

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



دانشگاه آزاد اسلامی

واحد شیراز

دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی

رساله برای دریافت درجه دکتری تخصصی Ph.D.

رشته و گرایش :

زیست شناسی جانوری - تکوین

عنوان :

تأثیر $miR-124-3p$ بر تمایز نورونی سلول های بنیادی جدا شده از ناحیه بالج فولیکول مو

اساتید راهنما :

دکتر نوروز نجف زاده

دکتر محمد محمدزاده

اساتید مشاور :

دکتر محمد امین عدالت منش

دکتر محمد قاسم گل محمدی

نگارش :

هاله مکبر

زمستان ۱۳۹۷

پیوست د : تأییدیه فارسی هیئت داوران



دانشگاه آزاد اسلامی

واحد شیراز

رساله برای دریافت درجه دکتری تخصصی Ph.D.

رشته و گرایش :

زیست شناسی جانوری - تکوین

عنوان :

تأثیر $miR-124-p$ بر تمایز نورونی سلول های بنیادی جدا شده از ناحیه بالچ فولیکول مو

اساتید راهنما :

دکتر نوروز نجف زاده

دکتر محمد محمدزاده

اساتید مشاور :

دکتر محمد امین عدالت منش

دکتر محمد قاسم گل محمدی

نگارش :

هاله مکبر

ارزیابی شده توسط کمیته پایان نامه با درجه :

دکتر استادیار/ دانشیار رشته (رئیس کمیته)

دکتر استادیار/ دانشیار رشته

دکتر استادیار/ دانشیار رشته

زمستان ۱۳۹۷

تقدیم بہ:

ماحصل آموختہ ہایم را تقدیم می‌کنم بہ آنان کہ مرا آسمانی شان آرام بخش آلام زمینی ام است

بہ استوارترین تکیہ گاہم، دستان پر مہر پدرم

بہ سبزترین مکاہ زندگیم، چشمان مہربان مادرم

کہ ہرچہ آموختم در کتب عشق شما آموختم و ہرچہ بگوختم قطرہ ای از دریای بی کران مہربانیتان را پاس نتوانم بگویم.

امروز، ہستی ام بہ امید شماست و فردا کلید باغ بہستم رضای شما

رہ آوردی کران سنگ ترا ز این ارزان نداشتم تا بہ خاک پایتان نثار کنم، باشد کہ حاصل تلاشم نسیم کونہ غبار محسوسیتان را بزوداید.

بوسہ بردستان پر مہر تان

بہ استاد کرامت دارم جناب آقای دکتر نوروز بخت زادہ کہ بہ من آموخت تا یا موزم...

بہ ہمسفر مہربان زندگی ام، برادر عزیزم:

کہ باہم آغاز کردیم، در کنار ہم آموختیم و بہ امید ہم بہ آیندہ چشم می‌دوزیم.

و آخرین نہ بلکہ اولین تقدیم بہ محضر قطب غریب عالم امکان، حضرت امام زمان «عج.ا.و...»

سپاسگزاری

سپاس لطف و عنایت الهی که توفیق اتمام این پژوهش را به من ارزانی داشت؛ لذا بر خود لازم می‌دانم از همه عزیزان و سرورانی که مراد انجام این پژوهش یاری رسانند، تقدیر و تشکر نمایم:

به مصداق «من لم یشکر المخلوق لم یشکر الخالق» بسی شایسته است از استاد دانشمند و فرزانه ام جناب آقای دکتر نوروز نجف زاده که با کرامتی چون خورشید، سرزمین دل را روشنی بخشید و گلشن سرای علم و دانش را با راهنمایی‌های دبرانه‌ی خود بارور ساختند، تقدیر و تشکر نمایم.

تقدیر و تشکر شایسته از استاد گرامی جناب آقای دکتر محمد محمد زاده که مراد به انجام رساندن این مهم یاری نموده‌اند.

با اتمنان بیکران از مساعدت‌های بی‌شائبه‌ی استاد ارجمند جناب آقای دکتر محمد امین حدادت‌نیش همواره راه‌نما و راه‌گشای اینجانب در طول پروژه بوده‌اند.

با تشکر خالصانه از اساتید فرهیخته جناب آقایان دکتر محمد قاسم گل محمدی و دکتر هاشم یسوی که مرا صمیمانه و مشفقانه یاری داده‌اند.

و سپاس فراوان از جناب آقای دکتر محسن سقا که اجازه دادند تا از امکانات و تجهیزات آزمایشگاه تحقیقاتی سلولی و مولکولی دانشکده

پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اردبیل بهره‌مند شوم.

<u>عنوان</u>	<u>صفحه</u>
چکیده فارسی	ع
فصل اول : کلیات تحقیق	۱
۱-۱-۱- مقدمه	۲
۱-۱-۱-۱- تعریف سلول های بنیادی	۲
۱-۱-۱-۲- طبقه بندی سلول های بنیادی	۲
۱-۱-۱-۳- انواع سلول های بنیادی	۴
۱-۱-۱-۳-۱- سلول های بنیادی جنینی (Embryonic Stem Cells)	۴
۱-۱-۱-۳-۲- سلول های بنیادی بالغ (Adult Stem Cells)	۵
۱-۱-۱-۴-۱- کُنام سلول های بنیادی	۵
۱-۱-۱-۴-۱-۱- کُنام سلول های بنیادی اپیدرمی	۶
۱-۱-۱-۵- پوست	۷
۱-۱-۱-۵-۱- بافت شناسی پوست	۷
۱-۱-۱-۵-۲- آناتومی پوست	۸
۱-۱-۱-۶- فولیکول مو : یکی از ضمائم پوست	۹
۱-۱-۱-۶-۱- چرخه رشد فولیکول مو (Hair Follicle Growth cycle)	۱۰
۱-۱-۱-۶-۲- آناتومی فولیکول مو	۱۱
۱-۱-۱-۶-۳- تکامل آناتومیکی یا تشریحی فولیکول مو	۱۳
۱-۱-۱-۷- سلول های بنیادی فولیکول مو	۱۴
۱-۱-۱-۷-۱- زیست شناسی سلول های بنیادی فولیکول مو	۱۴
۱-۱-۱-۷-۲- پتانسیل تمایزی سلول های بنیادی فولیکول مو	۱۵
۱-۱-۱-۷-۳- کنترل تکوین فولیکول مو و میکروآرناها	۱۶
۱-۱-۱-۸- میکروآرناها (MicroRNAs or miRNAs)	۱۷
۱-۱-۱-۸-۱- معرفی میکروآرناها	۱۷
۱-۱-۱-۸-۲- بیوژنزیس استاندارد میکروآرناها	۱۸
۱-۱-۱-۸-۳- میکروآرناها و سلول های بنیادی	۲۰
۱-۲- بیان مسئله	۲۱

۲۳	۳-۱- ضرورت انجام تحقیق
۲۸	۴-۱- فرضیه های پژوهش
۲۸	۵-۱- اهداف تحقیق
۲۸	۱-۵-۱- اهداف اصلی
۲۸	۲-۵-۱- اهداف فرعی
۲۹	۳-۵-۱- اهداف کاربردی
۲۹	۶-۱- تعریف متغیرها ، اصطلاحات و پیش فرض های تحقیق
۳۰	فصل دوم : مروری بر تحقیقات انجام شده
۳۱	۱-۲- سلول های بنیادی فولیکول مو
۳۲	۲-۲- پتانسیل تمایز عصبی سلول های بنیادی فولیکول مو
۳۴	۳-۲- سلول های بنیادی فولیکول مو و miRNA ها
۳۵	۴-۲- miRNA ها تنظیم کننده های سلول های بنیادی
۳۶	۱-۴-۲- miRNA ها و نوروزنزیس
۳۷	۲-۴-۲- miRNA های عصبی
۴۴	فصل سوم : مواد و روش ها
۴۵	۱-۳- نوع مطالعه
۴۵	۲-۳- مکان و زمان انجام مطالعه
۴۵	۳-۳- جمعیت و حیوانات آزمایشگاهی مورد مطالعه
۴۶	۴-۳- دلایل انتخاب این حیوانات
۴۶	۵-۳- شرایط نگهداری از حیوانات
۴۷	۶-۳- آماده کردن حیوانات به منظور نمونه گیری
۴۷	۷-۳- فهرست تجهیزات آزمایشگاهی مورد استفاده
۴۸	۸-۳- فهرست وسایل و ظروف آزمایشگاهی مورد استفاده
۴۹	۹-۳- فهرست مواد و کیت های مورد استفاده
۵۰	۱۰-۳- روش تهیه محیط های کشت و محلول های مورد استفاده
۵۰	۱-۱۰-۳- روش تهیه محیط کشت DMEM
۵۱	۲-۱۰-۳- روش تهیه محیط کشت RPMI-۱۶۴۰

