ke and Costa, 2006). *Hif-1* به شکل هتروداایمر وجود دارد و از زیر واحدهای α و β تشکیل شده است (Mirdar et al., 2012) در پستانداران بیان حداقل ۱۰۰ ژن تحت کنترل *hif-1a* گزارش شده است (Rytkonen et al., 2007). فاکتورهای القای هایپوکسی همچنین چندین فرآیند آسیب شناختی در انسان مانند تومور را تحت تأثیر قرار می‌دهد. مطالعه الگوهای بیان ژن در روش مستقل از اکسیژن بیان کننده این موضوع می‌باشد که ژن‌های *hif-1* و *hif-2* به طور گسترده‌ای در عضلات انسان و موش بیان می‌گردند (Ke and Costa, 2006). در شرایط نرمال اکسیژنی، بیان پروتئین *hif* به صورت غیر فعال بوده و به سرعت در مسیر تخریب پروتئوزومی قرار می‌گیرد. تحت شرایط هایپوکسیا، *hif-1a* در سلول تجمع می‌یابد، سپس به همراه ¹ARNT ها به سمت هسته منتقل می‌شود و با *hif-1 β* دایمر می‌شود. این دایمرها سپس با عوامل مسئول هایپوکسیا (²HREs) در نواحی تنظیمی ژن‌های هدف باند می‌شوند و باندهای رونویسی با عملکرد همزمان، منجر به بیان ژن‌های هدف می‌شوند (Bracken et al., 2003). همچنین *IGFBP-1* یک ژن القای هایپوکسی است. مطالعات آزمایشگاهی (in vitro) با استفاده از کشت سلول‌های انسانی و مطالعات میدانی (in vivo) با استفاده از مدل‌هایی همچون ماهی زبرا و موش بیان کرده اند که بیان ژن *IGFBP-1* تحت شرایط هایپوکسیک افزایش یافته است. در آزمایشی بر روی جنین ماهی زبرا به عنوان یک مدل، نشان داده شد که هایپوکسیا به طور مؤثری بیان ژن *IGFBP-1* را افزایش داده است و نرخ رشد و تکامل را به تأخیر می‌اندازد. همچنین طی مطالعه ای بر روی نقایص تکاملی ماهی سالمون بالتیک (*Salmo salar*)، بیان شده است که پروتئین *hif* تکامل عروقی را در دوره طبیعی مراحل تکاملی با تعدیل کردن بیان ژن *VEGF* تنظیم می‌کند (Vuori et al., 2004; Nikinmaa and Rees, 2005). در قزل آلی رودخانه‌ای (*Salvelinus namaycush*) بعد از هج شدن، افزایش در الگوی بیان پروتئین *hif-1a* گزارش شده است. تاکنون هیچ‌گونه مطالعه‌ای بر روی روند بیان ژن کد کننده هایپوکسی در دوره تکاملی لاروی ماهیان ابتدایی مانند فیل‌ماهی صورت نپذیرفته است. از آنجایی که روند بیان ژن هایپوکسی می‌تواند بیان کننده تغییراتی در روند آنتوژنی در ماهی باشد (Ton et al., 2003)، لذا بررسی روند نسبی بیان این ژن می‌تواند بازگویی نیازهای اکسیژنی موجود در هر مرحله از تکامل باشد و به بقا و رشد آن کمک کند. از همین رو، مطالعه حاضر با هدف بررسی روند تغییرات بیان ژن‌های *hifs* در مراحل ابتدایی تکاملی فیل‌ماهی به عنوان اصلی‌ترین گونه اقتصادی ماهیان خاویاری در ایران صورت پذیرفت.

