Review Article

نقش مسیر پیام‌دهی درون سلولی Wnt/β-catenin در القاء و باز برنامه نویسی سلول‌های زاینده بدوی رت به سلول‌های بنیادی پرتوان

علیرضا محمدی[1*]، وهاب باباپور[1]، عبدالحسین شاهوردی[2و3]

۱- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، گروه فیزیولوژی و فارماکولوژی، تهران، ایران.
۲- پژوهشگاه رویان، پژوهشکده زیست شناسی و علوم پزشکی تولید مثل جهاددانشگاهی، مرکز تحقیقات پزشکی تولید مثل، گروه جنین شناسی، تهران، ایران.
۳- پژوهشگاه رویان، پژوهشکده زیست شناسی و فناوری سلولهای بنیادی جهاددانشگاهی، مرکز تحقیقات علوم سلولی، گروه سلول های بنیادی و زیست شناسی تکوینی، تهران، ایران.

تاریخ دریافت مقاله: ۱۰ /۱۳۹۲/۰۶ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۲/۱۰/۱۵

چکیده

سلول‌های زاینده‌ی بدوی(PGCs)، پیش سازهای تک توان گامت‌ها هستند. PGCها می‌توانند در شرایط آزمایشگاه، به نوعی از سلول‌های بنیادی پرتوان تبدیل شوند که اصطلاحا به آنها سلول‌های زاینده‌ی جنینی اطلاق می‌شود. PGCها همچنین می‌توانند چنین پرتوانی را در بدن موجود زنده، کسب نموده و تشکیل تومورهای سرطانی نمایند. تحت شرایط کشت اختصاصی، PGCها می‌توانند به سلول‌های زاینده‌ی جنینی(EGC)، باز برنامه نویسی شوند که قادرند مارکرهای کلیدی پرتوانی مانند Pou5f1 (Oct4)، Sox2 و Nanog را بیان کنند. یک روش برای استخراج سلول‌های EGC، دستکاری مسیرهای پیام دهی درون سلولی است که در القای پرتوانی، ایفای نقش می‌کنند. مسیر پیام دهی Wnt/β-catenin، نقش‌های بسیاری در فرآیندهای مختلف سلولی همچون تکثیر، تمایز، مهاجرت، زنده مانی، آپوپتوز و پرتوانی، ایفا می‌کند. برای القای پرتوانی و بازبرنامه نویسی PGCها به سلول‌های زاینده‌ی جنینی، مسیر پیام دهی Wnt/β-catenin باید فعال گردد که استفاده از ریز مولکول‌ها یکی از روش‌های رسیدن به این هدف است. گلیکوژن سنتاز کیناز ۳ (GSK3)، یکی از مهمترین مولکول‌های مسیر مرکزی Wnt است که مهار آن با ریز مولکول CHIR99021، می‌تواند موجب فعال شدن این مسیر شود اما جهت باز برنامه نویسی PGCها به سلول‌های زاینده‌ی جنینی، کافی نیست. برای دستیابی به راندمان بالا، همزمان با فعال سازی مسیر مرکزی Wnt، مسیر پیام دهی MAPK نیز باید با استفاده از ریز مولکول‌هایی همانند PD0325901 مهار شود. بنابراین، فعال کردن مسیر مرکزی Wnt و مهار همزمان مسیر MAPK، می‌تواند منجر به القای پرتوانی در PGCهای رت شده و آنها را به سلول‌های زاینده‌ی جنینی، باز برنامه نویسی کند.

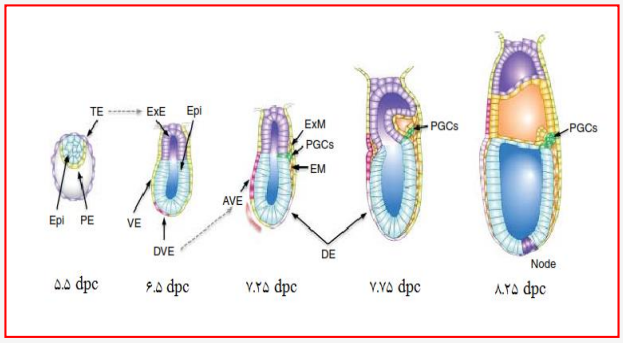
کلمات کلیدی: سلول‌های زاینده‌ی جنینی، سلول‌های زاینده بدوی، سلول‌های بنیادی جنینی، باز برنامه نویسی

مقدمه

مقدمه ای بر تکوین سلول‌های زاینده‌ی بدوی در جنین اولیه‌ی رت: سلول‌های زاینده‌ی بدوی (Primordial Germ Cells :PGCs)، سلول‌های پیش ساز گامت‌های جنسی بوده و سلول‌های تک توانی(Unipotent) هستند که قبل از گاسترولاسیون، تعیین سرنوشت می‌شوند. در رت، PGCها در روز ۸,۲۵ آبستنی (۸,۲۵ dpc) (مرحله‌ی ۱۰ جنین‌شناسی تیلر (Theiler Stage 10)، برابر با ۷,۲۵ dpc در موش)، به صورت ۲۰ تا ۶۰ سلول آلکالین فسفاتاز مثبت ((TNAP :Tissue None Specific Alkalin Phosphatase)، در قاعده‌ی آلانتوئیس در حال تکوین و درون اندودرم کیسه زرده، مشاهده می‌شوند (شکل ۱) (۱). PGCها بعد از تخصصی شدن، مهاجرت را آغاز و ضمن عبور از اندودرم روده خلفی در حال تکوین، خود را به برآمدگی‌های تناسلی (genital ridges)، می‌رسانند. PGCها بعد از رسیدن به برآمدگی‌های تناسلی، گونوسایت (Gonocyte)، نامیده می‌شوند

*نویسنده مسئول: علیرضا محمدی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، گروه فیزیولوژی و فارماکولوژی، تهران، ایران. تلفن: ۰۹۱۲۵۴۲۳۴۷۳
Email: ar.mohammadi@srbiau.ac.ir

که از این مرحله به بعد، اختلافاتی در جنس نر و ماده مشاهده می‌شود. در جنس ماده، گونوسایت ها تقسیم میوز را آغاز کرده و در مرحله‌ی متافاز میوز I، تقسیم متوقف می‌شود تا بعد از بلوغ، ادامه تقسیم از سر گرفته شود. در جنس نر، تقسیم میوز بعد از بلوغ، آغاز می‌شود (۲، ۳).



شکل ۱) تصویر شماتیک از ظهور سلول‌های زاینده‌ی بدوی(**PGC**ها) در جنین رت. در زمان لانه گزینی(تقریبا" ۵,۵ dpc)، بلاستوسیست از سه نوع سلول تشکیل شده است: تروفواکتودرم (TE, بنفش)، اندودرم اولیه (PE, زرد) و اپی‌بلاست (EPi, آبی). سلول‌های تروفوبلاست در تماس با اپی‌بلاست، تکثیر یافته و صفحه ساده‌ی اپیتلیالی اکتودرم خارج جنینی (ExE) را تشکیل می-دهند که یک حفره کوچک مرکزی (حفره پیش آمنیوتیک) را احاطه می‌کنند. سلول‌های اپی‌بلاست نیز تحت تاثیر این حفره دار شدن قرار گرفته و در dpc ۶,۵، تشکیل یک صفحه اپیتلیالی فنجانی شکل می‌دهند. سلول‌های اپی-بلاست، صلاحیت تمایز به تمامی سلول‌های سوماتیکی و همچنین سلول‌های زاینده را، دارا هستند. الگوی جنینی اولیه، شامل شکل گیری قطب قدامی-خلفی، گاسترولاسیون و تخصصی شدن سلول‌های زاینده، از طریق پیام دهی رسیده از اندودرم احشایی (Visceral Endoderm :VE) مشتق شده از اکتودرم خارج جنینی و اندودرم اولیه که اپی‌بلاست را می پوشاند، میانجی گری می-شود. DVE: اندودرم احشایی خلفی، AVE: اندودرم احشایی قدامی، ExM: مزودرم خارج جنینی، EM: مزودرم جنینی، DE: اندودرم قطعی، PGCs: سلول‌های زاینده‌ی بدوی.

تخصصی شدن سلول‌های زاینده‌ی بدوی در جنین اولیه‌ی رت: بر اساس عملکرد و نقش دودمان سلول‌های زاینده به عنوان ناقلین اطلاعات ژنتیکی، تخصصی شدن PGCها، مجموعه‌ای از سه رویداد کلیدی شامل سرکوب برنامه سوماتیکی، به دست آوردن دوباره پتانسیل پرتوانی و متعاقب آن باز برنامه نویسی اپی ژنتیکی گسترده ژنومی است.