- ۳-۱۰-۳-۳- روش آماده سازی سرم جنینی گاوی (FBS).....۵۱
- ۳-۱۰-۳-۴- روش تهیه بافر (1X) PBS.....۵۲
- ۳-۱۰-۳-۵- روش تهیه محلول (1X) Trypsin/EDTA.....۵۲
- ۳-۱۰-۳-۶- روش تهیه محلول آمفوتریپسین B با غلظت ۵mg/ml.....۵۳
- ۳-۱۰-۳-۷- روش تهیه محلول دیسپاز II با غلظت ۱mg/ml.....۵۳
- ۳-۱۰-۳-۸- روش تهیه کلانژن از پوست و تاندون پای گوسفند.....۵۳
- ۳-۱۰-۳-۹- روش تهیه محلول سدیم استات ۰/۵ مولاری.....۵۴
- ۳-۱۰-۳-۱۰- روش تهیه محلول سدیم سترات ۰/۰۷۵ مولاری.....۵۴
- ۳-۱۰-۳-۱۱- روش تهیه رتینوئیک اسید با غلظت 10^{-2} مولار.....۵۵
- ۳-۱۰-۳-۱۲- روش تهیه استوک های هیدروکورتیزون.....۵۵
- ۳-۱۰-۳-۱۳- روش تهیه آلبومین سرم گاوی (BSA) ۰/۱٪.....۵۵
- ۳-۱۰-۳-۱۴- تهیه فاکتور نوروتروفیک مشتق از مغز BDNF.....۵۶
- ۳-۱۰-۳-۱۵- تهیه فاکتور رشد فیبروبلاستی bFGF.....۵۶
- ۳-۱۰-۳-۱۶- تهیه فاکتور رشد اپی تلیالی EGF.....۵۶
- ۳-۱۰-۳-۱۷- آنتی بیوتیک Penicillin/ Streptomycin.....۵۶
- ۳-۱۰-۳-۱۸- نحوه تهیه محیط کشت های مغذی با پیش تمایزی برای کشت HFSCs.....۵۷
- ۳-۱۰-۳-۲۰- روش تهیه محلول پارافرمالدهید (PFA) ۴٪.....۵۸
- ۳-۱۰-۳-۲۱- روش تهیه محلول بلاکینگ سلولی.....۵۸
- ۳-۱۰-۳-۲۲- روش تهیه محلول بلاکینگ آنتی بادی.....۵۸
- ۳-۱۰-۳-۲۳- روش تهیه محلول DAPI با غلظت ۵ میلیگرم بر میلی لیتر.....۵۹
- ۳-۱۰-۳-۲۵- روش تهیه بافر TBE(۵X).....۵۹
- ۳-۱۱-۳-۱۱- روش انجام تکنیک ها.....۶۰
- ۳-۱۱-۳-۱- کشت سلول های ناحیه بالج فولیکول موی ناحیه ی سبیل موش سوری.....۶۰
- ۳-۱۱-۳-۲- برداشت نمونه از ناحیه ی سبیل موش سوری.....۶۰
- ۳-۱۱-۳-۲- انتقال نمونه به آزمایشگاه و جداسازی فولیکول های مو.....۶۰
- ۳-۱۱-۳-۳- جداسازی ناحیه بالج فولیکول مو.....۶۰
- ۳-۱۱-۳-۴- کوت کردن فلاسک کشت با کلانژن.....۶۱
- ۳-۱۱-۳-۵- کشت سلولهای ناحیه بالج فولیکول موی موش سوری.....۶۲

۶۲	۲-۱۱-۳- پاساژ سلول ها (تقسیم و انتقال به محیط جدید).....
۶۲	۱۲-۳- تمایز سلول های بنیادی فولیکول مو به سمت سلول های نوروئی.....
۶۳	۱۳-۳- اثبات تمایز HFSC ها به سمت سلول های عصبی.....
۶۳	۱-۱۳-۳- ایمونوسیتوشیمی.....
۶۳	روش انجام تکنیک ایمونوسیتوشیمی.....
۶۵	۲-۱۳-۳- بررسی بیان ژن های هدف با استفاده از تکنیک Real-time PCR.....
۶۶	۱-۲-۱۳-۳- استخراج RNA از بافت و سلول.....
۶۷	۲-۲-۱۳-۳- اندازه گیری مقدار RNA استخراج شده.....
۶۸	۳-۲-۱۳-۳- سنتز cDNA از RNA استخراج شده.....
۶۹	۴-۲-۱۳-۳- نحوه ی انجام واکنش RT-PCR با ژن GAPDH.....
۷۰	۵-۲-۱۳-۳- طراحی پرایمر.....
۷۲	۶-۲-۱۳-۳- الکتروفورز محصول PCR بر روی ژل آگارز.....
۷۳	۱۴-۳- تعریف و مفهوم Real-time PCR.....
۷۳	۱-۱۴-۳- مواد شیمیایی و رنگهای فلورسنت.....
۷۳	۱-۱-۱۴-۳- روش استفاده از شناساگرهای فلورسنت اختصاصی.....
۷۴	۲-۱-۱۴-۳- روش استفاده از شناساگرهای فلورسنت غیراختصاصی.....
۷۴	۲-۱۴-۳- تنظیم و بهینه سازی غلظت پرایمرها.....
۷۵	۳-۱۴-۳- منحنی استاندارد.....
۷۶	۴-۱۴-۳- منحنی تکثیر.....
۷۶	۱-۴-۱۴-۳- فاز خط پایه.....
۷۶	۲-۴-۱۴-۳- فاز خط.....
۷۷	۵-۱۴-۳- منحنی ذوب.....
۷۸	۶-۱۴-۳- خط آستانه.....
۷۹	۷-۱۴-۳- مراحل عملی انجام تکنیک QRT-PCR (Quantitive Real Time-PCR) یا SYBR green qRT-PCR.....
۸۱	۸-۱۴-۳- تعیین دمای باز سرشتی پرایمرها.....
۸۱	۹-۱۴-۳- آنالیز اولیه داده ها.....
۸۱	۱-۹-۱۴-۳- آنالیز کمی داده ها.....
۸۲	۲-۹-۱۴-۳- روش مقایسه ای $\Delta\Delta CT$

۸۳۱۵-۳-بررسی پروفایل بیان miRNA های هدف
۸۳۱-۱۵-۳-واکنش پُلی آدنیلایسیون
۸۴۲-۱۵-۳-واکنش سنتز cDNA
۸۵۳-۱۵-۳-واکنش Real-time PCR برای بررسی بیان miRNA ها
۸۶۱۶-۳-تکنیک Transfection
۸۷۱-۱۶-۳-روش های انجام تکنیک Transfection
۸۷۱-۱-۱۶-۳-روش های انتقال ویروسی
۸۷۲-۱-۱۶-۳-روش های انتقال غیر-ویروسی
۸۸۲-۱۶-۳-ترانسفکشن miRNA ها
۸۹۳-۱۶-۳-روش عملی ترانسفکشن miRNA ی مورد نظر
۸۹۱-۳-۱۶-۳-روش رقیق سازی miRNA Mimic برای ترانسفکشن
۸۹۲-۳-۱۶-۳-روش رقیق سازی miRNA Inhibitor برای ترانسفکشن
۹۰۳-۳-۱۶-۳-پروتوکول اجرایی ترانسفکشن برای HFSCs
۹۱۴-۳-۱۶-۳-گروه بندی انجام شده پس از ترانسفکشن میکروآرنا به درون HFSCs
۹۲فصل چهارم: نتایج
۹۳۱-۴-نتایج حاصل از کشت سلولی و بافت
۹۴۲-۴-نتایج تمایز HFSCs به نوروها
۹۵۳-۴-اثبات تمایز HFSCs به سمت دودمان عصبی (نورونی و گلیالی)
۹۵۱-۳-۴-بررسی بیان مارکرهای عصبی پس از القای تمایز نورونی با ایمونوسیتوشیمی
۹۷۲-۳-۴-بررسی بیان ژن های هدف پس از القای تمایز نورونی به روش Real-time PCR
Real-time PCR۳-۳-۴-بررسی پروفایل بیان miRNA های هدف پس از القای تمایز نورونی در HFSC های تمایز یافته به روش
۹۹time PCR
۱۰۱۴-۴-نتایج ترانسفکشن miR-124-3p در HFSCs
۱۰۱۱-۴-۴-پروفایل بیان miR-124-3p در HFSCs پس از ترانسفکشن
۱۰۲۲-۴-۴-بررسی بیان ژن های هدف در HFSCs پس از ترانسفکشن
۱۰۲۱-۲-۴-۴-ژن های Ptbp1 و Sox9: اهداف مستقیم miR-124 در HFSCs
۱۰۵۲-۲-۴-۴-ژن Dlk1 و نقش آن در تمایز نورونی HFSCs پس از ترانسفکشن miR-124
۱۰۶۳-۲-۴-۴-ژن های Map2 و Rbfox3: بعنوان مارکرهای نورونی در تمایز HFSCs

۱۰۹HFSCs در تمایز نورونی <i>CoREST</i> و <i>NR2E1</i> ، <i>CCND1</i> های ژن ۴-۲-۴-۴
۱۱۲بررسی بیان مارکرهای عصبی در HFSCs پس از ترانسفکشن با ایمونوسیتوشیمی ۳-۴-۴
۱۱۴چکیده ی تصویری نتایج حاصل در فازهای مختلف تحقیق ۵-۴
۱۱۵فصل پنجم : بحث و نتیجه گیری ۱۱۵
۱۱۶۱-۵ بحث ۱۱۶
۱۲۳۲-۵ نتیجه گیری ۱۲۳
۱۲۳۳-۵ محدودیت ها ۱۲۳
۱۲۴۴-۵ پیشنهادات ۱۲۴
۱۲۵۵-۵ منابع ۱۲۵