مواد و روش‌ها

نمونه برداری از تخم‌های لقاح یافته از مرکز تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری شهید مرجانی واقع در آق قلا انجام گرفت. تخم‌های فیل ماهی هفت روز پس از لقاح هج شدند (دمای آب ۱۸ درجه سلسیوس). پس از هج تخم‌ها، لاروها تا زمان جذب زرده و شروع تغذیه خارجی در تانک‌هایی از جنس فایبرگلاس نگهداری شدند، سپس تا زمان آماده شدن جهت رهاسازی به استخرهای خاکی منتقل شدند. لاروهای فیل ماهی تغذیه خارجی خود را در روز دهم پس از هج شروع نمودند. نمونه‌های مورد آزمایش در ۱۲ مرحله زمانی به صورت چهار روز قبل از هج، دو روز قبل از هج (تخم چشم زده)، یک روز قبل از هج، لارو تازه هج شده (صفر) و لارو ۱، ۳، ۶، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵ و ۵۰ روز پس از هج در فاصله زمانی اسفند تا اردیبهشت ۱۳۸۹-۱۳۹۰ جمع آوری شدند. تمام نمونه‌های ماهی با غلظت زیاد MS-222 کشته و بلافاصله با استفاده از ازت مایع (-۱۹۶) منجمد شدند و در فریزر ۸۰- تا زمان استخراج RNA نگهداری شدند.

استخراج RNA و ساخت cDNA

روش استخراج RNA، کنترل کیفیت و کمیت RNA و سنتز cDNA در منابع مختلف به طور کامل توضیح داده شده است (Akbarzadeh et al, 2011). به طور مختصر؛ تمامی لاروها و تخم‌ها در بافر استخراج Tri Reagent قرار داده شدند و با استفاده از دستگاه هموژنایزر کیاژن به طور کامل هضم شدند. RNA کل از شش نمونه بیولوژیک برای هر مرحله از دوره تکاملی

¹: aryl hydrocarbon nuclear trans locator

²: hypoxia response elements

استخراج گشت. RNA استخراج شده در ابتدا با استفاده از کیت Nucleospin (Macherey- Nagel, Germany) بر اساس دستورالعمل پاکسازی شده، سپس از لحاظ کیفی و کمی با استفاده از ژل آگاروز ۱ درصد و دستگاه نانودراپ ND-1000 (Thermo Scientific) ارزیابی شدند. به منظور ساخت cDNA ابتدا RNA ها تحت تیمار DNase I (Invitrogen, CA, USA) قرار داده شدند. پس از ارزیابی و تیمار DNase I یک میکروگرم از RNA با استفاده از کیت DyNamo™ (Finnzyme, USA) برای ساخت اولین رشته cDNA به کار برده شد. (Espoo, Finland)

طراحی پرایمر

پرایمرهای مورد نیاز برای انجام qPCR ژن‌های *hif-1* و *hif-2* بر اساس نواحی حفاظت شده توالی‌های موجود در بانک ژنی صورت گرفت. چندین پرایمر برای هر ژن طراحی و بهترین پرایمر بر اساس میزان بازدهی جهت مطالعه بیان ژن انتخاب شد (جدول ۱). سایز محصول حاصل از پرایمرها و میزان اختصاصی عمل نمودن پرایمرهای مورد بررسی با استفاده از ژل آگاروز ۱ درصد و توالی یابی ژن‌ها تأیید شد. پرایمرهای مورد استفاده در مطالعه Kolangi و همکاران (۲۰۱۲) برای ژن رفرنس در این تحقیق نیز مورد استفاده قرار گرفت.

جدول ۱. پرایمرهای استفاده شده در انجام qPCR

نام پرایمر	توالی	دمای اتصال (°C)	طول باند
<i>hif-2</i> For	GAAGGTCCTGCACTGCACT	۵۷	۱۸۰
<i>hif-2</i> Rev	CTTGGTGCACAAGTTCTGGT	۵۷	
<i>hif-1</i> For	ACAGAGCTGATGGGATACCAG	۵۷	۲۱۰
<i>hif-1</i> Rev	CCTGTGATGGCTTGTCCTTT	۵۸	
<i>RPL6</i> For	GTGGTCAAACCTCCGCAAGA	۵۸	۲۵۰
<i>RPL6</i> Rev	GCCAGTAAGGAGGATGAGGA	۵۷	