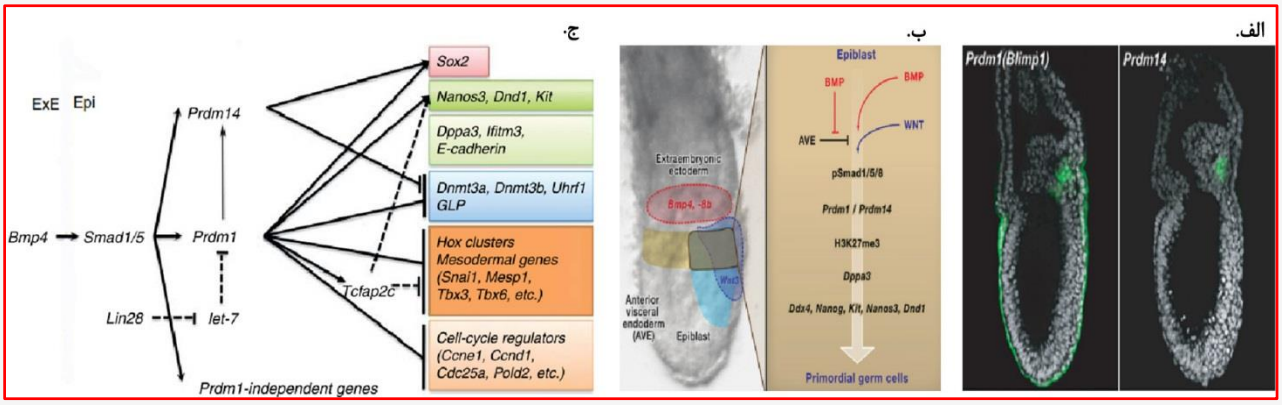
سرکوب برنامه‌ی سوماتیکی به عنوان یک رویداد کلیدی شناخته می‌شود به این معنی که در این فرآیند، برنامه‌های سوماتیکی سرکوب می‌شوند تا سلول‌های زاینده، تشکیل شوند، هر چند مولکول‌هایی که در جانوران مختلف، در این رویداد دخالت دارند، شناسایی نشده‌اند. بسته به نوع موجود، این سرکوب از طریق مهار کلی RNA پلیمراز یا بلوکه شدن کامل برنامه سوماتیکی ایجاد می‌شود. به نظر می‌رسد که فاکتورهای متفاوتی همچون PRDM1، Prdm14، LIN28، Tcfap2c در این فرآیند دخالت دارند که به شرح آنها خواهیم پرداخت (۴، ۵).

روز ۷,۵ تکوین جنینی رت، اکتودرم خارج جنینی (Extraembryonic Ectoderm) از طریق ترشح BMP8b و BMP4 (Bone Morphogenetic Protein 4)، دو عضو از خانواده بزرگ TGF-β، به سلول‌های معینی از اپی بلاست، توانایی تولید PGCها را می‌دهد. ترشح BMP4 و BMP8b، تشکیل شدن آلانتوئیس، تشکیل سلول‌های پیش ساز PGC و اندازه آنها را، تنظیم می‌کنند. نشان داده شده است که جنین‌های جهش یافته-ای که فاقد فعالیت ژن‌های TGF-β، BMP4 و BMP8 یا واسطه-های داخل سلولی آنها مانند Smad 1، Smad 4 و Smad 5 (که همگی پایین دست BMP4 می‌باشند) هستند، یا فاقد PGC (PGC-null) هستند و یا تعداد آنها به طور قابل ملاحظه‌ای کاهش یافته است (۸-۶). دو مسیر پیام‌دهی BMP4 و BMP8b، بطور سینرژیک عمل می‌کنند اما با وجود اینکه نقش این دو مسیر در تشکیل و تخصصی شدن PGCها ضروری می‌باشد اما احتمالا این دو فاکتور، تنها اجزاء لازم برای این فرآیند نیستند (۱۱-۹).

تنظیم رونویسی جهت تخصصی شدن PGCها: مطالعات آنالیز بیان ژن تک-سلولی(Single-Cell Gene Expression Analysis)، مانند آنالیز ریز آرایه cDNAی تک-سلولی (Single-Cell cDNA Microarray Analysis)، تا حدودی تنظیم کننده-های کلیدی تخصصی شدن PGCها و وقایع رونویسی کلی مرتبط با آن را، شناسایی کرده‌اند (۱۲). Blimp1 (PRDM1)، یک تنظیم کننده‌ی رونویسی حاوی دامین‌های PRDI-BF1 و RIZ (PR)، است که به عنوان یک تنظیم‌گر اصلی (Master Regulator) تمایز سلول‌های پلاسما از سلول‌های B (B-cells)، شناخته می‌شود، که به تازگی به عنوان مارکر شناسایی سلول‌های زاینده در اپی‌بلاست، معرفی شده است. در حدود E۶,۵ (رت: ۷,۵ dpc)، Prdm1، در زیر مجموعه ای از سلول‌های نزدیک (Proximal) اپی بلاست خلفی (مرحله پیش از شیارخلفی یا P/0S)، شروع به بیان می‌کند.

سپس تعداد سلول‌های Prdm1^{+} افزایش یافته و به سمت خلفی، حرکت می‌کنند و به سلول‌های PGCی که دارای بیان آلکالین فسفاتاز هستند، تکامل می یابند و در این مرحله، Dppa3 یا Stella را بیان می‌کنند و بیان ژن HOX در آنها در حدود E۷,۲۵ (رت: dpc ۸,۲۵)، سرکوب می‌شود (۱۳، ۱۴) (شکل ۱ و ۲).

سلول‌های Prdm1^{+}، در ابتدا ژن HOX و بسیاری از ژن های اما به دنبال آن، بیان آنها در حدود E۶,۷۵ تا E۷ (رت: dpc ۷,۷۵ تا dpc ۸) (مرحله‌ی پایانی شیار یا فاقد جوانه)، فرو تنظیم (Downregulate) می‌شود. در مقابل، سلول‌های Prdm1^{+}، در ابتدا ژن های مرتبط با پرتوانی مانند Nanog، Sox2 و Zic3 را فروتنظیم می‌کنند اما بیان این ژنها را در مرحله‌ی پایانی شیار فاقد جوانه (LS/0B)، دوباره به دست می‌آورند. بنابر این به نظر



شکل ۲) مدل هماهنگ شده‌ی تخصصی شدن PGC**ها** بوسیله PRDM1 و PRDM14، دو پروتئین حاوی دامین PR. **الف)** بیان PRDM1 (چپ) و PRDM14 (راست) در جنین مرحله‌ی پایانی شیار (LS). PRDM1، با ظهور پیش سازهای PGCهای در حال تشکیل از ناحیه بسیار نزدیک اپی‌بلاست خلفی و نیز اندودرم احشایی، بیان می‌شود. PRDM14، منحصرا در دودمان سلول‌های زاینده و در رده های سلول‌های پرتوان بیان می‌شود. **ب)** شکل سمت چپ: در جنین مرحله‌ی پیش از گاسترولاسیون، ناحیه ای (قسمت قهوه ای) در بخش خلفی اپی‌بلاست وجود دارد که سطوح بالایی از پیام‌های BMP (قسمت زرد) و WNT (قسمت آبی) را، نشان می‌دهد. این ناحیه، بواسطه‌ی بیان BMP4 و BMP8b در اکتودرم خارج جنینی(ناحیه مشخص شده با خط نقطه چین قرمز)، بیان WNT3a در اپی‌بلاست(ناحیه مشخص شده با خط نقطه چین آبی) و پیام‌های آنتاگونیستی از اندودرم احشایی قدامی، تشکیل می‌شود. تعدادی از سلو های واقع در این ناحیه، پتانسیل تشکیل سلول‌های زاینده(PGCs) را، به دست می‌آورند. سلول‌های سایر مناطق اپی‌بلاست، که به این ناحیه نقل مکان می‌کنند، می‌توانند PGCها را تشکیل دهند، در حالیکه سلول‌هایی که از این ناحیه به نقاط دیگر می روند، این توانایی را از دست می‌دهند (۱۰). شکل سمت راست: بر اساس این یافته‌های جنین شناختی، اوهیناتا و همکاران(۲۰۰۹)، با به کار بردن BMP4، WNT3A و BMP8b، یک پروتکل کشت آزمایشگاهی طراحی کردند که منجر به القاء تشکیل PGCها از سلول‌های اپی‌بلاست می‌شود(۴۴). در پاسخ به این پیام ها، سلول‌های اپی‌بلاست، یک توالی بیان ژنی و تغییر وضعیت اپی ژنتیکی همانند PGCهای درون بدن، از خود نشان می‌دهند. ج) خلاصه‌ای از مسیرهای ژنتیکی برای تخصصی شدن سلول‌های زاینده‌ی بدوی(PGCs). فلش های سیاه و خطوط سیاه با نوار انتهایی(بر اساس آزمایشات درون بدنی: In vivo)، به ترتیب نشاندهنده‌ی مسیرهای ژنتیکی برای فعال سازی و سرکوب (مهار)، هستند. فلش های نقطه چین و خطوط نقطه چین با نوار انتهایی(بر اساس پیشنهادات ارائه شده بر پایه‌ی تجربیات آزمایشگاهی: In vitro)، به ترتیب نشاندهنده‌ی مسیرهای ژنتیکی برای فعال سازی و سرکوب (مهار)، می‌باشند (۴۵، ۴۶).

شناخته شده‌ی دخیل در تکوین جنین، بویژه ژن های دخیل در الگوی تخصصی شدن و القاء مزودرم (شامل ژن هایی از قبیل Hoxa1، Hoxa2، Hoxa3، Hoxb1، Hoxb2، Hoxd1، Hoxd9، Snai1، Tbx3، Tbx6، Mesp1، Sp5، Mixl1، Sall3، Cdx1، Isl1، Ets، Etv2، Nfkbia، Foxf1، Plxna2 و Smad7)، را بیان می‌کنند، می‌رسد که پیش‌سازهای PGC، در ابتدا به سمت یک سرنوشت سوماتیکی مزودرمی، سوق داده می‌شوند اما بعد از آن طبیعت منحصر به فرد خود را دوباره به دست می‌آورند.