عنوان

صفحه

شکل ۱-۱- سلول های بنیادی بالغ درون کنام ها ۶

شکل ۲-۱- اجزای ساختاری پوست ۹

شکل ۳-۱- ساختار فولیکول مو ۱۳

شکل ۴-۱- شماتیکی از مسیر بیوژنزیس miRNA ها و مکانیسم سرکوب بیان ژن ۱۹

شکل ۵-۱- لوپ فیدبکی بین miR- ۱۲۴ ، miR- ۹ ، let- ۷b ۲۷

شکل ۱-۲- تنظیم و عملکردهای miR- ۱۲۴ ۴۱

شکل ۱-۳- تصویری از موش سوری (Mus musculus) ۴۶

شکل ۲-۳- مراحل جداسازی فولیکول موی سبیل موش سوری زیر میکروسکوپ ۶۱

شکل ۱-۴- فتومیکروگراف از کشت اولیه سلول های بنیادی ناحیه بالچ فولیکول موی سبیل موش در بزرگنمایی ۱۰۰x ۹۲

شکل ۲-۴- فتومیکروگراف از سلول های بنیادی فولیکول موی سبیل موش سوری ۹۳

شکل ۳-۴- نتایج مربوط به بررسی های ایمنوسیتوشیمی برای مارکر سلول های نورونی (NeuN و Map۲) و مارکر سلول های گلیالی (GFAP) ۹۴

شکل ۴-۴- تأثیرات محیط تمایز نورونی، بیان بالا یا مهار miR-۱۲۴ روی تمایز نورونی و گلیالی ۱۱۱

شکل ۵-۴- نمودار شماتیکی تمایز نورونی سلول های بنیادی فولیکول موی موش در محیط *in vitro* ۱۱۳

فهرست جدول ها

عنوان	صفحه
جدول ۱-۳- تهیه محیط مغذی یا پیش تمایزی در حجم ۵۰ میلی لیتر.....	۵۷
جدول ۲-۳- تهیه محیط کشت القای تمایز نورونی در حجم ۱۰ میلی لیتر.....	۵۷
جدول ۳-۳-تهیه محیط محلول بلاکینگ سلولی.....	۵۸
جدول ۴-۳-تهیه محیط محلول بلاکینگ آنتی بادی.....	۵۸
جدول ۵-۳- آنتی بادی های اولیه و ثانویه استفاده شده برای رنگ آمیزی ایمونوسیتوشیمی.....	۶۵
جدول ۶-۳- مرحله اول سنتز cDNA.....	۶۸
جدول ۷-۳- مرحله دوم سنتز cDNA.....	۶۹
جدول ۸-۳- تهیه ی مستر میکس برای انجام واکنش PCR.....	۶۹
جدول ۹-۳- ترکیب مواد برای واکنش PCR.....	۷۰
جدول ۱۰-۳- مراحل دمایی واکنش PCR برای پرایمر GAPDH.....	۷۰
جدول ۱۱-۳- توالی پرایمرهای ژن های هدف.....	۷۱
جدول ۱۲-۳- مراحل انجام واکنش Real-timePCR برای ژن های هدف.....	۸۰
جدول ۱۳-۳- پروتوکل دمایی سه مرحله ای کیت Real-time PCR.....	۸۰
جدول ۱۴-۳-مقادیر و مواد مورد استفاده برای واکنش پلی آدنیلایسیون.....	۸۴
جدول ۱۵-۳- مقادیر و مواد لازم برای تهیه مخلوط کلی واکنش سنتز.....	۸۴
جدول ۱۶-۳- پروتوکل دمایی ترمال سایکلر جهت سنتز cDNA.....	۸۵
جدول ۱۷-۳- مقادیر و مواد مورد استفاده برای واکنش QPCR.....	۸۵
جدول ۱۸-۳- توالی پرایمر miRNA های موردنظر.....	۸۵
جدول ۱۹-۳- چرخه دمایی واکنش QPCR برای miRNA ها.....	۸۶
جدول ۱-۴- درصد بیان مارکرهای عصبی در سلول های تمایز یافته ۱۰ روز پس از القای تمایز نورونی.....	۹۶
جدول ۲-۴- foldchange ژنهای هدف در HFSC های تیمار شده با محیط تمایزی نسبت به گروه کنترل.....	۹۸
جدول ۳-۴- foldchange مربوط به miRNA های هدف در HFSC های تمایز یافته نسبت به گروه کنترل.....	۹۹

<u>عنوان</u>	<u>صفحه</u>
نمودار ۱-۱- طبقه بندی سلول های بنیادی	۳
نمودار ۱-۳- ایجاد پرایمر-دایمر	۷۵
نمودار ۲-۳- نمودار تکثیر محصولات در ریل تایم بر حسب سیکل	۷۷
نمودار ۳-۳- نمونه هایی از منحنی ذوب قابل قبول و غیر قابل قبول	۷۸
نمودار ۳-۴- خط آستانه (Threshold) و سیکل آستانه (Ct) در ریل تایم	۷۹
نمودار ۱-۴- درصد سلول های بیان کننده مارکرهای عصبی در سلول های تمایز یافته فولیکول موی موش ۱۰ روز پس از القای تمایز نورونی در مقایسه با سلول های گروه کنترل	۹۵
نمودار ۲-۴- سطح بیان ژن های هدف در HFSC ها بعد از القای تمایز نورونی	۹۷
نمودار ۳-۴- سطح بیان miRNA های هدف در HFSC ها بدنبال القای تمایز نورونی	۹۸
نمودار ۴-۴- منحنی های تکثیر مربوط به بیان miRNA های هدف طی واکنش Real-time PCR در HFSC های دو گروه کنترل و تمایز نورونی	۹۹
نمودار ۴-۵- تغییرات بیان <i>miR-124-3p</i> بعد از القای نورونی ، ترانسفکشن Mimic و Inhibitor	۱۰۰
نمودار ۴-۶- منحنی های تکثیر مربوط به بیان <i>miR-124</i> طی واکنش Real-time PCR در HFSC های گروه های مورد نظر پس از ترانسفکشن	۱۰۱
نمودار ۴-۷- تغییرات بیان <i>Ptbp1</i> و <i>Sox9</i> بعد از ترانسفکشن	۱۰۲
نمودار ۴-۸- منحنی های تکثیر مربوط به <i>Ptbp1</i> و <i>Sox9</i> بعد از ترانسفکشن	۱۰۳
نمودار ۴-۹- تغییرات بیان <i>DLK1</i> بعد از ترانسفکشن	۱۰۴
نمودار ۴-۱۰- منحنی تکثیر مربوط به <i>DLK1</i> بعد از ترانسفکشن	۱۰۵
نمودار ۴-۱۱- تغییرات بیان <i>Map2</i> و <i>Rbfox3</i> بعد از ترانسفکشن	۱۰۶
نمودار ۴-۱۲- منحنی های تکثیر مربوط به ژن های نورونی <i>Map2</i> و <i>Rbfox3</i> بعد از ترانسفکشن	۱۰۷
نمودار ۴-۱۳- تغییرات بیان <i>NR1E1, CCND1</i> و <i>CoREST</i> بعد از ترانسفکشن و القای تمایز نورونی	۱۰۹
نمودار ۴-۱۴- منحنی های تکثیر مربوط به ژن های <i>NR1E1, CCND1</i> و <i>CoREST</i> بعد از ترانسفکشن	۱۰۷
نمودار ۴-۱۵- تاثیرات مربوط به فرایبانی یا مهار <i>miR-124</i> روی تمایز نورونی و گلیالی	۱۱۲

miRNA	microRNA
HFSCs	Hair Follicle Stem Cells
Sox⁴	SRY (Sex determining region Y) Box⁴ Protein
Ptbp¹ & ²	Polypyrimidine tract-binding protein^{1,2}
NR^{7E}¹	Nuclear Receptor Subfamily⁷ Group E Member¹ or TLX
GAPDH	GlycerAldehyde³-Phosphate DehyHrogenase
REST	RE¹-Silencing Transcription factor
RCOR²	REST Co-repressor² or CoREST
DLK¹	Delta Like Non-Canonical Notch Ligand¹
DLL⁴	Delta-like protein⁴
Rbfox³	RNA Binding Fox-¹ Homolog³ or NeuN
NeuN	Neuronal Nuclei
MAP²	Microtubule Associated Protein²
GFAP	Glial fibrillary Acidic Protein
NT-³	Neurotrophin-³
GDNF	Glial cell line-Derived Neurotrophic Factor
BDNF	Brain-Derived Neurotrophic Factor
bFGF	basic Fibroblast Growth Factor
EGF	Epidermal Growth Factor
PBS	Phosphate-Buffered Saline
BSA	Bovine Serum Albumin
FBS	Fovine Bovine Serum
ATRA	all trans Retinoic Acid

RT-PCR	Real-Time PCR
DGCR^Δ	DiGeorge syndrome critical region ^Δ
Epi-NCSCs	Epidermal-Neural Crest Stem Cells
DEPC	DiEthyl PyroCarbonate
DAPI	4',6-Di Amidino-2-Phenyl Indole
EDTA	EthyleneDiamine Tetraacetic Acid
cDNA	complementary DNA
mRNA	messenger RNA
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
BHLH	Basic Helix–Loop–Helix
SVZ	SubVentricular Zone
EZH²	Enhancer of zeste homolog ²
<i>DACT</i>¹	Dishevelled Binding Antagonist of Beta Catenin ¹
<i>LAMC</i>¹	Laminin subunit gamma ¹
ITGβ¹	Integrin beta-¹
Hes¹	Hes family bHLH transcription factor ¹

تأثیر *miR-1۲۴-۳p* بر تمایز نورونی سلول های بنیادی جدا شده از ناحیه بالج فولیکول مو

مقدمه: سلول های بنیادی فولیکول مو بعنوان نمونه ای از سلول های بنیادی بالغ با پتانسیل تکثیری و تکوینی گسترده با قابلیت تمایز به سلول های نورونی و گلیالی هستند. میکروآرناها تنظیم کننده های بسیار مهم حفظ و تغییر وضعیت سلولی در طول تکثیر یا تمایز سلول های بنیادی هستند. میکروآرناهای مختلف، تکثیر و تمایز سلول های بنیادی فولیکول مو را تنظیم می کنند. در میان میکروآرناهای عصبی، عملکرد *miR-1۲۴* در تمایز نورونی تا حدود زیادی مورد مطالعه قرار گرفته است؛ با این حال، نقش دقیق آن در تمایز عصبی سلول های بنیادی فولیکول مو مشخص نشده است.