(qRT- PCR) Real-time PCR

واکنش qPCR با استفاده از دستگاه Applied Biosystems 7900 HT Fast Real-Time PCR system با استفاده از کیت سایبر گرین (Fermentase) و بر اساس دستورالعمل استاندارد شامل واسرشتی اولیه به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد و با ۴۰ چرخه در این دما در ۳۰ ثانیه انجام شده است. سپس کاهش دما به ۶۵ درجه سانتیگراد به مدت ۲۰ ثانیه و بعد از آن ۴۰ ثانیه در دمای ۷۴ درجه سانتیگراد و در نهایت برای بسط نهایی به مدت هفت دقیقه در این دما قرار داده شد. همه واکنش‌ها در سه تکرار انجام پذیرفت. سطوح بیان ژن تحت عنوان Ct توسط دستگاه نشان داده می‌شود که نشان دهنده تعداد چرخه‌هایی است که سیگنال فلورسنت نسخه‌های ژنی را شناسایی می‌نماید. منحنی استاندارد بر اساس رقت‌های مختلف cDNA (رقت‌های ۱ به ۱۰ تا ۱ به ۲۰۰۰) ترسیم گشت. راندمان PCR با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد (Radonic et al., 2004).

$$E\% = (10^{1/\text{slope}} - 1) \times 100$$

تغییرات نسبی بیان ژن‌های *hif-1* و *hif-2* با استفاده از روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ محاسبه گشت که در آن $\Delta\Delta Ct$ برابر است با ΔCt ژن هدف منهای ΔCt کالیبراتور $[\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{Target gene}} - \Delta Ct_{\text{calibrator}}]$ ، ΔCt ژن هدف برابر است با مقدار Ct ژن هدف منهای Ct ژن رفرنس $[\Delta Ct = Ct_{\text{target gene}} - Ct_{\text{reference gene}}]$ و ΔCt کالیبراتور برابر است با ΔCt ژن هدف هر نمونه منهای ΔCt نمونه کنترل (Livak and Schmittgen, 2001). در بین زمان‌های مورد مطالعه مرحله ای که کمترین Ct را دارد به عنوان کالیبراتور به منظور ارزیابی نسبی بیان ژن هدف مورد استفاده قرار گرفت. نرمال سازی سطح بیان *hif-1* و *hif-2* بین مراحل مختلف تکاملی فیل ماهی با استفاده از آنالیز تجزیه واریانس یک طرفه (ANOVA) انجام شد و در ادامه برای تحلیل‌های چند مقایسه‌ای از آزمون Tukey استفاده گشت. اختلاف مشاهده شده به لحاظ آماری در سطح ۵٪ معنا دار بود ($P < 0/05$).