در مرحله اولیه یا نیمه جوانه‌زنی (Early/Mid-bud : E/MB Stage)، PGCها در مقایسه با سلول‌های سوماتیکی مجاورشان که

یک منشاء مشترک دارند، به ترتیب حدود ۵۰۰ ژن تخصصی شدن سلول‌های زاینده را، فرا تنظیم (Upregulate) و حدود ۳۰۰ ژن برنامه‌ی سوماتیکی را فرو تنظیم، می‌کنند. بر اساس تفسیر عملکردی ماهیت ژن [Gene Ontology]، ژن‌های Prdm1، Dppa3، Ifitm3، Dnd1 و Kit، ژن هایی هستند که در طی تکوین سلول‌های زاینده، در تخصصی شدن این سلول ها دخالت دارند (۱۵، ۱۶)، با این حال، گفته می‌شود که ژن های اختصاصی سلول‌های زاینده‌ی بدوی در برگیرنده‌ی مجموعه‌ی منحصر به فردی از ژن های اختصاصی شامل تنظیم کننده‌های رونویسی از قبیل Prdm1، Prdm14، Sox3، Tcfap2c، Elf3، Elk1، Isl2، Mycn، Klf2، Fiat، Sp8، Smad3، Sox2، Nanog، Zic3، Tcfe3، Epc1، Six4 و Eya3 هستند که برخی از این ژنها عملکردهای مهمی در تخصصی شدن PGCها دارند. علاوه بر ژن‌های مرتبط با الگوی تخصصی شدن و تکوین مزودرم، ژن‌های سوماتیکی از جمله بسیاری از ژن‌های مرتبط با چرخه‌ی سلولی، مانند فاکتورهای القاء کننده‌ی فاز سنتز DNA (مانند Ccne1، Ccnd1، Cdc25a، Cdc6، Pold2، E2F3 و Myc)، تنظیم کننده‌های متیلاسیون DNA (همانند دنوو DNA متیل ترانسفرازها همچون Dnmt3a و Dnmt3b) و نیز Uhrf1، که فاکتور ضروری برای از سرگیری Dnmt1 در جایگاه‌های رونویسی است، در تخصصی شدن PGCها شرکت دارند که نحوه‌ی عملکرد آنها هنوز ناشناخته باقی مانده است (۱۷، ۱۸).

تنظیم کننده‌های کلیدی در تخصصی شدن PGCها:

همان طور که اشاره شد، PRDM1 یکی از تنظیم کننده‌های اصلی برای تخصصی شدن PGCها می‌باشد(شکل ۲). در غیاب PRDM1، سلول‌های شبه-PGCی آلکالین فسفاتاز مثبت، تشکیل می‌شوند اما تعداد آنها کم بوده و همچنین مهاجرت رو به جلو به سمت اندودرم روده‌ی خلفی از خود نشان نمی‌دهند (۱۵، ۱۹). آنالیز ریز آرایه cDNAی تک-سلولی نشان می‌دهد که سلول‌های شبه-PGC که Prdm1 را ندارند، تقریبا در بیان بسیاری از ژن‌های سوماتیکی ناتوان هستند. در موش و رت، Prdm14 در مرحله‌ی مورولا، شروع به بیان می‌کند و بیان آن در سلول‌های توده داخلی (Inner Cell Mass :ICM)، ادامه می یابد اما این بیان گذرا بوده و به سرعت در حدود E۵ (رت: dpc ۶)، از بین می‌رود. متعاقبا بیان آن به طور اختصاصی در سلول‌های پیش ساز PGC در حدود E۶,۵ (رت: dpc ۷,۵)، از سر گرفته می‌شود و به طور اختصاصی در PGCها تا حدود E۱۳,۵ تا E۱۴,۵ (رت: dpc ۱۵,۵تا dpc ۱۶,۵)، هم در نرها و هم در ماده ها، ادامه پیدا می-کند. در مقایسه با Prdm1، بیان Prdm14 در هیچ سلول دیگری به غیر از PGCها، دیده نمی‌شود. در غیاب Prdm14، سلول‌های شبه-PGC، که آلکالین فسفاتاز مثبت هستند، تشکیل می‌شوند و ژن های HOX را سرکوب می‌کنند اما در فراتنظیم شدن ژن SOX2، ناتوان هستند و در مرحله اولیه یا نیمه جوانه‌زنی (E/MB)، به طور کامل به PGCهای بالغ تبدیل نمی‌شوند.

نکته مهم اینکه، بیان اولیه‌ی Prdm14 در PGCها مستقل از Prdm1 می‌باشد اما به دنبال آن حفظ و یا فراتنظیم شدن بیان آن، به شدت وابسته به Prdm1 می‌باشد (۲۰، ۲۱). بنابر این Prdm1 و Prdm14 دو تنظیم کننده‌ی اصلی رونویسی سازمان دهنده‌ی پیدایش دودمان سلول‌های زاینده در موش و رت هستند (شکل ۲).

فاکتور رونویسی TCFAP2C (AP2γ)، که یک عضو از پنج فاکتور رونویسی مرتبط با وضعیت پایه خاص دامین هلیکس- اسپن- هلیکس(helix-span-helix domain) می‌باشد (۲۲، ۲۳)، یکی دیگر از فاکتورهایی است که در تخصصی شدن PGCها، ایفای نقش می‌کند. به نظر می‌رسد TCFAP2C به صورت مادری بیان می‌شود و در تمامی سلول‌ها، حداقل تا مرحله-ی بلاستوسیست شناسایی شده است اما پس از این مرحله، بیان آن به اکتودرم خارج جنینی و PGCها، محدود می‌شود. با حذف اختصاصی Tcfap2c از اپی‌بلاست، معمولا سلول‌های شبه-PGC که آلکالین فسفاتاز مثبت هستند، تشکیل می‌شوند (مشابه فنوتیپی که در جنین های فاقد Prdm1 دیده می‌شود)، اما تعداد آنها به شدت در E۸ (رت: dpc ۱۰) کاهش می یابد و ویژگی مهاجرت رو به جلو به سمت اندودرم روده‌ی خلفی را از خود نشان نمی‌دهند. از آنجا که بیان Prdm1 پیش از بیان Tcfap2c می‌باشد و فقدان Prdm1 منجر به از بین رفتن فراتنظیم Tcfap2c می‌شود، در نتیجه Tcfap2c بایستی یک هدف اصلی پایین دست Prdm1، برای تخصصی شدن PGCها باشد (۲۶-۲۴) (شکل ۲).

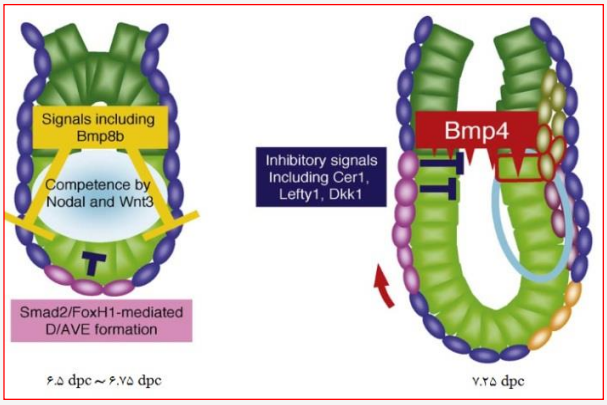
اخیرا پیشنهاد شده است که LIN28، به عنوان یک تنظیم کننده-ی بالا دست Prdm1، ایفای نقش می‌کند (۲۷). LIN28 پروتئینی است که پردازش و بلوغ اعضای خانواده‌ی میکرو RNAهای Let-

7 (Let-7 miRNA) را، سرکوب می‌کند (۲۸). وست و همکاران (۲۰۰۹)، نشان دادند که LIN28، یک تنظیم کننده‌ی ضروری جهت تخصصی شدن PGCها است که از طریق مهار بلوغ let-7 و در نتیجه القاء Prdm1، عمل می‌کند (شکل ۲). بیان دقیق LIN28 در اپی‌بلاست و مرحله‌ی اولیه‌ی تخصصی شدن PGCها و اینکه آیا واقعا LIN28 در تخصصی شدن PGCها در داخل بدن ضروری است یا نه، هنوز مشخص نمی‌باشد (۲۹).

علاوه بر فاکتورهای ذکر شده، تعدادی از ژن‌ها نیز شناسایی شده‌اند که در تکوین مرحله‌ی اولیه‌ی PGCها و بعد از اینکه PGCها تعیین سرنوشت شدند، ایفای نقش می‌کنند (۳۰). به عنوان مثال، نشان داده شده است که گیرنده‌ی تیروزین کینازی Kit و فاکتور سلول‌های بنیادی (Stem Cell Factor :SCF) متصل به آن، مهاجرت، تکثیر و یا زنده‌مانی PGCها را تنظیم می‌کنند (۳۳-۳۱)، که احتمالا این تنظیم از طریق مسیر پیام‌دهی AKT/MTOR/BAX، میانجی گری می‌شود (۳۴، ۳۵).

همچنین علاوه بر PRDM1، Prdm14، LIN28، Tcfap2c که نقش آن‌ها شرح داده شد، عوامل دیگری نیز در این فرآیند دخالت دارند. نشان داده شده است که جهش در پروتئین‌های متصل شونده به RNA مانند NANOS3، TIAL1 وDND1، منجر به از بین رفتن PGCها در اثر ناتوانی آنها در زنده‌مانی و یا تکثیر می‌شود. همچنین فاکتور القاء شونده‌ی هایپوکسی Hypoxia-2a) (Inducible Factor-2a، در تخصصی شدن PGCها و یا تکوین اولیه‌ی PGCها، نقش دارد که نحوه‌ی عملکرد آن احتمالا از طریق تنظیم بیان POU5F1 (Oct4)، می‌باشد. مکانیسم دقیق نقش این مولکول‌ها در PGCها و نحوه‌ی تنظیم آنها بوسیله ژن‌های کلیدی تخصصی شدن PGCها همانند Prdm1 و Prdm14، شناخته نشده است (۳۸-۳۶). این موضوع نیز از اهمیت خاصی برخوردار است که نقش ژن‌های کلیدی پرتوانی مثل POU5F1 (Oct4)، Sox2 و Nanog در تخصصی شدن PGCها، روشن شود، هرچند نشان داده شده است که POU5F1 (Oct4) و Nanog برای زنده‌مانی PGCها در مراحل تقریبا" پایانی بطور مثال حدود E۹،۵ (رت: dpc ۱۱،۵)، حیاتی است (۴۱-۳۹).