مواد و روش ها: سلول های بنیادی فولیکول مو از فولیکول های موی سبیل موش جداسازی شدند. سطوح بیان *miR-1۲۴*، *miR-9*، *let-7b* و ژن های *(cyclinD1)*، *CCND1*، *(Nr2E1)*، *Tlx*، *RCOR2*، *(CoREST)*، *DLK1*، *Map2*، *Rbfox3*، *(NeuN)*، *Sox9* و *Ptbp1* توسط روش Real-time PCR (RT-PCR) تعیین شد. تأثیر ترانسفکشن *miR-1۲۴* توسط تکنیک ایمونوسیتوشیمی مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج: ما در این مطالعه نشان دادیم سطح بیان *miR-1۲۴* و *let-7b* متعاقب القای تمایز نورونی بطور قابل ملاحظه ای افزایش یافت. ژن های *DLK1*، *Map2*، *Rbfox3*، *CCND1*، *NR2E1*، *RCOR2*، *Sox9* و *Ptbp1* را بعنوان اهداف *miR-1۲۴* در روند تمایز نورونی سلول های بنیادی فولیکول مو تعیین کردیم. در طول تمایز عصبی و ترانسفکشن سلول ها با *miR-1۲۴* mimic سطوح بیان ژن های *DLK1*، *CCND1*، *NR2E1*، *RCOR2*، *Sox9* و *Ptbp1* کاهش و در مقابل سطح بیان ژن های *MAP2*، *DLK1* و *Rbfox3* را در HFSC ها افزایش داد. بعلاوه، بیان بسیار بالای *miR-1۲۴*، بیان پروتئین های *MAP2* ($11,26 \pm 58,43$) و *NeuN* ($48,34 \pm 11,15$) را افزایش داد.

نتیجه گیری: نتایج نشان داد که *miR-1۲۴* می تواند منجر به پیشرفت تمایز سلول های بنیادی فولیکول مو بسمت سلول های عصبی با هدف گیری ژن های غیرعصبی *DLK1*، *CCND1*، *NR2E1*، *RCOR2*، *Sox9* و *Ptbp1* گردد.

کلید واژه ها: سلول های بنیادی فولیکول مو، تمایز عصبی، *miR-1۲۴*، *DLK1*، *RCOR2*، *NR2E1*، *CCND1*، *Sox9*، *Rbfox3*، *Map2*، *Ptbp1*

فصل اول : کلیات تحقیق

۱-۱- مقدمه

۱-۱-۱- تعریف سلول های بنیادی

سلول های بنیادی^۱ سلول های سوماتیکی تمایز نیافته ای هستند که قادرند تحت شرایط خاص به یکی از انواع سلولهای بالغ و کاملاً تمایز یافته تبدیل شوند. به طور کلی سه معیار عملی برای تعریف سلول های بنیادی وجود دارد:

(۱) سلول های بنیادی قادرند تحت تقسیمات کاملاً یکسان که شرط لازم برای حفظ و پشتیبانی جمعیت سلول های بنیادی است، خود تجدیدی یا خودنوزائی^۲ کنند.

(۲) سلول های دخترِ حاصل از تقسیم یک سلول بنیادی واحد، توانایی لازم برای متمایز شدن به انواع دودمان های سلولهای بالغ را دارند؛ به عنوان مثال سلول های بنیادی خونساز^۳ قادرند انواع سلول های خونی را تولید کنند (Baum et al. ۱۹۹۲; Morrison and Weissman ۱۹۹۴; Osawa et al. ۱۹۹۶)، سلول های بنیادی عصبی قادر به تولید سلول های آستروسیت والیگودندروسیتی بوده (Gage et al. ۲۰۰۰؛ Qian et al. ۲۰۰۴; Sanai et al. ۲۰۰۴)، سلول های بنیادی جنینی^۴ قادرند که یک اووسیت جدید تولید کنند (Johnson et al. ۲۰۰۴) و یا سلول های بنیادی بالغ مزانشیمی^۵ می توانند انواع سلول های بافت مزانشیمی از جمله فیبروبلاست، استئوسیت، گندروسیت و آدیپوسیت را تولید کنند (Haynesworth et al. ۱۹۹۲).

(۳) معیار سوم برای سلول های بنیادی این است که در صورت پیوند این سلول ها به یک بافت آسیب دیده، به طور عملی جمعیتی از سلول های ترمیمی را تشکیل دهند. بطور مثال سلول های بنیادی خونساز که اخیراً برای ترمیم سلول های کبدی در بیماران مورد استفاده قرار گرفته می شوند باید قابلیت تکثیر در محیط *in vivo* را حتی بدون وجود آسیب بافتی دارا باشند و قادر به شرکت در تمایز بافتی باشند (Svendsen et al. ۱۹۹۲).

تذکر: معیار سوم مهم ترین عمل سلول های بنیادی در بافت های بالغ محسوب می شود.

۱-۱-۲- طبقه بندی سلول های بنیادی

سلول های بنیادی را به دو دسته سلول های بنیادی بالغ و سلول های بنیادی جنینی که عملکرد ویژه دارند، طبقه بندی می کنند. همچنین براساس توانایی تمایز و خاصیت پلاستیسیته به ۵ دسته تقسیم می شوند: (نمودار ۱-۱)

۱- Stem Cells (SCs)

۲- Self Renewal

۳- Hematopoietic Stem Cells (HSCs)

۴- Embryonic Stem Cells (ESCs)

۵- Mesenchymal Stem Cells (MSCs)

۱- سلول های بنیادی همه توان (Totipotent stem cells)

سلول هایی که از ترکیب سلول تخم و اسپرم بوجود می آیند و سلول های مشتق شده بعد از اولین تقسیم تخم لقاح یافته هستند و قادرند به انواع سلول های خارج جنینی و جنینی تبدیل شوند.

۲- سلول های پرتوان (Pluripotent stem cells)

سلول های بنیادی هستند که از سلول های بنیادی همه توان توانایی کمتر داشته و قادرند به سلول های مشتق شده از هر سه لایه جنینی یعنی اکتودرم ، مزودرم و اندودرم تمایز یابند مانند سلول های بنیادی جنینی

۳- سلول های چند توان (Multipotent stem cells)

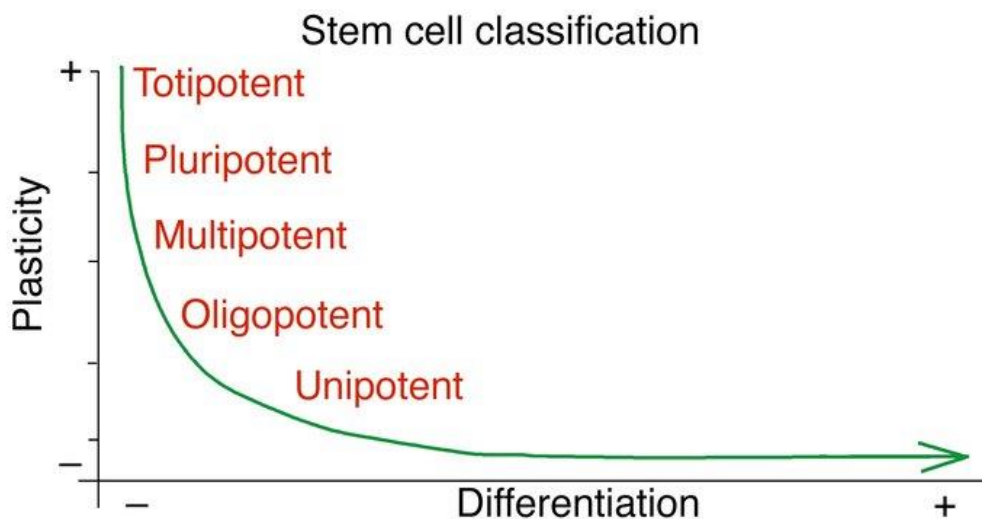
سلول هایی که قادرند به بعضی از دودمان های سلولی (مرتبط با یک خانواده سلولی) تمایز یابند. به عنوان مثال سلول های بنیادی خونساز به گلبول های قرمز، سفید و پلاکت ها تمایز می یابند.

۴- سلول های کم توان (Oligopotent stem cells)

سلول هایی که قادرند، به یک سری محدود از دودمان های سلولی تبدیل شوند.

۵- سلول های بنیادی تک توان (Unipotent stem cells)

سلول هایی که قادرند، تنها یک نوع سلول را تولید نمایند اما به علت خاصیت خود نوزائی، سلول بنیادی نامیده می شوند. (Wagers and Weissman, ۲۰۰۴).