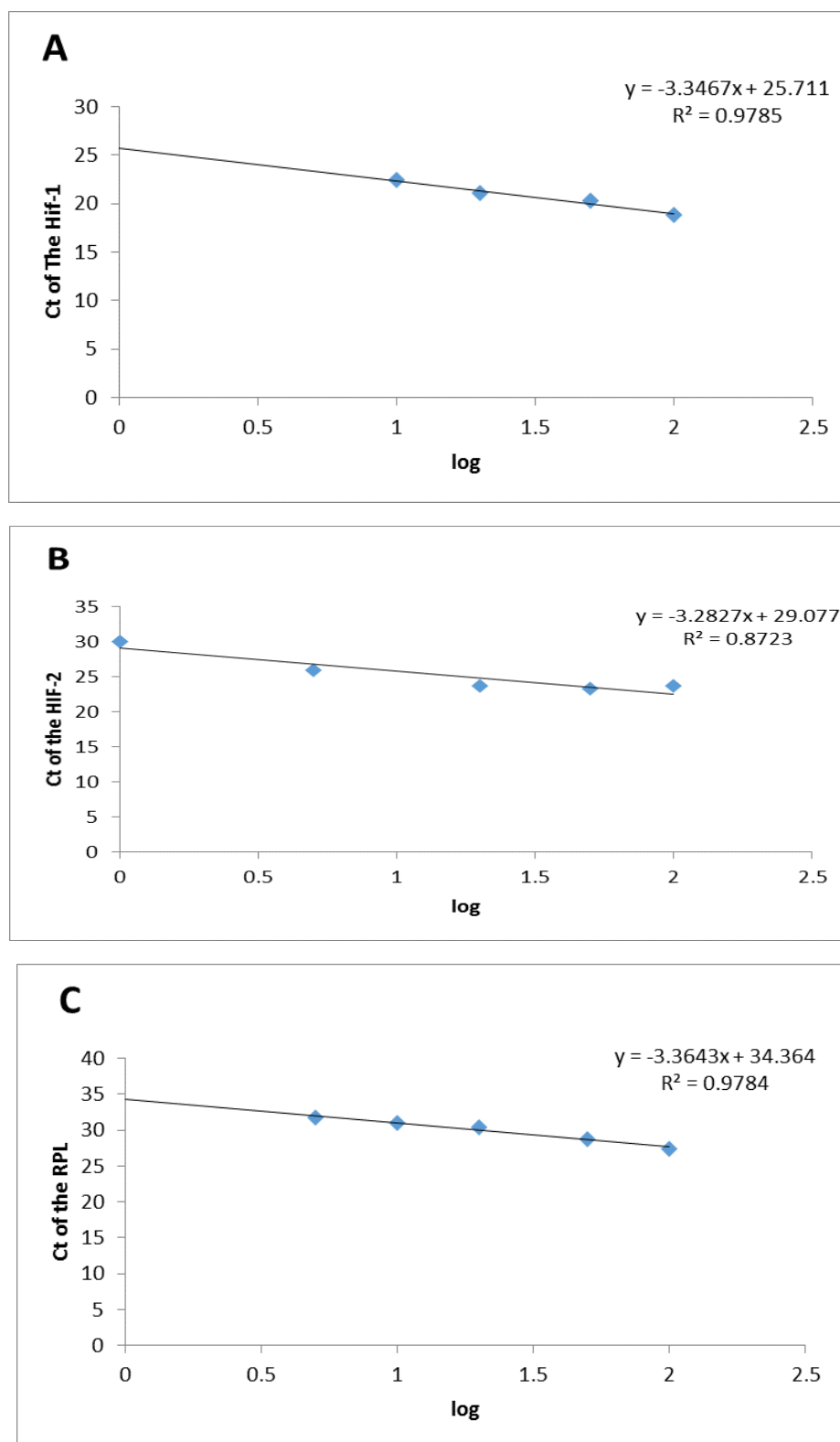
نتایج

در ابتدا پرایمرهای ژن‌های هدف *hif-1* و *hif-2* و ژن رفرنس *RPL6* مورد ارزیابی قرار گرفتند به همین جهت با استفاده از یک *PCR* نرمال تست شدند و محصول *PCR* بر روی ژل آگاروز یک درصد رویت شد. نتایج نشان داد که پرایمرها به جایگاه صحیح ژن متصل شده‌اند (شکل ۱). همچنین از لحاظ عملکرد (Efficiency) نیز پرایمرها مورد ارزیابی قرار گرفتند و نتایج شیب خط نشان داد که درصد کارایی برای پرایمرهای *hif-2*، *hif-1* و ژن رفرنس *RPL6* به ترتیب ۹۷، ۹۹، ۹۸ بود (شکل ۲، A، B، C).