در تمامی موش هایی که ژن های BMP4 و BMP8b یا Smad1 جهش داشته‌اند، بیان Prdm1 و Prdm14 در اپی‌بلاست، به شدت سرکوب شده است که نشان می‌دهد پیام‌های BMP برای اولین مرحله‌ی تخصصی شدن PGCها، ضروری هستند (۳۰). همچنین در موش‌هایی که در آنها ژن های Smad2 یا FoxH1 جهش داشته است، تقریبا تمامی سلول‌های اپی‌بلاستی در نتیجه‌ی تشکیل ندادن اندودرم احشایی قدامی، سرنوشت خلفی را اتخاذ می‌کنند



شکل ۳) واکنش های پیام دهی که منجر به تخصصی شدن سلول‌های زاینده‌ی بدوی در جنین رت می‌شود: در حدود E۵،۵ (رت: dpc ۶،۵)، سلول‌های اپی‌بلاست در پاسخ به BMP4 از طریق فعالیت NODAL و WNT3، شایستگی خود را به دست می‌آورند. از سوی دیگر، پیام دهی NODAL میانجی گری شده از طریق SMAD2/FOXH1، سلول‌های اندودرم احشایی خلفی را تخصصی می سازد تا شروع به ایجاد پیام‌های مخالف خلفی شدن کنند. ظاهرا" پیام‌هایی همانند BMP8b از اکتودرم خارج جنینی، از تمایز پیدا کردن اندودرم احشایی نزدیک به اندودرم احشایی خلفی، جلوگیری به عمل می آورد، ، بنابر این محدود کننده‌ی فعالیت های مخالف خلفی شدن هستند. در حدود E۶ تا E۶،۲۵ (رت: dpc ۷ تا ۷،۲۵dpc)، اندودرم احشایی خلفی به سمت جلو کشیده می‌شود(فلش قرمز) تا اندودرم احشایی قدامی را تشکیل دهد و یک زیر مجموعه‌ی دارای صلاحیت، از سلول‌های اپی‌بلاست که سطوح بالایی از پیام‌های BMP را از اکتودرم خارج جنینی دریافت کرده اند، به عنوان پیش‌سازهای سلول‌های زاینده‌ی بدوی $Prdm1^{+}$ و $Prdm14^{+}$، تخصصی می‌شوند. احتمالا" صلاحیت سلول‌های زاینده در قسمت نزدیک (proximal part) سلول‌های اپی‌بلاست خلفی، تا حدود مرحله‌ی LS، حفظ می‌شود (۴۹).

که نشان می‌دهد این دو ژن در اتخاذ سرنوشت قدامی شدن اندودرم، شرکت دارند لذا هر مرکز پیام دهی که پیام‌های قدامی شدن و مخالف خلفی شدن، ارسال می‌کند (به عنوان مثال LEFTY1 مخالف NODAL، DKK1 مخالف WNT، Cerberus-like مخالف BMP)، بیان Prdm1 را در تمامی سلول‌هایی که در

تماس با اکتودروم خارج جنینی هستند و نیز آنهایی که خیلی دورتر واقع شده‌اند، افزایش می‌دهد (۴۲).

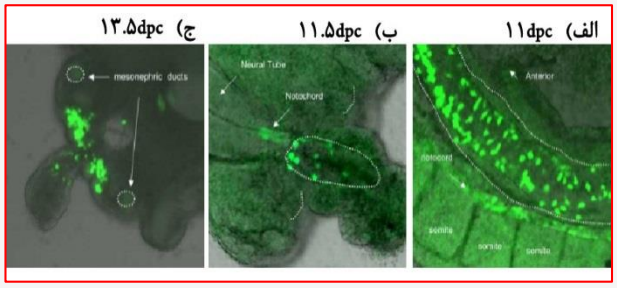
این به این معنی است که تمامی سلول‌های اپی‌بلاستی مرحله‌ی پیش از تشکیل شیار (pre-streak stage)، به محض دریافت پیام-های BMP از اکتودرم خارج جنینی، سرنوشت سلول‌های زاینده را پیش می گیرند. در اثبات این موضوع، کشت آزمایشگاهی اپی-بلاست نشان می‌دهد که در پاسخ به BMP4، اساسا تمامی سلول-های اپی‌بلاستی جدا شده از E۵,۵ تا E۶ (رت: ۶,۵ dpc تا dpc ۷)، شایستگی بیان Prdm1 و Prdm14 را دارند و سرنوشت سلول-های زاینده‌ی آلکالین فسفاتاز مثبت را، به دست می‌آورند. BMP4، بواسطه‌ی کمپلکس ALK3 (یا ALK6) و یکی از گیرنده های نوع دوم(به احتمال زیاد BMP2) از طریق SMAD1 و SMAD5، هم بیان Prdm1 و هم Prdm14 را در اپی‌بلاست، القاء می‌کند.

علاوه بر این، BMP2 نیز اگر چه با بازدهی کمتر نسبت به BMP4، بیان Prdm1 و Prdm14 را در اپی‌بلاست، افزایش می-دهد. قابل ذکر است BMP8b، به طور مستقیم بیان Prdm1 و Prdm14 را در اپی‌بلاست القاء نمی‌کند بلکه تکوین اندودرم احشایی قدامی (Anterior Visceral Endoderm :AVE) را تا یک سطح نسبتا مناسب، کنترل می‌کند. در موش هایی که BMP8b جهش یافته است، اندودرم احشایی قدامی بزرگ شده و مقادیری اضافی از پیام‌های قدامی شدن ارسال می‌کند که پیام دهی BMP4 را مهار می‌کند. این یافته‌ها نشان می‌دهند که در طول گاسترولاسیون اولیه، سه مولکول BMP شامل BMP4، BMP8b و BMP2، با یک سطح کافی از پیام دهی BMP-SMAD، جهت تخصیص دادن نزدیکترین سلول‌های اپی‌بلاست خلفی، برای اتخاذ سرنوشت به سلول زاینده، با یکدیگر همکاری می‌کنند (شکل ۳). لوپز و همکاران (۲۰۰۴)، نشان داده اند که پیام دهی BMP4 از طرف اندودرم احشایی به طور غیر مستقیم، برای تخصصی شدن PGCها ضروری می‌باشد (۴۳). اما مطالعات اوهیناتا و همکاران (۲۰۰۹) با رد این موضوع اثبات کرد که پیام‌های BMP4، به طور مستقیم بر سلول‌های اپی‌بلاست اثر می‌گذارد. همچنین باید توجه داشت که سلول‌های اپی بلاست فقط از E۵,۵ تا E۶,۲۵ (رت: ۶,۵dpc تا۷,۲۵dpc)، صلاحیت بیان Prdm1 و Prdm14 را دارند و متعاقب آن در پاسخ به BMP4، سرنوشت سلول‌های زاینده‌ی آلکالین فسفاتاز مثبت را اتخاذ می‌کنند. سلول‌های اپی‌بلاست در E۵,۲۵ (رت: ۶,۲۵ dpc)، نه بیان Prdm1 و نه آلکالین فسفاتاز نشان می‌دهند در حالی که این سلول ها بعد از E۶,۵ (رت: dpc ۷,۵)، بیان Prdm1 را دارند ولی در پاسخ به BMP4، بیان آلکالین فسفاتاز و Dppa3 خود را از دست می‌دهند که نشان می‌دهد سلول‌های اپی بلاست در یک رفتار تکاملی وابسته به مراحل مختلف، پاسخ خود را به BMP4، تغییر می‌دهند (۴۴). قابل ذکر است، WNT3 که در حدود E۵,۵ (رت: ۶,۵ dpc)، شروع به بیان می‌کند، فاکتوری است که قابلیت پاسخگویی BMP4 به اپی-بلاست را، فرآهم می آورد، هر چند زیر ساخت‌های به دست آوردن این "صلاحیت" و اینکه چگونه WNT3 می‌تواند این امکان را برای BMP4 فرآهم سازد، نیاز به بررسی و شفاف سازی بیشتر دارد. به عبارت دیگر، این حقیقت وجود دارد که سلول‌های اپی‌بلاست در پاسخ به BMP4 در E۶,۵ (رت: ۷,۵ dpc)، Prdm1 را بیان می-کنند اما بیان آلکالین فسفاتاز و Dppa3 را، نشان نمی‌دهند و این بدین معنی است که Prdm1 به تنهایی جهت ایجاد سرنوشت سلول‌های زاینده، کافی نیست (۴۷، ۴۸). بر این اساس نشان داده شده است که تحت شرایط تعریف شده، بویژه در حضور BMP4، اکثر سلول‌های مستعد اپی‌بلاست، بعد از ۸۴ تا ۱۳۲ ساعت از کشت، به سلول‌های شبه-PGCی پیش میوزی، تکامل می‌یابند. سلول‌های شبه-PGCی القاء شده، نه تنها بیان ژنی مناسبی از مارکرهای دودمان زایا دارند بلکه ویژگی برنامه نویسی اپی ژنتیکی، شامل کاهش گسترده‌ی ژنومی H3K9me2، فراتنظیم H3K27me3 و پاک شدن ایمپرینت های ژنومی (یک ویژگی منحصر به فرد سلول‌های زاینده‌ی بدوی)، را نیز در طی ۳۲ ساعت بعد از کشت، نشان می‌دهند (۴۴).