نمودار ۱-۱- طبقه بندی سلول های بنیادی (Wagers and Weissman, ۲۰۰۴)

۱-۱-۳- انواع سلول های بنیادی

سلول های بنیادی بر اساس گونه حیوانی، محل جداسازی سلول، پتانسیل تمایز به یک یا چند دودمان سلولی بالغ و همچنین زمان جداسازی (قبل و یا بعد از تولد) به چندین گروه تقسیم می شوند که به طور مختصر به آنها اشاره شده است:

۱-۱-۳-۱- سلول های بنیادی جنینی (Embryonic Stem Cells)

سلول های بنیادی جنینی از توده سلولی داخلی رویانِ موسوم به بلاستوسیست^۱ مشتق می شوند. برای نخستین بار در حدود ۳۲ سال پیش، سلول های بنیادی جنینی موش، در محیط آزمایشگاه (*in vitro*) از توده سلولی داخلی بلاستوسیست های موش در حال تکوین توسط دو دانشمند به نام های Evans و Martin در سال ۱۹۸۱ جداسازی شد. سلول های بنیادی جنینی انسان نیز در سال ۱۹۸۸ توسط Thomson و همکاران بدست آمد. سلول های بنیادی جنینی به طور اختصاصی قادر به تشکیل هر سه لایه جنینی در محیط آزمایشگاه بودند. آنها همچنین قادر بودند در محیط کشت به صورت تمایز یافته تحت تقسیمات متقارن تکثیر شده و یک جمعیت سلولی هموزن (خالص) را ایجاد کنند و همچنان خصوصیات ژنتیکی خود را حتی در کشت طولانی مدت در محیط آزمایشگاهی حفظ کنند (Rippon and Bishop, ۲۰۰۴).

سلول های بنیادی جنینی خود براساس پتانسیل تمایزی و زمان جداسازی از بلاستوسیست، به چند گروه تقسیم می شوند:

۱) سلول های بنیادی جنینی جدا شده از جنین اولیه در مرحله مورولا (توده جنینی ۱۶ سلولی) همه توان آ بوده و قادر به تشکیل هر نوع سلول یا اندام خارج جنینی مثل جفت و حتی جنین کامل می باشند.

۲) سلول های بنیادی جنینی گرفته شده از جنین مسن تر، در مرحله بلاستوسیست سلول های پر توان^۲ و دارای پتانسیل تمایز به بافت های مختلف بدن بوده ولی قادر به ایجاد جفت نبوده و توانایی ایجاد یک جنین کامل را نیز ندارند.

۳) سلول های بنیادی مسن تر از مرحله قبل نیز چند توان^۴ بوده و قادر به ایجاد انواع سلول های بافتی می باشند.

اولین رده سلولی پرتوان، رده سلولی کارسینومای جنینی موش بوده که با جداسازی از یک ساختار غیر تمایزی توموری از سلول های زایای موش و تکثیر در محیط آزمایشگاه، هر سه لایه جنینی را ایجاد کرد (Quirici et al. ۲۰۰۲).

۱- بلاستوسیست، روپایی است که بعد از لقاح، مدت ۵ تا ۶ روز رشد کرده است و به دو نوع سلول مختلف شامل سلول های سطحی (تروفوبلاست) که نهایتاً جفت را تشکیل می دهند و توده سلولی داخلی (Inner Cell Mass) که تبدیل به جنین می شوند، تقسیم شده است.

۲ - Totipotent
۳ - Pluripotent
۴ - Multipotent

۱-۳-۲- سلول های بنیادی بالغ (Adult Stem Cells)

سلول های بنیادی بالغ، سلول های سوماتیکی هستند که از بافت های مختلف بدن جدا شده و بسته به محلی که این سلول ها در آن ساکن هستند دارای خصوصیات متفاوتی می باشند. این سلول ها در خون، مغز، استخوان، ماهیچه اسکلتی، شبکیه، قرنیه چشم، پالپ دندان، مغز، طناب عصبی، خون سیاهرگی، کبد، پوست، روده و پانکراس وجود دارند. عمل مهم این سلول ها در بافت های مختلف، تولید مجدد سلول های اختصاصی بالغ آن بافت است. بنابراین این سلول ها در همه اندام ها و بافت ها در سرتاسر زندگی یافت می شوند و سلول های موجود در آن بافت را در طول زندگی موجود زنده حفظ، نگهداری و پشتیبانی می کنند (Musina et al. ۲۰۰۴). این سلول ها به طور مشخصی چند توان بوده و سلول های حاصل از تقسیم آن سلول هایی است که تا حدودی متمایز شده و تحت عنوان سلول های بینابینی یا پیش ساز می باشند. این سلول ها به طور مکرر تقسیم شده و با افزایش تقسیمات سلولی، پتانسیل تمایزی آنها کمتر شده و بیشتر به سمت سلول های بالغ با سرنوشت مشخص شده پیش می روند (Sun et al. ۲۰۰۳).

۱-۴-۱- گنم^۱ سلول های بنیادی

آنچه توانائی سلول بنیادی را تعیین می کند وابسته به آرایش و محتوای ژنتیکی مناسب برای تمایز به سلولی ویژه است. اگرچه تمایز یا خودنوزائی اغلب و تا حدود زیادی بواسطه ریزمحیط^۲ اطراف سلول بنیادی تنظیم می شود که بعنوان گنم سلول بنیادی شناخته می شود. در واقع گنم سلول های بنیادی بخشی از واحدهای ساختاری - عملکردی^۳ اندام ها و بافت ها هستند (Terskikh et al., ۲۰۰۷). گنم ها تولید مداوم سلول های بنیادی و دودمان های تمایز یافته ی آنها را معمولاً از عوامل پاراکراین^۴ (و گاهی جاکستاکراین^۵) که در سلول های گنم تولید می شوند، تنظیم می کنند (شکل ۱-۱). عوامل پاراکراین یا عوامل رشد و تمایز^۶، سلول ها را در وضعیت بنیادی^۷ حفظ می کنند و به محض این که سلول ها، گنم را ترک کنند بعلت عدم دسترسی عوامل پاراکراین به آنها، تمایز خود را آغاز می کنند (Gilbert, ۱۹۹۶).

۱ -Niche

۲ - Microenvironment

۳ -Structural-Functional Units (SFUs)

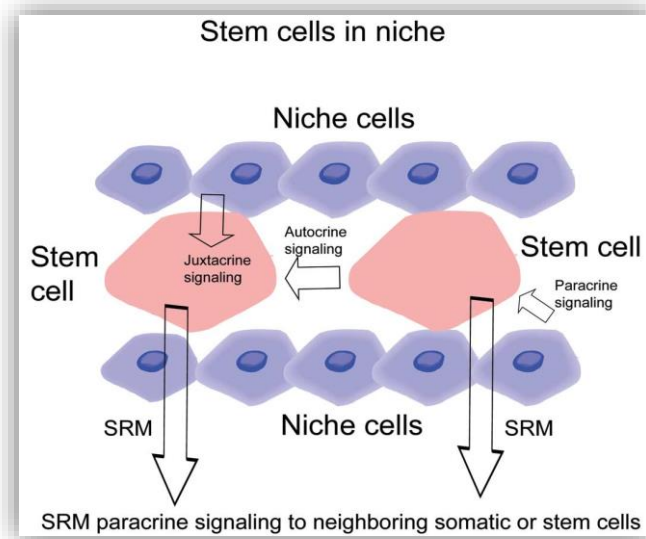
۴ -برهمکنش پاراکراین فرآیندی است که طی آن پروتئین های ساخته شده توسط یک سلول با انتشار در فواصل کوتاه باعث القای سلول های مجاور می شود

۵- برهمکنش جاکستاکراین عبارتست از فرآیندی که طی آن پروتئین های غشائی یک سلول با گیرنده های پروتئینی واقع در سطح سلول مجاور برهمکنش می دهند.

۶ -Growth and Differentiation Factors (GDFs)

۷ -stemness

مولکول های آزاد شده از سلول های بنیادی^۱ شامل مولکول های مختلف مانند سیتوکین ها^۲، فاکتورهای رشد^۳، اینترلوکین ها^۴، آنتی اکسیدان ها^۵، مولکول های چاپرون^۶، آگزوزوم ها^۷ و میکروآرنا ها^۸ می باشند



شکل ۱-۱- سلول های بنیادی بالغ درون کنام ها: جایی که برهمکنش های زیادی بین سلول های بنیادی و کنام سلول های دیگر مانند سلول های اندوتلیال و آدیپوسیت ها رخ می دهد. SRM: مولکول های آزاد شده از سلول های بنیادی (Maguire and Friedman, ۲۰۱۳).

۱-۴-۱-۱- کنام سلول های بنیادی اپیدرمی

به طور معمول، بافت ها اعم از پوست شامل سلول های تمایز یافته و تعداد محدودی از سلول های بنیادی مستقر در کنام ها هستند (Pajonk and Vlashi, ۲۰۱۳). سلول های بنیادی اپیدرمی در کنام منحصر به فردی درون پوست قرار دارند که بواسطه برهم کنش های بین اینتگرین^۹ های وابسته به - سلول های بنیادی و اجزای ماتریکس خارج سلولی^{۱۰} شکل گرفته است (Choi et al. ۲۰۱۵). ماتریکس خارج سلولی یکی از اجزای مهم در کنام سلول های بنیادی در پوست است و خواص بیوفیزیکی این ماتریکس (مانند سفتی) می تواند سرنوشت سلول را نیز تحت تأثیر قرار دهد (Brizzi et al. ۲۰۱۲). سلول های در حال تکثیر یا بنیادی اپیدرمی در لایه پایه یا قاعده ای^{۱۱} قرار دارند، در حالی که سلول های در حال تمایز به صورت یک-ستون-ضخیم-سلولی بر روی سلول های در حال تکثیر گسترده شده اند (Terskikh et al. ۲۰۰۷).