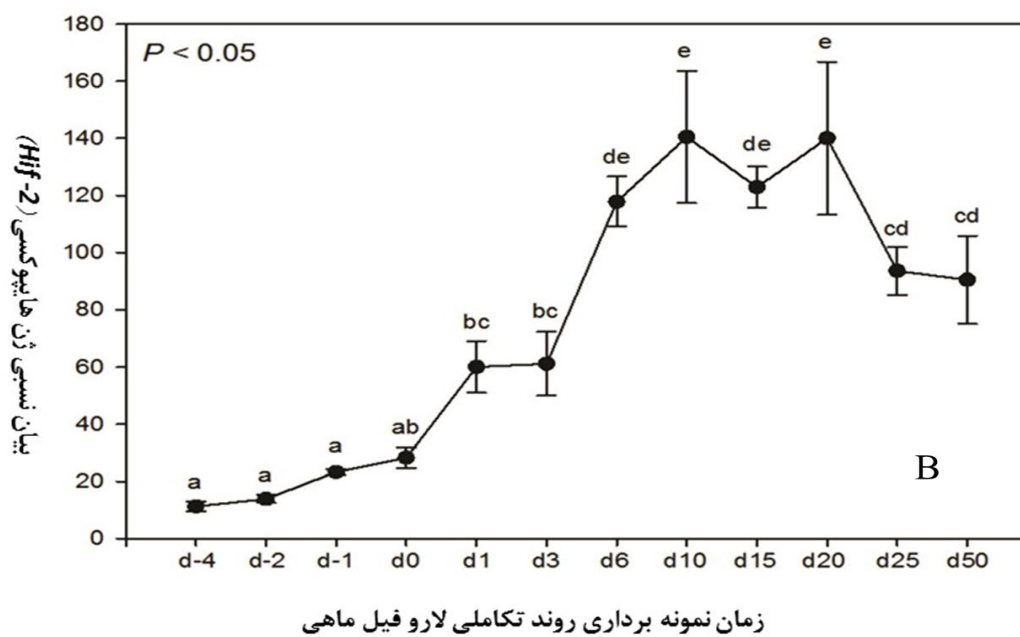
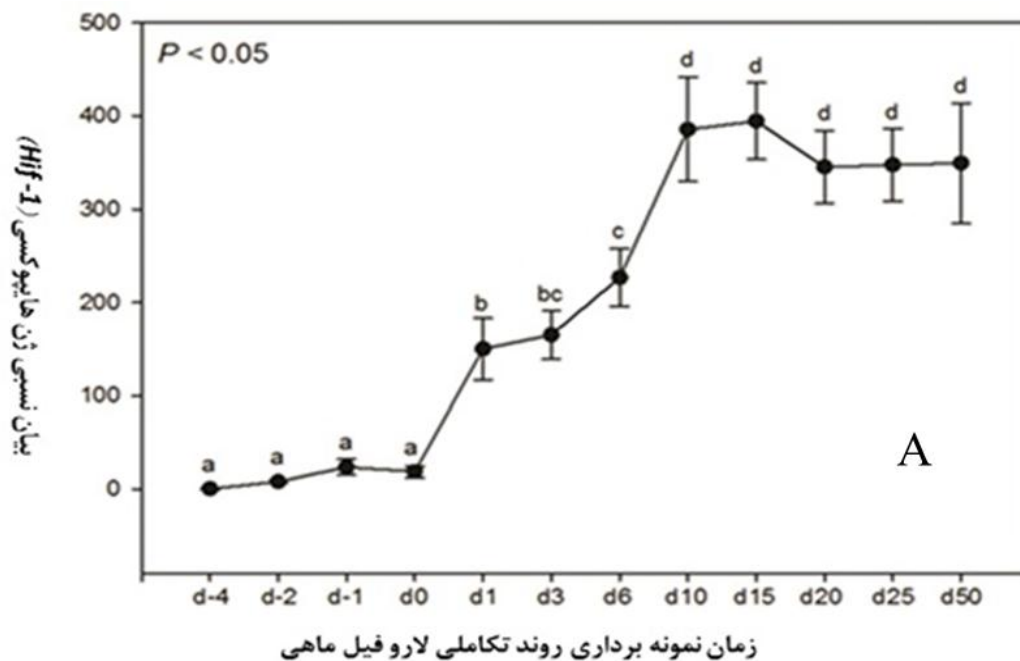
بیان نسبی ژن‌های هایپوکسی و *hif-2* در تمام مراحل تکاملی (جنین تا ماهی جوان) فیل ماهی مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۳، A و B). بیان ژن‌های مذکور با استفاده از ژن رفرنس *RPL6* نرمال گردید، نتایج نرمال شده، وجود اختلاف آماری در بیان ژن‌های مذکور را در مراحل مختلف تکاملی نشان داد. پس از هچ شدن لاروها، در سطح بیان دو ژن *hif-1* (شکل ۳A) و *hif-2* (شکل ۳B) افزایش نسبی مشاهده گردید که این افزایش تا مراحل انتهایی لاروی ادامه داشت. از لحاظ آماری میزان بیان ژن در مراحل مختلف تکاملی دارای اختلاف معنی‌داری بودند ($p < 0.05$). سطح بیان ژن *hif-1* از مرحله ۱۰ روز پس از هچ شدن نسبتاً ثابت باقی ماند و این در حالی بود که سطح بیان ژن *hif-2* بیست روز پس از هچ شدن (همزمان به تغذیه خارجی) به طور معنی‌داری کاهش یافت.