مهاجرت، تکثیر و یافتن مقصد سلول‌های زاینده‌ی بدوی در رت: دسته ای از سلول ها که می‌توانند PGCها را ایجاد کنند، Fragilis را، بیان می‌کنند. Fragilis، عضوی از خانواده ژنی القاء شونده توسط اینترفرون می‌باشد و ژنی است که پروتئین خلال غشایی ویژه‌ای را رمز می‌کند که در کنترل چرخه‌ی سلولی و اتصالات همجنس(Homotypic) سلول به سلول، دخالت دارد. در موش Fragilis در حدود E۷,۲۵ (رت: dpc ۸,۲۵)، در اپی‌بلاست خلفی (Posterior epiblast) بیان می‌شود که بیشترین بیان آن با

محلی که PGCها در آن ناحیه تشکیل می‌شوند، همپوشانی دارد. ۲۴ ساعت بعد، بیان Fragilis فرو تنظیم شده و PGCها به سمت اندودرم حرکت می‌کنند. PGCها در لوله گوارش خلفی محصور می‌شوند اما آزادانه در اطراف سلول‌های اپیتلیوم لوله گوارش خلفی، حرکت می‌کنند. در این زمان (۱۱ dpc)، می‌توان PGCهای رت را، در حال حرکت در بین و اطراف سلول‌های اپیتلیوم لوله گوارش خلفی یافت. به نظر می‌رسد که جنبش PGCها در این مرحله نسبت به محورهای بدنی تصادفی باشد (شکل ۴، الف). بین E۹ تا E۹,۵ (رت: بین ۱۱dpc تا ۱۱/۵ dpc)، PGCها از بخش پشتی لوله گوارش خلفی، خارج شده و به صورت جانبی مهاجرت می‌کنند (شکل ۴، الف) تا خود را به برآمدگی‌های تناسلی (شکل ۴، ب)، برسانند. برخی PGCها در آلانتوئیس باقی می‌مانند که سرنوشت این سلول ها نامشخص است.

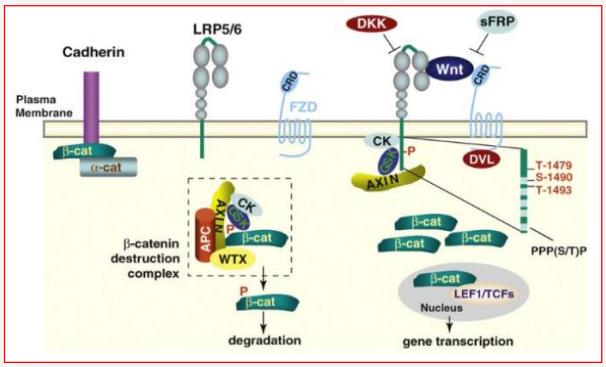
در E۱۰,۵ (رت: ۱۲,۵ dpc)، PGC ها رفته رفته به صورت دسته-هایی تجمع یافته و شبکه‌ای از سلول‌های در حال مهاجرت را بوجود می‌آورند و حرکت آنها، کند می‌شود. PGCهایی که در ساختارهای خط میانی باقی می‌مانند، قطعه قطعه شده و می میرند. در E۱۱,۵ (رت: ۱۳,۵ dpc)، اغلب PGCها برآمدگی تناسلی را کلون‌زایی کرده‌اند. کل فرآیند مهاجرت در رت، حدود ۵ روز (۸,۵ dpc تا ۱۳,۵ dpc)، به طول می‌انجامد (شکل ۴، ج).



شکل ۴) مهاجرت سلول‌های زاینده‌ی بدوی در رت. الف) مهاجرت سلول-های زاینده‌ی بدوی در اندودم روده‌ی خلفی در dpc ۱۱ **ب)** رسیدن PGCها به برآمدگی‌های تناسلی در dpc ۱۱,۵ **ج)** کلون زایی کردن این ناحیه در dpc ۱۳,۵

تکثیر PGCها طی مهاجرت به وسیله‌ی عامل پاراکرین Fgf7 و SCF، تحریک می‌شود. افزودن این دو عامل پاراکرین، سبب تکثیر PGCها شده در حالی که مهار هر یک، موجب مرگ آپوپتوتیک PGCها می‌شود (۵۱). SCF توسط سلول‌هایی که مسیر مهاجرت را مفروش می‌کنند، تولید شده و به غشاء سلولی آنها متصل باقی می‌ماند. به نظر می‌رسد که حضور SCF روی غشای سلول، برای فعال شدن این فاکتور لازم است. در موش‌هایی که ژن‌های SCF یا گیرنده آن c-Kit، به صورت هموزیگوت جهش یافته، سلول‌های جنسی نقص دارند (۵۲، ۵۳).

مسیر پیام دهی Wnt/β-catenin و نقش آن در القاء پرتوانی: مسیر پیام‌دهی Wnt شامل دو مسیر مرکزی(Canonical) و غیر مرکزی(None-cannonical) است و اعتقاد بر این است که مسیر مرکزی نقش مهمتری در حفظ پرتوانی و خودنوزایی دارد و اکثر مطالعات انجام شده در این زمینه روی مسیر مرکزی، تمرکز دارند. یکی از مهمترین مولکول‌های مسیر مرکزی، گلیکوژن‌سنتاز کیناز ۳(GSK3: Glycogen Synthase kinase 3) می‌باشد (شکل ۵).



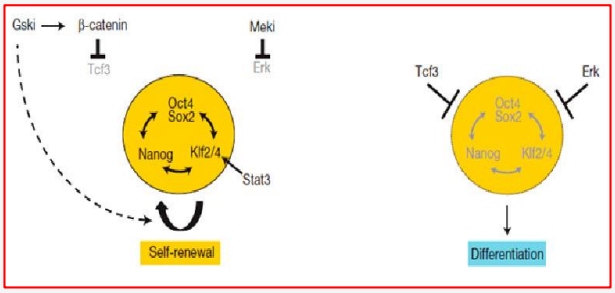
شکل ۵) تصویر شماتیک ساده ای از مسیر مرکزی Wnt و نحوه ی فعال شدن آن

در غیاب Wnt، پروتئین سیتوپلاسمی β-catenin با یک کمپلکس دارای انواع مختلف پروتئین‌ها، شامل اکسین (Axin)، GSK3 و APC (Adeomatosis polyposis coli)، همراه می-شود (۵۴). با پیوند شدن به این کمپلکس، β-catenin فسفریله و به دنبال آن یوبی کوئیتینه می گردد و به این ترتیب برای تجزیه شدن در پروتئازوم، نشان‌دار می‌گردد. اما در حضور Wnt، در اثر پیوند شدن Wnt به گیرنده‌ی سطحی‌اش به نام frizzled، پروتئینی به نام Dishevlled، فعال می‌شود. فعال شدن Dishevlled، موجب مهار کمپلکس تخریبی می‌شود، در نتیجه β-catenin در سیتوپلاسم انباشته شده و وارد هسته می-شود. β-catenin در هسته به عنوان یک کمک فعال کننده‌ی رونویسی، عمل کرده و موجب رونویسی ژن‌های هدف، مانند ژن-های کنترل کننده‌ی چرخه‌ی سلول و ژن‌های پرتوانی می‌شود.

ژنهای هدف Wnt، شامل cyclin D1 و c-myc هستند که در حفظ خودنوزایی سلول‌ها، نقش دارند (۵۷-۵۵). بررسی‌ها نشان می‌دهد که مهار GSK3، باعث افزایش بیان C-myc (یکی از ژن‌های دخیل در پرتوانی) می‌شود، چون در حالت عادی GSK3 با هدف قرار دادن ۵۸ ایمن رزیدوی ترئونین در C-myc، باعث تخریب C-myc می‌شود در نتیجه مهار GSK3 باعث برداشتن این اثر تخریبی روی C-myc می‌شود (۵۸).

بر اساس نتایج حاصل از مطالعات قبلی، برای حفظ پرتوانی در سلول‌های بنیادی جنینی (Embryonic Stem Cells: ESC)، بایستی مسیر پیام‌دهی Wnt/β-catenin، فعال باشد. اولین بار ساتو و همکاران (۲۰۰۴)، نشان دادند که مسیر Wnt یکی از مسیرهای مهم در حفظ پرتوانی سلول‌های بنیادی جنینی موشی (Mouse Embryonic Stem Cells :mESC)، است. آنها از ریز مولکول BIO، به عنوان یک ریز مولکول مهارکننده‌ی GSK3 و فعال کننده‌ی مسیر Wnt، استفاده کردند و با اندازه‌گیری میزان β-catenin در سلول‌های تیمار شده با BIO، نشان دادند که افزایش میزان β-catenin، می‌تواند مسیر Wnt را در سلول‌ها، فعال کند و توانستند به واسطه‌ی BIO، وضعیت تمایز نیافته‌ای برای ESCها، در شرایط بدون سرم، ارائه کنند. همچنین این محققین، با توجه به افزایش بیان ژن‌های Rex-1، Nanog و Oct4، بیان کردند که مسیر Wnt، بیان ژن‌های کنترل کننده‌ی پرتوانی را، تنظیم می‌کند (۵۸). در تایید این گزارشات، کلی و همکارن (۲۰۱۱)، نشان دادند که مهار GSK3 و فعال سازی مسیر Wnt، از طریق افزایش β-catenin، باعث حفظ پرتوانی می‌شود. این گروه بیان کردند که β-catenin به عنوان اولین سوبسترای GSK3، عملکردهای متفاوتی دارد و در صورت همکاری با فاکتور TCF/LEF، باعث تمایز می‌شود. اما عملکردی که در حفظ پرتوانی دارد مستقل از TCF است. بدین ترتیب که در اثر بر هم کنش β-catenin با Oct4، برخی از ژنهای هدف Oct4 از جمله Nanog، فعال شده و باعث حفظ پرتوانی می‌شود (۶۰).