۱- Stem cell Released Molecules (SRMs)

۲- Cytokine

۳- Growth Factors (GFs)

۴- Interleukin

۵- Antioxidant

۶- Chaperone molecules

۷- Exosomes

۸- MicroRNAs (miRNAs)

۹- Integrins

۱۰- ExtraCellular Matrix (ECM)

۱۱- Basal Layer

یکی از ضمایم بافتی پوست، فولیکول های مو^۱ است که به همراه اپیدرم درون فولیکولی حاوی سلول های بنیادی پوست^۲ می باشند (Fuchs, ۲۰۰۸; Watt and Jensen, ۲۰۰۹).

۱-۱-۵- پوست

۱-۱-۵-۱- بافت شناسی پوست

پوست، بزرگترین ارگان منفرد بدن است. به طور معمول ۱۵ الی ۲۰ درصد وزن بدن را تشکیل می دهد. در بالغین، سطحی معادل $2-1/5 m^2$ از محیط خارجی بدن را می پوشاند. نام های دیگری که برای این ارگان بدن به کار برده می شود، شامل، پوشش^۳ یا لایه ی جلدی^۴ است. پوست از دو لایه ی مهم اپی درم و درم تشکیل شده است. در محل اتصال نامنظم اپی درم و درم، برخورد زواید موسوم به پاپیلاهای درمی^۵ که حاصل پیشروی درم به زیر اپیدرم است و نیز فرورفتگی های ستون مانند اپیدرم به داخل درم موسوم به ستیغ های اپیدرمی^۶ باعث استحکام دولایه ی درم و اپی درم می شوند. مشتقات اپی درمی پوست شامل موها، ناخن ها، غدد سبابه^۷ (یا چربی) و غدد عرق^۸ می باشند.

عملکردهای بسیار زیادی برای پوست ذکر شده است که به طور خلاصه می توان به موارد زیر اشاره کرد. عملکرد حفاظتی که به منظور ایجاد سدّی فیزیکی در برابر آسیب های حرارتی، مکانیکی، اکثر پاتوژن ها و سایر مواد است. این اثرات حفاظتی به وسیله ی اجزای خاص در پوست ایجاد می شود. رنگدانه ی تیره ی ملانین، در اپی درم وجود دارد و باعث حفاظت سلول های پوست در برابر اشعه ی ماوراء بنفش می شود. پوست در نواحی خشک، باعث حفاظت بدن در برابر خشکی می شود. عملکرد دیگر پوست، تنظیم حرارت بدن است. پوست باعث حفظ ثبات حرارت بدن در حالت طبیعی می شود. در عملکرد حسی پوست، پوست قادر است توسط گیرنده های حسی خود، به تنظیم تعاملات بدن با اشیای فیزیکی کمک کند (Junqueira and Carneiro, ۲۰۰۵)

۱ -Hair Follicule (HF)
۲ -Skin Stem Cells
۳ -Integument
۴ -Cutaneous layer
۵ -Dermal papilla
۶ -Rete ridges
۷ -Sebaceous glands
۸ -Sweat glands

۱-۱-۵-۲ - آناتومی پوست

پوست از دو لایه اصلی به نام های روپوست یا اپیدرم و پوست یا درم تشکیل شده است : (شکل ۱-۲)

الف - اپیدرم (Epidermis)

اپی درم عمدتاً از سلول های سنگفرشی مطابق شاخی^۱ متشکل از سلول هایی به نام کراتینوسیت ها^۲ تشکیل شده است. همچنین سه نوع از سلول های اپی درمال که به میزان کمتری حضور دارند نیز وجود دارند. ملانوسیت ها^۳ که تولیدکننده رنگدانه های پوست اند و سلول های لانگرهانس^۴ که ارائه کننده آنتی ژن و سلول های اپی تلیال لامسه ای به نام سلول های مرکل^۵ اپی درم باعث تمایز اصلی بین پوست ضخیم موجود در کف دست و پا و پوست نازک در سایر نواحی بدن می شود. از درم به بعد، اپی درم از پنج لایه کراتینوسیت تشکیل شده است. این لایه ها شامل لایه قاعده ای^۶ متشکل از سلول های بازوفیل مکعبی یا استوانه ای بر روی غشای پایه، لایه خاردار^۷، لایه گرانولار^۸، لایه شفاف^۹ و لایه شاخی^{۱۰} است (Junqueira and Carneiro, ۲۰۰۵).

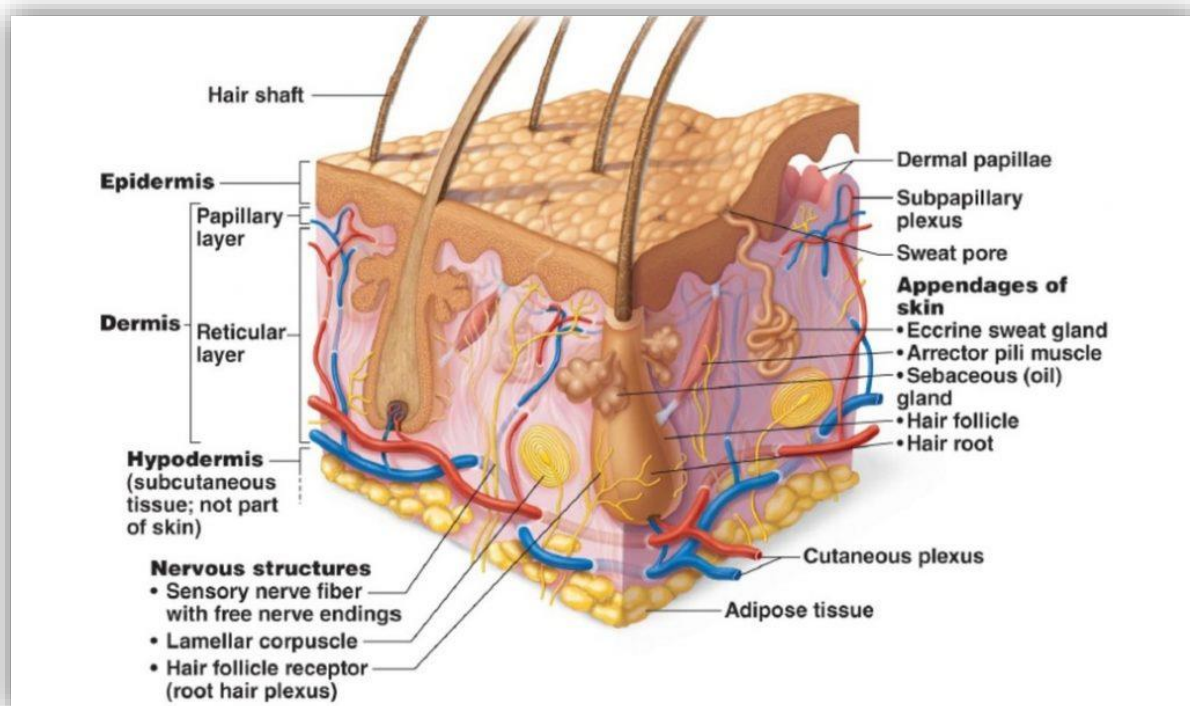
ب - درم (Dermis)

درم لایه ای از بافت همبند است که از اپی درم حمایت می کند. درم، اپی درم را به بافت زیرجلدی متصل می سازد. ضخامت این لایه از بدن در نواحی مختلف بدن متفاوت است و حداکثر به ۴ میلی متر در پشت می رسد. سطح درم بسیار نامنظم بوده و زواید بسیاری دارد. این زواید با ستیغ های اپی درمی درهم فرو می روند. پاپیلاهای درم، به ویژه در پوست، در معرض فشار مداوم، وجود دارند. درم دارای دو لایه با مرزهای نامشخص به صورت لایه پاپیلاری و لایه رتیکولار می باشد. لایه پاپیلاری نازک بوده و حاوی پاپیلاهای درم است. لایه رتیکولار لایه زیرین تر و ضخیم تر است و از بافت همبند متراکم نامنظم تشکیل شده است (Junqueira and Carneiro, ۲۰۰۵).

۱ - Stratified Squamous Epithelium Keratinized
۲ -Keratinocytes
۳ -Melanocytes
۴ -Langerhans cells
۵ -Merkel cells
۶ -Stratum basale
۷ -Stratum spinosum
۸ -Stratum granulosum
۹ -Stratum lucidum
۱۰ -Stratum comeum

- هیپودرم (Hypodermis)

بافت همبند سستی است با ضخامت متغیر و حاوی مقدار زیادی سلول چربی که بافت زیرجلدی^۱ نیز نامیده می شود. کار اصلی این لایه، چسباندن پوست به ارگان های زیرین خود می باشد و در عین حال امکان لغزش پوست بر روی آنها را نیز فراهم می آورد. این لایه حاوی رگ های خونی بزرگ، فولیکول مو و اجسام پاسینی^۲ است. شریان های بزرگ هیپودرم بواسطه انشعابات شبکه جلدی موجود در حد فاصل درم و هیپودرم، ساختمان های درمی و هیپودرمی را تغذیه می کنند.