شکل ۱. اختصاصی بودن و اتصال صحیح ژن‌های هدف و رفرنس را نشان می دهد.



شکل ۲. منحنی‌های استاندارد برای جفت آغازگرهای ژن‌های هدف *hif-1* (A)، *hif-2* (B) و ژن رفرنس *RPL6* (C) بر پایه مقادیر مشخصی از *cDNA* در رقت‌های مختلف لگاریتمی، معادله خط و ضریب همبستگی (R^2) نمایش داده شده است. منحنی استاندارد بر اساس رگرسیون بین لگاریتم رقت‌های مورد استفاده (محور X) و Ct به دست آمده برای هر رقت (محور Y) رسم شده است.



شکل ۳. نسبت بیان سطوح mRNA نرمال شده از *hif-1* (A) و *hif-2* (B) با استفاده از *RPL6* در طی مراحل آغازی تکاملی فیل ماهی. d-4: ۴ روز قبل از هچ؛ d-2: ۲ روز قبل از هچ؛ d-1: ۱ روز قبل از هچ؛ d0: تخم تازه هچ شده (روز صفرم)؛ d1: ۱ روز بعد از هچ (۱dph)؛ d3: ۳dph؛ d6: ۶dph؛ d10: ۱۰dph؛ d15: ۱۵dph؛ d20: ۲۰dph؛ d25: ۲۵dph؛ d50: ۵۰dph. داده ها نشانگر میانگین ± انحراف استاندارد هستند (n=6).

اختلاف معنی دار آماری بین داده های تفکیکی نرمال شده بین دو گروه با استفاده از ANOVA و آزمون چند مقایسه ای توکی تحلیل شدند. حروف متفاوت در هر نمودار نشان دهنده اختلاف معنادار در سطح ۵٪ می باشد.

بحث

در این مطالعه، رابطه مستقیمی بین بیان ژن های *hif-1* و *hif-2* در دوره تکاملی فیل ماهی یافت شد. نتایج این مطالعه اولین گزارش در مورد بیان ژن های *hif-1* و *hif-2* در دوره تکامل لاروی ماهی در شرایط نرمال اکسیژنی می باشد. سطح بیان ژن های

مورد مطالعه به طور معنی داری پس از هج افزایش یافته و تا مراحل نهایی دوره لاروی و مرحله جوانی این افزایش در سطح ثابتی باقی ماند. افزایش بیان ژن‌های هایپوکسی در طول مدت زمان تکامل لاروی و به خصوص در زمان جذب زرده بیانگر ارتباط مستقیم این عوامل با توسعه اندام‌ها، افزایش عروق و رگزایی (آنژیوژنز) می‌باشد. مطالعات متعددی رابطه بین بیان ژن هایپوکسی و تکامل عروق و بقاء در دوره لاروی را نشان می‌دهد (Blancher *et al.*, 2000; Bonventre *et al.*, 2011). ارتباط ژن‌های هایپوکسی با ژن *VEGF* که نقش تکامل و توسعه عروق را بر عهده دارد به خوبی در گزارش‌های متعددی مورد ارزیابی قرار گرفته است (Levy *et al.*, 1995; Forsythe *et al.*, 1996; Miquerol *et al.*, 2000; Holmes and Zachary, 2005; Kallergi *et al.*, 2009). بررسی بیان ژن هایپوکسی *hif-1* در جنین پستانداران نقش کلیدی این ژن در توسعه عروق، آنژیوژنز و توسعه سیستم عصبی را نشان داد (Vuori *et al.*, 2004). در پستانداران زمانی که ژن *hif-1* دچار مشکل بود، توسعه غیرعادی عروق خونی در جنین مشاهده شد (Carmeliet *et al.*, 1996; Ryan *et al.*, 1998). مطالعه بیان ژن *hif-1* در ماهی سالمون افزایش در بیان ژن مذکور پس از هج و همزمان با جذب زرده را نشان داد (Vouri *et al.*, 2009). ژن هایپوکسی با تأثیر بر روی ژن *VEGF* که نقش کلیدی در شکل‌گیری عروق دارد، می‌تواند بر تکامل و توسعه عروق در مراحل ابتدایی لاروی تأثیر گذار باشد (Breier, 2000).