ریز مولکول‌های BIO، CHIR99021، CT 99021، AR-A0-144-18، SB 216763، SB415286، Alsterpaullone، kenpaullone و LiCl، مهارکننده‌های اصلی GSK3 هستند که باعث حفظ پرتوانی سلول‌های بنیادی جنینی می‌شوند و چون این مهارکننده‌ها باعث افزایش β-catenin می‌شوند، پس در واقع این مسیر مرکزی Wnt است که باعث خودنوزایی و حفظ پرتوانی می‌شود (۶۳-۶۱). این مهارکننده‌ها در مقیاس نانو مولار، می‌توانند سبب مهار GSK3 شوند و در حال حاضر به عنوان نوعی از ترکیبات با عملکرد دارویی جهت استفاده در درمان دیابت، سکته‌های قلبی، آلزایمر و سایر بیماریها، شناخته شده‌اند (۶۴).



شکل ۶) اثر مهارکننده‌ی GSK3. در حضور مهار کننده ی GSK3، افزایش β-catenin منجر به فعال شدن مسیرهای پیام دهی Wnt/β-catenin و خود نوزایی سلول‌های بنیادی می‌شود در صورتیکه در غیاب مهارکننده‌ی GSK3، TCF به همراه مسیر پیام دهی ERK، سبب تمایز می‌شود.

باز برنامه نویسی سلول‌های زاینده‌ی بدوی رت به سلول-های زاینده‌ی جنینی: سلول‌های زاینده‌ی جنینی (Embryonic Germ Cells: EGCs) منبع دیگری از سلول‌های بنیادی هستند که قادرند همانند سلول‌های ES به دودمان‌های سه لایه‌ی زاینده-ی جنینی تمایز یابند. اعتقاد بر این است که EGCها به دلیل دارا بودن ویژگی حالت ناپایدار(Metastable)، ممکن است انعطاف بیشتری نسبت به سلول‌های ES در تمایز به رده های سه لایه‌ی زاینده‌ی جنینی داشته باشند که این ویژگی منحصر به فرد اهمیت استخراج آن‌ها را روشن می‌سازد.

سوالی که برای برخی صاحب‌نظران مطرح است این است که آیا ممکن است در برخی گونه‌ها، سلول‌های EGCs به عنوان یک منبع کاملا مهار شدنی نسبت به اپی‌بلاست، جهت به دام انداختن سلول‌های بنیادی پرتوان بکر (Naïve pluripotent stem cells)، باشند (۶۵). تنها راه پاسخ به این سوال، استخراج سلول‌های EGCs و مقایسه‌ی توان تمایزی این سلول‌ها نسبت به سایر سلول-های پرتوان است که لازمه‌ی رسیدن به این مهم، آگاهی از مسیرهای پیام‌دهی است که سلول‌های زاینده از طریق آن‌ها با یکدیگر و سلول‌های اطراف خود، در ارتباط هستند. در سالهای

اخیر، استفاده از ریز مولکول ها کمک قابل توجهی در شناسایی مسیرهای پیام‌دهی سلولی کرده است. ییننگ و همکاران(۲۰۰۸)، با استفاده از ریزمولکول CHIR99021 (مهارکننده ی GSK3) و PD0325901 (مهارکننده‌ی مسیر پیام دهی MAPK)، نشان دادند که فعال کردن مسیر Wnt با مهار GSK3 و مهار همزمان مسیر MAPK، می‌تواند بدون حضور LIF (Leukemia Inhibitory Factor)، سلول‌های mESC را به مدت طولانی، بصورت پرتوان حفظ کند(۶۷). همچنین للیوس و همکاران(۲۰۰۸)، نشان دادند که مسیر Wnt، در باز برنامه نویسی سلول‌های سوماتیک و تولید iPS (Induced Pluripotent Stem Cells) نقش موثری دارد (۶۶).

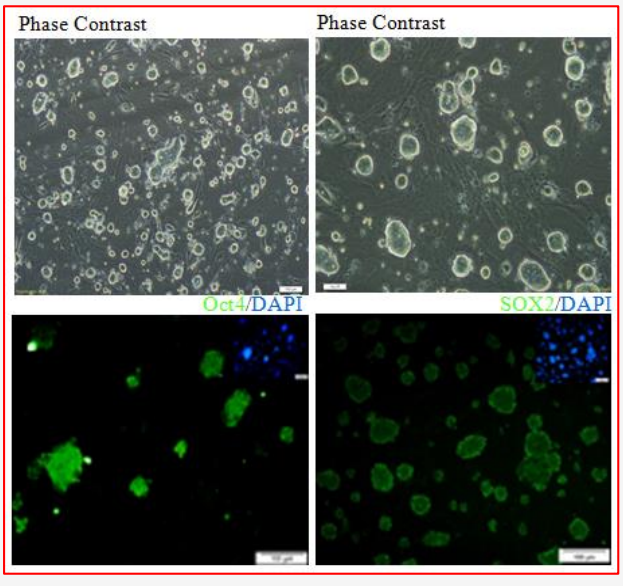
در سال ۱۹۹۲ گروهی از محققین توانستند برای اولین بار سلول-های EG را از موش‌های حاصل از تلاقی ماده‌های نژاد ICR × نرهای نسل اول تلاقی C57BU6×DBA، استحصال نمایند. آن‌ها PGCهای موش‌هایdpc ۸،۵ و dpc ۱۱،۵ را، بر روی لایه تغذیه کننده SI/SI^4 یا SI-m220، درحضور فاکتورهای رشد LIF، bFGF و SCF کشت دادند. شایان ذکر است که لایه تغذیه کننده SI-m220، خود مترشح کننده‌ی فاکتور رشد سلول بنیادی (SCF) است که نقش بسیار موثری بویژه در ۲۴ ساعت اولیه کشت در ظهورکلونی‌های EG دارد و در صورت استفاده از این لایه‌ی تغذیه کننده، راندمان تولید کلونی‌های EG افزایش می‌یابد. این گروه نشان دادند که در حضور فاکتورهای رشد مذکور می‌توان کلونی‌های EG را ۶ تا ۷ روز بعد از کشت مشاهده کرد. آن‌ها همچنین PGCها را در بستری از سلول‌های تغذیه کننده STO که همانند SI-m220 ترشح کننده‌ی SCF هستند، کشت دادند و نتایج یکسانی به دست آوردند. رده‌های EG حاصل به موش‌های Nude تزریق شدند و توانایی ایجاد تومور در آن‌ها به اثبات رسید. همچنین جهت تمایز EGها از روش تشکیل اجسام شبه جنینی (Embryoid Bodies: EBs) و تمایز خود به خودی (spontaneous differentiation) استفاده کردند و توان تمایزی رده‌های حاصل نیز نشان داده شد (۶۸).

در همان سال رسنیک و همکاران، توانستند کار گروه قبلی را در موش‌های نژاد B6C3F1 بر روی بستری از سلول‌های تغذیه کننده‌ی STO انجام داده و تایید کنند (۶۹). دو سال بعد تولید سلول‌های EG در موش‌های نژاد C57BL/6 گزارش شد (۷۰).

تاکنون تولید سلول‌های EG، در موش (۷۴-۶۸)، خوک (۷۵)، جوجه (۷۶)، اردک (۷۷)، بز (۷۸) و به طور ناموفقی در انسان (۷۹)، گزارش شده است.

اما تا سال ۲۰۰۸، رت به عنوان یک حیوان غیر اجازه دهنده (Non Permissive Animal)، قلمداد می‌شد (حیواناتی که گرفتن رده‌ی سلولی از آنها مقدور نمی‌باشد)، به طوری که تا قبل از آن، سلول-های بنیادی جنینی (ESC) آن نیز، جداسازی نشده بود تا اینکه در همان سال دو گروه توانستند برای اولین بار سلول‌های ES رت را استخراج کنند (۸۰، ۸۱).

همچنین با توجه به این ویژگی رت، تا سال ۲۰۱۰ گزارشی مبنی بر استخراج سلول‌های زاینده‌ی جنینی از PGCهای رت ارائه نشده بود. لیچ و همکاران (۲۰۱۰) توانستند برای اولین بار سلول-های EGC را از رت‌های نژاد اسپراگ، استحصال نمایند (۶۵). گروه اخیر تا سال ۲۰۱۳، تنها گروهی است که توانسته است استخراج سلول‌های EGC را از رت گزارش نماید. در این راستا، محمدی و همکاران(۲۰۱۳)، توانستند به ترتیب با مهار GSK3 و فعال کردن مسیر پیام‌دهی Wnt با ریز مولکول CHIR99021 و مهار مسیر پیام دهی MAPK با ریزمولکول PD0325901، به



شکل ۷) سلول‌های زاینده‌ی جنینی رت. بالا: تصویر فاز کنتراست از سلول-های EGCی رت های نژاد ویستار. **پایین:** رنگ آمیزی ایمونو هیستوشیمی علیه دو مارکر پرتوانی Oct4(چپ) و SOX2 (راست) (محمدی و همکاران، گزارش منتشر نشده).

عنوان دومین گزارش موجود، سلول‌های EGC را از رت‌های نژاد ویستار، استخراج کنند (شکل ۷) (گزارش منتشر نشده).