شکل ۱-۲- اجزای ساختاری پوست : شامل اپیدرم و درم به همراه بافت همبند زیرین موسوم به هیپودرم (Gray, ۱۸۷۸)

۱-۱-۶- فولیکول مو : یکی از ضمائم پوست

ضمائم پوست شامل مو، غدد چربی، غدد عرق و ناخن می باشد که همگی از مشتقات طبقه قاعده ای اپیدرم هستند (Fuchs, ۲۰۱۶). موها، ساختمان‌هایی شاخی و طویل هستند که از تو رفتگی اپی‌تلیوم اپی‌درم به نام فولیکول مو منشأ می گیرند. فولیکول مو، ارگانی کوچک، بسیار حساس و تخصص یافته است که اهمیت آن به دلیل توانایی فولیکول مو در تولید مو و بازسازی ساختارش است (Müller-Röver et al. ۲۰۰۱; Sato et al. ۱۹۹۹).

^۱ -subcutaneous tissue

^۲ -Pacian corpuscle

فولیکول موی بالغ از سلول‌های کراتینوسیت اولیه تشکیل شده که این سلول‌ها به لایه‌های مختلف سلولی تقسیم می‌شوند. ترتیب این لایه‌های سلولی شامل ساقه‌ی مو^۱، غلاف داخلی ریشه^۲ و غلاف خارجی ریشه^۳ است. فولیکول مو از بر همکنش‌های متقابل بین اپی‌تلیال (اکتودرمی) - مزانشیمال (مزودرمی) به وجود آمده است که این برهم‌کنش‌های مولکولی لازمه رشد و تکامل فولیکول مو ضروری می‌باشد (Dlugosz, ۱۹۹۹). شکل‌گیری ساختار فولیکول مو نیازمند تنظیم و کنترل بر همکنش‌ها و فاکتورهای تنظیم‌کننده از جمله فاکتورهای رشد، هورمون‌های رشد، مسیرهای سیگنالینگ، سیتوکین‌ها، هورمون‌ها و نوروپپتیدها می‌باشد (Junqueira and Carneiro, ۲۰۰۵).

۱-۱-۶-۱- چرخه رشد فولیکول مو (Hair Follicle Growth cycle)

علیرغم سایر ارگان‌های بدن، فولیکول مو قابلیت احیا و ترمیم مجدد خود را دارد. فولیکول مو در همه جانداران متحمل سیکل‌هایی از رشد و سرکوب فرآیند رشد می‌شود که این فرآیند در طول حیات جاندار، همیشه فعال اند. این سیکل‌ها عبارتند از: مرحله‌ی سریع رشد (آنژن^۴)، مرحله‌ی سرکوب رشد (کاتژن^۵) و مرحله‌ی خاموشی و سکون (تلوژن^۶)؛ البته مرحله‌ی دیگری به نام اگزوژن^۷ نیز وجود دارد که این مرحله، در هر سیکل اتفاق نمی‌افتد و مرحله‌ی خورد شدن مو است (Dlugosz, ۱۹۹۹; Millar, ۲۰۰۲).

الف) فاز آنژن

از لحاظ هیستولوژیکی، در این مرحله، فولیکول‌های مو دارای طول بلند و همچنین بسیار محکم اند. سلول‌های زایای ماتریکس، دارای طول دوره‌ی تکثیر ۱۸ ساعته می‌باشند. سلول‌های دختر حاصل از تکثیر، در این مرحله به نواحی بالاتر مهاجرت می‌کنند و یکی از شش قسمت از نواحی ساقه مو و غلاف داخلی ریشه را تشکیل می‌دهند (Dlugosz, ۱۹۹۹; Alonso and Fuchs, ۲۰۰۶). در موش شروع مرحله‌ی آنژن در حدود روز دوازدهم از آغاز جنینی است. اولین شروع فاز آنژن به طور تقریبی در روز ۲۵ آغاز و تا روز ۴۰ ادامه پیدا می‌کند (Oro and Higgins, ۲۰۰۳). در هر زمانی بطور متوسط ۸۵ درصد موها در مرحله آنژن می‌باشند.

۱ -Hair shaft (HS)
۲ -Internal root sheath (IRS)
۳ -Outer root sheath (ORS)
۴ -Anagen
۵ -Catagen
۶ -Telogen
۷. Exogen

ب) فاز کاتازن

کاتازن، انتقالی پویا بین مرحله‌ی آناتزن و تلوزن و دوره کوتاهی است که طی آن تقسیم سلول‌های ماتریکسی متوقف می‌شود. در این مرحله، سیکل‌های سلولی در کمترین آستانه‌ی خود هستند و تمامی فولیکول‌ها در حالت سرکوب رشد قرار دارند. فولیکول‌ها وارد مرحله‌ای می‌شوند که شامل سلول‌های آپتوزی در نواحی بالب و غلاف خارجی ریشه و خارجی‌ترین لایه‌ی اپی‌تلیالی هستند. با توقف تمایز ساقه مو، انتهای آن بسته و غیرقابل تکثیر می‌شود. تمام طول ساقه‌ی مو شاخی شکل و بدون انعطاف می‌شود. این در ناحیه‌ی درمال پاپیلا نیز مشاهده می‌شود و تمامی این ناحیه سرشار از تعداد بسیار زیادی از سلول‌های آپو پتوتیک می‌گردد (Alonso and Fuchs ۲۰۰۶).

ج- فاز تلوزن

بلافاصله به دنبال مرحله‌ی کاتازن، سلول‌ها در دوره‌ی ای از کمون وارد می‌شوند که تلوزن نام دارد. در این دوره همه فعالیت‌های سلولی متوقف می‌شود. در موش، طول دوره‌ی تلوزن بسیار کوتاه است و اولین دوره‌ی تلوزن، حدود ۱ تا ۲ روز است که از حدود روزهای ۱۹ تا ۲۱ بارداری است (Alonso and Fuchs ۲۰۰۶).

۱-۱-۶-۲- آناتومی فولیکول مو

یک تار مو شامل سه قسمت ساقه مو (قسمتی که از پوست خارج شده و قابل رویت است)، ریشه مو (قسمتی که زیر پوست قرار گرفته)، فولیکول مو (مسیری لوله مانند در ناحیه درم که ریشه مو در آنجا رشد می‌کند) می‌باشد. فولیکول مو از بافت اپی‌درمی و درمی تشکیل شده است. اجزای درمال شامل پاپیلا و غلاف درمی می‌باشد که از تجمع سلول‌های مزانشیمی ساخته شده است که مستقیماً لایه‌ی زاینده‌ی اپی‌تلیال مو را در ابتدای رشد فولیکول مو تشکیل می‌دهند. لایه‌ی زاینده‌ی اپی‌تلیالی به سمت پایین برای تشکیل پیاز مو که سازنده‌ی تمام قسمت‌های تنه‌ی مو می‌باشد، رشد می‌کند. کراتینوسیت‌ها در تماس مستقیم با سلول‌های درمال پاپیلا هستند. این سلول‌های تخصص یافته‌ی هستند که در ناحیه‌ی بالب فولیکول مو قرار دارند. این سلول‌ها دستخوش تقسیم‌های میتوز متوالی شده و در نهایت منجر به تجدید سلول‌های بنیادی ماتریکس می‌شوند. سلول‌های بنیادی دختر از ماتریکس به نواحی بالاتر مهاجرت می‌کنند و یکی از شش لایه‌ی غلاف بیرونی ریشه و شفت مو را شامل می‌شوند. سلول‌های تکثیرشونده‌ی ماتریکس دارای دوره‌ی تکثیر ۱۸ ساعته هستند (Wong et al. ۲۰۰۶).

*اجزای ساختاری فولیکول موی بالغ عبارتند از (شکل ۱-۳) :

- ✓ لایه‌های سلولی اپی‌تلیالی فولیکول موی بالغ واقع در اطراف ساقه‌ی مو
- ✓ ناحیه‌ی بالب^۱ یا پیاز مو : بعنوان عمیق‌ترین و انتهایی‌ترین ناحیه‌ی فولیکول مو است و شامل قسمتی مزانشیمی به نام درمال پاپیلا که باعث تکثیر سریع سلول‌های ماتریکس مو می‌شود.
- ✓ غلاف داخلی ریشه مو : که مجاور تنه قرار دارد و به دلیل اینکه فاقد پیگمان است به راحتی از تنه مو قابل تشخیص است. این غلاف که تنه مو را می‌پوشاند از سه لایه سلولی تشکیل یافته است :
 - (۱) کوتیکول^۲ : فلس مانند بوده و از یک ردیف سلول پهن شاخی تشکیل یافته است.
 - (۲) طبقه هاکسلی^۳ : از یک تا سه ردیف سلول شاخی شده تشکیل شده است.
 - (۳) طبقه هنله^۴ : از یک ردیف سلول کشیده که به غلاف بیرونی چسبیده اند، تشکیل شده است (Cotsarelis G, ۲۰۰۶).