نتایج این مطالعه به خوبی افزایش بیان ژن‌های *hif-1* و *hif-2* را در زمان هج و تکامل لاروی فیل ماهی نشان داد. پروتئین‌های کد شده توسط این دو ژن در ارتباط تنگاتنگی با یکدیگر می‌باشند که تحت تأثیر غلظت اکسیژن سلولی تنظیم می‌گردند. همچنین شرایط هایپوکسی فاکتور فعال‌کننده برای ژن‌های هدف می‌باشد (Blancher *et al.*, 2000; Losso and Bawadi, 2005). مشخص شده است که ژن‌های هایپوکسی به شدت وابسته به وجود اکسیژن می‌باشند و در شرایط نرمال اکسیژنی به سرعت غیر فعال می‌گردند (Bracken *et al.*, 2003). شایان ذکر است که چندین گزارش از بیان ژن‌های *hifs* در شرایط نرمال اکسیژنی (نورموکسیک) وجود دارد که خود مؤید نقش‌های متنوع *hifs*، فراتر از تنها یک پاسخ در شرایط هایپوکسی می‌باشد (Kajimura *et al.*, 2006). برای طی شدن دوره جنینی به صورت نرمال وجود عوامل هایپوکسی *hif-1* و *hif-2* به دلیل اینکه نقش مرکزی را برای هموستازی اکسیژن بر عهده دارند، ضروری می‌باشد (Losso and Bawadi, 2005). افزایش بیان ژن‌های هایپوکسی به ویژه در زمان هج لارو فیل ماهی در شرایط نرمال اکسیژنی بیانگر نقش کلیدی این ژن‌ها در این مرحله از تکامل لارو فیل ماهی می‌باشد.

در این تحقیق برای اولین بار ارتباط بین ژن‌های هایپوکسی با توسعه تکامل لاروی فیل ماهی مورد ارزیابی قرار گرفته است. داده‌های این تحقیق افزایش بیان ژن‌های هایپوکسی در طول تکامل لاروی را نشان داد که در مرحله تفریح، شروع افزایش بوده و این شروع تا مراحل انتهایی لاروی ادامه داشته و سپس در سطحی ثابت باقی مانده بود. علت افزایش بیان ژن‌های مورد مطالعه در زمان هج و جذب زرده به خاطر نقش کلیدی این ژن‌ها در تکامل عروق و آنژیوژنز می‌باشد.

منابع

- Akbarzadeh, A., Farahmand, H., Mahjoubi, F., Nematollahi, M.A., Leskinen, P., Rytkonen, K., Nikinmaa, M. 2011. The transcription of L-gulonogamma-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.
- Breier, G. 2000. Angiogenesis in Embryonic Development-A Review. *Placenta*. 14: 11-15.
- Blancher, C., Moore, J.W., Talks, K.L., Houlbrook, S., 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., Cooper, K.R. 2011. Methyl tert butyl ether targets developing vasculature in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Aquatic Toxicology*. 105: 29-40.
- Bracken, C.P., Whitelaw, M.L., Peet, D.J. 2003. The hypoxia-inducible factors: key transcriptional regulators of hypoxic responses. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 60: 1376-1393.