نتیجه گیری

با وجود محدودیت های اخلاقی در استخراج سلول‌های زاینده‌ی جنینی از PGCهای انسان، با توجه به تشابه زیاد فیزیولوژیک و فارماکولوژیک بین رت و انسان، امیدها بر این است تا با استخراج سلول‌های EGC انسانی، منبع ارزشمندی از سلول‌های بنیادی پرتوان که قابلیت تمایز به انواع رده‌های سه لایه‌ی جنینی را دارا باشند، به دست آید تا بتوان در طب ترمیمی از آنها استفاده کرد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله مراتب قدردانی خود را از حمایت‌های بی دریغ دانشگاه آزاد علوم و تحقیقات تهران و پژوهشگاه رویان در استنتاج این گزارش، اعلام می دارند.

References

1. Bowles J, Koopman P. Retinoic acid, meiosis and germ cell fate in mammals. Development. 2007;134(19):3401–3411.
2. Lawson KA, Hage WJ. 1994 Clonal analysis of the origin of primordial germ cells in the mouse. Ciba Foundation Symposia. 1994;182(1):68–84.
3. Ying Y, Liu XM, Marble A, Lawson KA, Zhao GQ. Requirement of Bmp8b for the generation of primordial germ cells in the mouse. Mol Endocrinol. 2000;14(7):1053-1063.
4. Extavour CG, Akam M. Mechanisms of germ cell specification across the metazoans: epigenesis and preformation. Development. 2003;130(24):5869–5884.
5. Seydoux G, Braun RE. Pathway to totipotency: lessons from germ cells. Cell. 2006;127(5):891–904.
6. Ginsburg M, Snow MH, McLaren A. Primordial germ cells in the mouse embryo during gastrulation. Development. 1990;110(2):521–528.
7. Lawson KA. Fate mapping the mouse embryo. Int J Dev Biol. 1999;43(7):773-5.
8. Loebel DA, Watson CM, De Young RA, Tam PP. Lineage choice and differentiation in mouse embryos and embryonic stem cells. Dev Biol. 2003;264(1):1–14.
9. Baughman JM, Geijsen N. In Vitro Generation of Germ Cells New Techniques to Solve Current Issues. Ann NY ACAD SCI. 2005;1061(Dec): 33-40.
10. Tam PP, Zhou SX. The Allocation of Epiblast Cells to Ectodermal and Germ-Line Lineages Is Influenced by the Position of the Cells in the Gastrulating Mouse Embryo. Dev Biol. 1996;178(1):124–132.
11. Ying Y, Qi X, Zhao GQ. Induction of primordial germ cells from murine epiblasts by synergistic action of BMP4 and BMP8B signaling pathways. Proc. Natl Acad Sci. 2001;98(14): 7858-7862.
12. Saitou M, Barton SC, Surani MA. A molecular programme for the specification of germ cell fate in mice. Nature. 2002;418(6895):293–300.
13. Calame KL, Lin KI, Tunyaplin C. Regulatory mechanisms that determine the development and function of plasma cells. Annual Review of Immunology. 2003;21(19):205–230.
14. Ohinata Y, Payer B, O'Carroll D, Ancelin K, Ono Y, Sano M, et al. Blimp1 is a critical determinant of the germ cell lineage in mice. Nature. 2005;436(7048):207–213.
15. Kurimoto K, Yabuta Y, Ohinata Y, Shigeta M, Yamanaka K, Saitou M. Complex genome-wide transcription dynamics orchestrated by Blimp1for the specification of the germ cell lineage in mice. Genes and Development. 2008;22(12):1617–1635.
16. Yabuta Y, Kurimoto K, Ohinata Y, Seki Y, Saitou M. Gene expression dynamics during germline specification inmice identified by quantitative single-cell gene expression profiling. Biology of Reproduction. 2006;75(5):705–716.
17. Bostick M, Kim JK, Esteve PO, Clark A, Pradhan S, Jacobsen SE. UHRF1 plays a role in maintaining DNA methylation in mammalian. cells Science. 2007;317(5845):1760–1764.
18. Sharif J, Muto M, Takebayashi S, Suetake I, Iwamatsu A, Endo TA, et al. The SRA protein Np95 mediates epigenetic inheritance by recruiting Dnmt1 to methylated DNA. Nature. 2007;450(7171):908–912.
19. Vincent SD, Dunn NR, Sciammas R, Shapiro-Shalef M, Davis MM, Calame K, et al. The zinc finger transcriptional repressor Blimp1/Prdm1 is dispensable for early axis formation but is required for specification of primordial germ cells in the mouse. Development. 2005;132(6):1315–1325.

20. Niwa H. How is pluripotency determined and maintained. Development. 2007;134(4):635–646.
21. Yamaji M, Seki Y, Kurimoto K, Yabuta Y, Yuasa M, Shigeta M, et al. Critical function of Prdm14 for the establishment of the germ cell lineage in mice. Nature Genetics. 2008;40(8):1016–1022.
22. Eckert D, Buhl S, Weber S, Jager R, Schorle H. The AP-2 family of transcription factors. Genome Biology. 2005;6(13):246.
23. Saitou M. Germ cell specification in mice. Current Opinion in Genetics & Development. 2009;19(4):386–395.
24. Auman HJ, Nottoli T, Lakiza O, Winger Q, Donaldson S, Williams T. Transcription factor AP-2gamma is essential in the extra-embryonic lineages for early postimplantation development. Development. 2002;129(11): 2733–2747.
25. Weber S, Eckert D, Nettersheim D, Gillis AJ, Schafer S, Kuckenberg P, et al. Critical function of AP-2 gamma/TCFAP2C in mouse embryonic germ cell maintenance. Biology of Reproduction. 2010;82(1):214–223.
26. Werling U, Schorle H. Transcription factor gene AP-2 gamma essential for early murine development. Molecular and Cellular Biology. 2002;22(9): 3149–3156.
27. West JA, Viswanathan SR, Yabuuchi A, Cunniff K, Takeuchi A, Park IH, et al. A role for Lin28 in primordial germ-cell development and germ-cell malignancy. Nature. 2009;460(3):909–913.
28. Bussing I, Slack FJ, Grosshans H. let-7 microRNAs in development, stem cells and cancer. Trends in Molecular Medicine. 2008;14(9):400–409.
29. Yeom YI, Fuhrmann G, Ovitt CE, Brehm A, Ohbo K, Gross M, et al. Germline regulatory element of Oct-4 specific for the totipotent cycle of embryonal cells. Development. 1996;122(3): 881–894.
30. Saitou M. Specification of the germ cell lineage in mice. Frontiers in Bioscience. 2009b;14(1):1068–1087.
31. Buehr M, McLaren A, Bartley A, Darling S. Proliferation and migration of primordial germ cells in We/We mouse embryos. Developmental Dynamics. 1993;198(3):182–189.
32. Gu Y, Runyan C, Shoemaker A, Surani A, Wylie C. Steel factor controls primordial germ cell survival and motility from the time of their specification in the allantois, and provides a continuous niche throughout their migration. Development. 2009;136(8): 1295–1303.
33. McCoshen JA, McCallion DJ. A study of the primordial germ cells during their migratory phase in Steel mutant mice. Experientia. 1975;31(5): 589–590.
34. De Miguel MP, Cheng L, Holland EC, Federspiel MJ, Donovan PJ. Dissection of the c-Kit signaling pathway in mouse primordial germ cells by retroviral-mediated gene transfer. PNAS. 2002;99(16):10458–10463.
35. Runyan C, Schaible K, Molyneaux K, Wang Z, Levin L, Wylie C. Steel factor controls midline cell death of primordial germ cells and is essential for their normal proliferation and migration. Development. 2006;133(24):4861–4869.
36. Beck AR, Miller IJ, Anderson P, Streuli M. RNA-binding protein TIAR is essential for primordial germ cell development. PNAS. 1998; 95(5):2331–2336.
37. Covello KL, Kehler J, Yu H, Gordan JD, Arsham AM, Hu CJ, et al. HIF-2alpha regulates Oct-4: effects of hypoxia on stem cell function, embryonic development, and tumor growth. Genes and Development. 2006;20(5):557–570.
38. Youngren KK, Coveney D, Peng X, Bhattacharya C, Schmidt LS, Nickerson ML, et al. The Ter mutation in the dead end gene causes germ cell loss and testicular germ cell tumours. Nature. 2005; 435(7040):360–364.
39. Chambers I, Silva J, Colby D, Nichols J, Nijmeijer B, Robertson M, et al. Nanog safeguards pluripotency and mediates germline development. Nature. 2007:450(7173): 1230–1234.
40. Okamura D, Tokitake Y, Niwa H, Matsui Y. Requirement of Oct3/4 function for germ cell specification. Developmental Biology. 2008;317(2): 576–584.
41. Yamaguchi S, Kurimoto K, Yabuta Y, Sasaki H, Nakatsuji N, Saitou M, et al. Conditional knockdown of Nanog induces apoptotic cell death in mouse migrating primordial germ cells. Development. 2009;136(23):4011–4020.
42. Arnold SJ, Robertson EJ. Making a commitment: cell lineage allocation and axis patterning in the early mouse embryo. Nature Reviews. Molecular Cell Biology. 2009;10(2):91–103.
43. De Sousa Lopes S.M, Roelen BA, Monteiro RM, Emmens R, Lin HY, Li E, et al., BMP signaling mediated by ALK2 in the visceral endoderm is necessary for the generation of primordial germ cells in the mouse embryo. Genes Dev. 2004. 18(15):1838-49.
44. Ohinata Y, Ohta H, Shigeta M, Yamanaka K, Wakayama T, Saitou M. A signaling principle for the specification of the germ cell lineage in mice. Cell. 2009;137(3):571–584.
45. Saitou M, Yamaji M. Germ cell specification in mice: signaling, transcription regulation, and epigenetic consequences. Reproduction. 2010;139(6): 931–942.
46. Tam PPL, Loebel DAF. Specifying Mouse embryonic Germ cells. Cell. 2009;137(3):398-400.
47. Kemp C, Willems E, Abdo S, Lambiv L, Leyns L. Expression of all Wnt genes and their secreted antagonists during mouse blastocyst and postimplantation development. Developmental Dynamics. 2005;233(3): 1064–1075.

48. Liu P, Wakamiya M, Shea MJ, Albrecht U, Behringer RR, Bradley A. Nature Genetics. 1999;22(4):361–365.
49. Saitou M. Germ cell specification in mice. Cur Opin Gen Dev. 2009;19(4):386–395.
50. Hill MA. Primordial Germ Cell Migration Movie. Retrieved August 15, 2013, from http://php.med. unsw. edu.au/embryology/index.php? title=Primordial Germ Cell Migration_Movie.
51. Godin I, Deed R, Cooke J, Zsebo K, Dexter M, Wylie CC. Effects of the steel gene product on mouse primordial germ cells in culture. Nature. 1991;352(6338):807–809.
52. Ginsburg M, Eyal-Giladi H. Primordial germ cells of the young chick blastoderm originate from the central zone of the area pellucida irrespective of the embryo-forming process. Development. 1987;101(2):209-219.
53. Matsui Y, Toksoz D, Nishikawa S, Williams D, Zsebo K, Hogan BL. Effect of Steel factor and leukaemia inhibitory factor on murine primordial germ cells in culture. Nature. 1991;353(6346):750–752.
54. Stewart R, Stojkovic M, Lako M. Mechanisms of self-renewal in human embryonic stem cells. Eur J Cancer. 2006;42(9):1257-72.
55. Katoh M. WNT signaling pathway and stem cell signaling network. Clin Cancer Res. 2007; 13(14): 4042-5.
56. Nusser R, Fuerer C, Ching W, Harnish K, Logan C, Zeng A, et al. Wnt signaling and stem cell control. Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 2008;73(21):59-66.
57. Pera MF, Tam PP. Extrinsic regulation of pluripotent stem cells. Nature. 2010;465(7299):713-20.
58. Sato N, Meijer L, Skaltsounis L, Greengard P, Brivanlou AH. Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor. Nat Med. 2004;10(1):55-63.
59. Wu D, Pan W. GSK3: a multifaceted kinase in Wnt Signaling. Trends Biochem Sci. 2010;35(3): 161-168.
60. Kelly KF, Ng DY, Jayakumaran G, Wood GA, Koide H, Doble BW. beta-catenin enhances Oct-4 activity and reinforces pluripotency through a TCF-independent mechanism. Cell Stem Cell. 2011;8(2): 214-27.
61. Bain G, Ray WJ, Yao M, Gottlieb DI. Retinoic acid promotes neural and represses mesodermal gene expression in mouse embryonic stem cells in culture. Biochem Biophys Res Commun. 1996;223(3):691-4.
62. Kleber M, Sommer L. Wnt signaling and the regulation of stem cell function. Curr Opin Cell Biol. 2004;16(6):681-7.
63. Smith A. Pluripotent stem cells: private obsession and public expectation. EMBO Mol Med. 2010;2(4): 113-6.
64. Cohen P, Goedert M. GSK3 inhibitors: development and therapeutic potential. Nat Rev Drug Discov. 2004;3(6):479–487.
65. Leitch H, Blair K, Mansfield W, Ayetey H, Humphreys P, Nichols J, et al. Embryonic germ cells from mice and rats exhibit properties consistent with a generic pluripotent ground state. Development. 2010;137(14): 2279-2287.
66. Lluis F, Pedone E, Pepe S, Cosma MP. Periodic activation of Wnt/beta-catenin signaling enhances somatic cell reprogramming mediated by cell fusion. Cell Stem Cell. 2008;3(5):493-507.
67. Ying QL, Wary J, Nichols J, Batllemorera L, Doble B, Woodgett J, et al. The ground state of embryonic stem cell self-renewal. Nature. 2008; 453 (7194):519-23.
68. Matsui Y, Zsebo K, Hogan BL. Derivation of pluripotential embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture. Cell. 1992;70(5): 841-847.
69. Resnick JL, Bixler LS, Cheng L, Donovan PJ. Long-term proliferation of mouse primordial germ cells in culture. Nature. 1992; 359(6395): 550-1.
70. Labosky PA, Barlow DP, Hogan BL, Mouse embryonic germ (EG) cell lines: transmission through the germline and differences in the methylation imprint of insulin-like growth factor 2 receptor (Igf2r) gene compared with embryonic stem (ES) cell lines. Development, 1994. 120(11): 3197-204.
71. Kimura, T, Tomooka M, Yamano N, Murayama K, Matoba S, Umehara H, et al. AKT signaling promotes derivation of embryonic germ cells from primordial germ cells. Development, 2008. 135(5): 869-79.
72. Durcova-Hills G, Tang F, Doody G, Tooze R, Surani M. Reprogramming primordial germ cells into pluripotent stem cells. PLoS ONE. 2008;3(10):e3531.
73. Nagamatsu G, Kosaka T, Saito S, Takubo K, Akiyama H, Sudo T, et al. Tracing the conversion process from primordial germ cells to pluripotent stem cells in mice. Biol Reprod. 2012;86(6):182.
74. Matsui Y, Tokitake Y. Primordial germ cells contain subpopulations that have greater ability to develop into pluripotential stem cells. Dev Growth Differ.2009;51(7):657-67.
75. Shim H, Gutiérrez-Adán A, Chen LR, BonDurant RH, Behboodi E, Anderson GB. Isolation of pluripotent stem cells from cultured porcine primordial germ cells. Biol Reprod.1997;57(5):1089-95.
76. Park TS, Han JY. Derivation and characterization of pluripotent embryonic germ cells in chicken. Mol Reprod Dev. 2000;56(4):847-52.
77. Guan W, Wang Y, Hou L, Chen L, Li X, Yue W, et al. Derivation and characteristics of pluripotent embryonic germ cells in duck. Poult Sci. 2010;89(2):312-7.

78. Jia W, Yang W, Lei A, Gao Z, Yang C, Hua J, et al. A caprine chimera produced by injection of embryonic germ cells into a blastocyst. Theriogenology. 2008;69(3):340-8.

79. Shamblott M.J, Axelman J, Wang S, Bugg EM, Littlefield JW, Donovan PJ, et al. Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. Proc Natl Acad Sci USA. 1998;95(23):13726-31.

80. Buehr M, Meek S, Blair K, Yang J, Ure J, Silva J, et al. Capture of authentic embryonic stem cells from rat blastocysts. Cell. 2008;135(7):1287-98.

81. Li P, Tong C, Mehrian-Shai R, Jia L, Wu N, Yan Y, et al. Germline competent embryonic stem cells derived from rat blastocysts. Cell. 2008;135(7): 1299-310.

Review Article

The Role of Wnt/β-catenin Signaling Pathway in Rat Primordial Germ Cells Reprogramming and Induction into Pluripotent State

Mohammadi A [*1] **, Babapour V** [1] **, Shahverdi AH** [2,3]

1- Department of Physiology and Pharmacology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
2- Department of Embryology at Reproductive Biomedicine Research Center, Royan Institute for Reproductive Biomedicine, ACECR, Tehran, Iran.
3- Department of Stem Cells and Developmental Biology at Cell Science Research Center, Royan Institute for Stem Cell Biology and Technology, ACECR, Tehran, Iran.

Received: 1 Sep 2013 Accepted: 05 Jan 2013

Abstract

Primordial Germ Cells (PGCs) are unipotent precursors of the gametes. PGCs can give rise to a type of pluripotent stem cells in vitro that are called embryonic germ (EG) cells. PGCs can also acquire such pluripotency in vivo and generate teratomas. Under specific culture conditions, PGCs can be reprogrammed to embryonic germ cells which are capable of expression of key pluripotency markers, such as Pou5f1(Oct4), Sox2 and Nanog. One approach to derive EG cells is manipulation of intracellular signaling pathways that play an important role in the pluripotency induction. Wnt/β-catenin signaling pathway plays major roles in various cell processes such as proliferation, differentiation, migration, survival, apoptosis and pluripotency. For the induction of pluripotency and reprogramming of PGCs into EG cells, Wnt/β-catenin signaling pathway should be activated and using small molecules is one of the methods for reaching this objective. Glycogen synthase kinase 3 (GSK3), is one of the important molecules of canonical pathway of Wnt/β-catenin which signaling and inhibition of GSK3 by CHIR99021 small molecule, causes the activation of this pathway but it is not sufficient for reprogramming the PGCs into EG cells. In order to efficiently derive EG cells, MAPK signaling pathway should be inhibited simultaneously with Wnt/β-catenin signaling pathway, using small molecule PD0325901. Thus, the activation of the Wnt/β-catenin signaling pathway and the simultaneous inhibition of the MAPK pathway, can induce pluripotency in the rat PGCs and their reprogramming into EG cells.

Keywords: **Embryonic Germ Cells, Primordial Germ Cells, Embryonic Stem Cells, reprogramming**

* **Corresponding author: Mohammadi Alireza,** Department of Physiology and Pharmacology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
Tel: +98 2144845767
Email: ar.mohammadi@srbiau.ac.ir