- Carmeliet, P., Ferreira, V., Breier, G., Pollefeyt, S., Kieckens, L., Gertsenstein, M., Fahrig, M., Vandenhoeck, A., Harpal, K., Eberhardt, C., Declercq, C., Pawling, J., Moons, L., Collen, D., Risau, W., Nagy, A. 1996. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature*. 380: 435–439.
- Coad, B. 2014. Fresh water fishes of Iran. Retrieved from <http://www.briancoad.com/contents.htm>. On: 19 May 2014.
- Forsythe, J.A., Jiang, B.H., Iyer, N.V., Agani, F., Leung, S.W., Koos, R.D., Semenza, G. 1996. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Molecular and Cellular Biology*. 16(9): 4604–4613.
- Holmes, D.I., Zachary, I. 2005. The vascular endothelial growth factor (VEGF) family: angiogenic factors in health and disease. *Genome Biology*. 10.1186/gb-2005-6-2-209
- Kajimura, S., Aida, K., 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.
- Kallergi, G., Markomanolaki, H., Giannoukarak, V., Papadaki, M.A., Strati, A., Lianidou, E.S., Georgoulas, V., Mavroudis, D., Agelaki, S. 2009. Hypoxia inducible factor-1 α and vascular endothelial growth factor expression in circulating tumor cells of breast cancer patients. *Breast Cancer Research*. 10.1186/bcr2452,11(6): 12.
- Ke, Q., Costa, M. 2006. Hypoxia-Inducible Factor-1 (*hif-1*). *Molecular Pharmacology*. 70: 1469–1480.
- Kolangi, M.H., Farahmand, H., Akbarzadeh, A., Ramezanzpour, S., Kaiya, H., Miyazato, M., Rytönen, K.T., Nikinmaa, M. 2012. Developmental transcription of genes putatively associated with growth in two sturgeon species of different growth rate. *General and Comparative Endocrinology*. 182: 41–47.
- Levy, A.P., Levy, N.S., Wegner, S., Goldberg, M.A. 1995. Transcriptional regulation of the rat vascular endothelial growth factor gene by hypoxia. *The Journal of Biological Chemistry*. 270(22): 13333–13340.
- Livak, K.J., 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.
- Losso, J.N., Bawadi, H.A. 2005. Hypoxia Inducible Factor Pathways as Targets for Functional Foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53: 3751–3768.
- Ludwig, A., Belfiore, N., Pitra, C., Svirsky, V., Jenneckens, I. 2001. Genome Duplication Events and Functional Reproduction of Ploidy levels in Sturgeon (*Acipenser*, *Huso* and *Scaphirhynchus*). *Genetics Society of America*. 158(2): 1203–1215.
- Miquerol, L., Langille, B.L., Nagy, A. 2000. Embryonic development is disrupted by modest increases in vascular endothelial growth factor gene expression. *Development*. 127: 3941–3946.
- Mirdar, S. h., Arab, A., Hedayati, M., and Hajizade, A. 2012. The effect of pregnant rat swimming on hypoxia-inducible factor-1 α levels of neonatal lung. *Tehran University Medical Journal*. 69(12): 754–760.
- Nikinmaa, M., Rees, B.B. 2005. Oxygen-dependent gene expression in fishes. *The American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 288: 1079–1090.
- Radonic, A., Thulke, S., Mackay, I.M., Landt, O., Siegert, W., Nitsche, A. 2004. Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 313: 856–862.
- Ryan, H.E., Lo, J., Johnson, R.S. 1998. *hif-1* alpha is required for solid tumor formation and embryonic vascularization. *EMBO Journal*. 17: 3005–3015.
- Rytönen, K.T., Vuori, K.A.M., Primmer, C.R., Nikinmaa, M. 2007. Comparison of hypoxia-inducible factor-1 alpha in hypoxia-sensitive and hypoxia-tolerant fish species. *Comparative Biochemistry and Physiology D*. 2: 177–186.
- Ton, C., Stamatiou, D., Liew, C.C. 2003. Gene expression profile of zebrafish exposed to hypoxia during development. *Physiological Genomics* 13: 97–106.
- Vuori, K.A., Soitamo, A., Vuorinen, P.J., Nikinmaa, M. 2004. Baltic salmon (*Salmo salar*) yolk sac fry mortality is associated with disturbances in the function of hypoxia-inducible transcription factor (*hif-1* alpha) and consecutive gene expression. *Aquatic Toxicology*. 68: 301–313.
- Vuori, K.A., Paavilainen, T., Nikinmaa, M. 2009. Molecular Markers of Yolk Sac Fry Development in Nine Families of Lake Trout. *Journal of Aquatic Animal Health*. 21: 279–289.