✓ غلاف خارجی ریشه مو : که محدوده‌ی آن از سلول‌های ماتریکس که در قاعده‌ی فولیکول قرار دارد تا ورودی مجرای غده‌ی سباسه امتداد دارد و در برگیرنده عضله راست کننده مو^۵ می‌باشد. این غلاف در ناحیه‌ی بالب نازک‌تر بوده و در قسمت میانی فولیکول ضخیم می‌شود. در لایه سلولی قاعده‌ای، ملانوسیت‌ها فاقد ملانین اند اما اپیدرم سطحی حاوی ملانوسیت فعال می‌باشد. ملانوسیت‌های غیرفعال در لایه بازال این بخش، بعد از آسیب فعال می‌شوند، تکثیر می‌یابند و به بخش فوقانی و به سمت اپی‌درم حرکت می‌کنند (Dlugosz, ۱۹۹۹; Schneider et al. ۲۰۱۰). "ناحیه‌ی بالج^۶" قسمت تخصص یافته از غلاف ریشه‌ای خارجی است که در زیر غده‌ی چربی واقع شده و حاوی سلول‌هایی با خاصیت بنیادی است بعبارت دیگر کنام سلول‌های بنیادی اپیدرمی بشمار می‌رود.

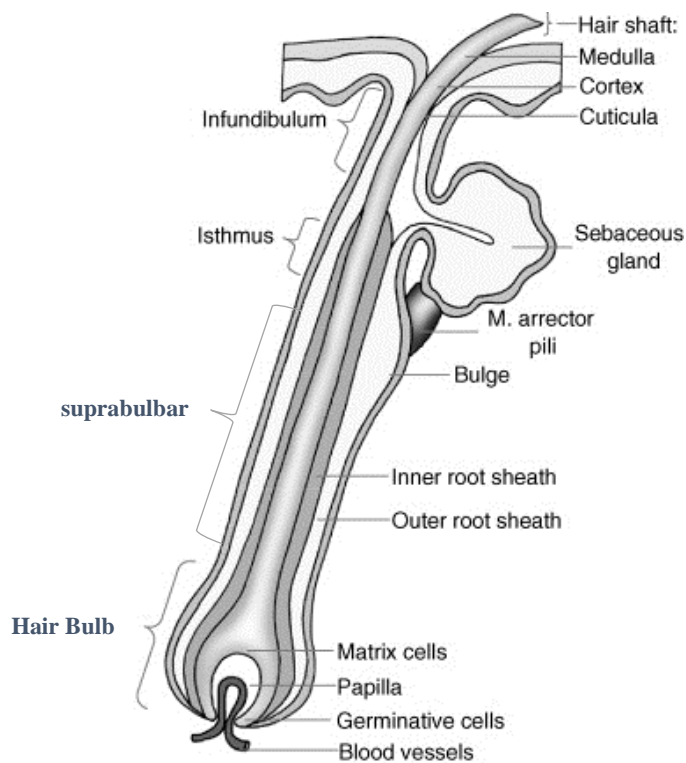
*ساقه‌ی مو (HS) نیز از سه لایه تشکیل شده است که عبارتند از (شکل ۱-۳) :

- (۱) مغز یا مدولا^۷ : در مرکز مو قرار دارد. فقط در موهای ضخیم یا نهائی بدن^۸ یعنی موهای معمولی می‌باشد و موهای ظریف یا کرکی فاقد مغز می‌باشند.

۱- Bulb area
۲- Cuticle
۳- Huxley's layer
۴- Henle's layer
۵- Arrector pili muscle
۶- Bulge area
۷- Medulla
۸- Terminal hairs

۲) قشر یا کورتکس^۱: لایه اطراف مغز مو که ضخامت عمده مو را تشکیل داده و استحکام و حالت مو را مشخص کرده و بدلیل وجود رنگدانه های ملانین در سلول های این لایه، تعیین کننده رنگ مو نیز می باشد.

۳) کوتیکول: متشکل از یک ردیف سلول پهن و کاملاً شاخی شده می باشد که نحوه قرارگیری شان باعث نفوذپذیری و انعطاف پذیری مو می گردد. این لایه نازک و بدون رنگ می باشد و نقش آن محافظت از لایه ضخیم و ملانین دار کورتکس می باشد.



شکل ۱-۳- ساختار فولیکول مو: شامل تنه، ریشه و ماهیچه های نگهدارنده ای اطراف فولیکول مو است

۱-۶-۳- تکامل آناتومیکی یا تشریحی فولیکول مو

تشکیل این ارگان کوچک مستلزم مراحل سه گانه ای تکامل آناتومیکی به شرح ذیل می باشد:

۱) مرحله ای آغاز: در این مرحله، سیگنال های Wnt از سوی سلول های مزانشیمالی صادر می شود که نتیجه ای آن، تغییر سلول های اپی تلیالی به پلاکود^۲ است.

۱- Cortex
۲- placod

۲) مرحله‌ی آرایش و سازماندهی: در این مرحله نیز بر همکنش‌های پیچیده‌ای از سیگنال‌ها وجود دارد. باتکثیر و تمایز سلول‌های اپی‌تلیالی، سلول‌های درمال و متعاقب آن بافت درمال را به وجود می‌آورند؛ این بافت با ارسال سیگنال‌هایی از جانب خود، باعث رشد و تکثیر بافت‌های زیرین می‌شود.

۳) مرحله‌ی تمایز بافتی: در این مرحله، لایه‌ی درم توسط سلول‌های اپی‌تلیالی گسترده می‌شود. بدین گونه که ناحیه‌ی درمال پاپیلا را به وجود می‌آورند. این فرآیند باعث شکل‌گیری فولیکول مو می‌شود. استقرار فولیکول مو در درم، توسط رسپتورهای اکتوپلازی سیگنال‌های Edar-BMP و بر همکنش‌های متقابل بین سیگنال‌ها مشخص می‌شود. Edar به طور مستقیم باعث فعالیت β -catenin در تثبیت مکانی فولیکول مو می‌شود.

در فولیکول موی بالغ نخستین «سلول‌های بنیادی اپیدرمی»، با تجمع در ناحیه‌ی فوقانی فولیکول مو «ناحیه‌ی بالچ» را به وجود می‌آورند (Rishikaysh et al. ۱۹۹۹).

۱-۱-۷- سلول‌های بنیادی فولیکول مو^۱

۱-۱-۷-۱- زیست‌شناسی سلول‌های بنیادی فولیکول مو

جمعیت‌های سلول‌های بنیادی پوست در مکان‌های خاصی درون اپیدرم مستقرند. این جایگاه‌های مجزا عبارتند از: "فولیکول موی اپیدرمی"، "اپیدرم بین فولیکولی"^۲ و "غدد سبابه" که به لحاظ سازمان‌یابی بافتی و عملکردی و نیز کیفیت ریزمحیط یا کنام‌شان کاملاً متفاوت از یکدیگرند. ناحیه بالچ فولیکول مو بعنوان مخزنی از سلول‌های بنیادی برای پوست و مو عمل می‌کند بطوریکه سلول‌های بنیادی فولیکول مو بصورت زیرمجموعه‌های متمایز مستقر در ناحیه بالچ غلاف خارجی ریشه‌ی فولیکول مو (Liu et al. ۲۰۱۳)، سلول‌هایی با چرخه آهسته^۳ آند که لیبیل خود را برای مدت زمان نسبتاً طولانی پس از القای فاز آناتن حفظ می‌کنند؛ و از آنجائیکه که به ندرت وارد مرحله تقسیم میتوز می‌شوند، شاخصی برای سلول‌های بنیادی اند. (Cotsarelis, ۲۰۰۶). اهمیت این سلول‌ها ناشی از دو ویژگی مهم است که آنها را از سایر سلول‌های بنیادی بالغ متمایز می‌کند. نخست آن که دسترسی آسانی داشته و قابلیت تکثیر طولانی مدت دارند و دوم نیز قابلیت تمایز به انواع سلول‌های اکتودرمی و مزودرمی را دارند. این سلول‌ها بطور معمول با جداسازی از فولیکول‌های مو در محیط آزمایشگاهی به صورت جمعیت‌های سلولی مشابه با سلول‌های بنیادی بالغ با توجه به مورفولوژی و مارکرهای سطح سلول توسعه می‌یابند. بعنوان مثال سلول‌های ناحیه بالچ موشی، مارکرهای اختصاصی مانند CD۳۴، K۱۹، CD۲۰۰ و K۱۵ را بیان می‌کنند (Cotsarelis, ۲۰۰۶). سلول‌های بنیادی فولیکول مو با داشتن طول عمر^۴ طولانی، نقش بسیار مهمی در مورفونزیس اپیدرم (Lenoir et al. ۱۹۸۸)، فولیکول‌های مو (Oshima et al. ۲۰۰۱; Blanpain et al. ۲۰۰۴) و غدد

۱- Hair Follicle Stem Cells (HFSCs)

۲- Interfollicular Epidermis (IFE)

۳- slow cycling

۴- lifespan

سبابه (Morris et al. ۲۰۰۴) ایفا می کنند و همچنین محافظ بافت پوست در برابر هموستازی طبیعی و ترمیم آسیب ها نیز می باشند. در موش بالغ، سلول های بنیادی ناحیه بالج در ارتباط با سایر دودمان های اپی تلیالی پوست هستند (Morris et al., ۲۰۰۴; Blanpain et al., ۲۰۰۱) Oshima et al., ۲۰۰۱) و در غیاب آنها مورفوژنیز طبیعی فولیکول های مو و غدد سبابه متوقف شده و روند بازسازی اپیدرمی بشدت تحت تأثیر قرار می گیرد (Jonathan et al. ۲۰۰۸).

۱-۱-۷-۲- پتانسیل تمایزی سلول های بنیادی فولیکول مو

سلول های بنیادی فولیکول مو بعنوان سلول های بنیادی بالغ -بافتی چندتوان یا مولتی پوتنت با پتانسیل تکثیری و تکوینی گسترده ای هستند (Hoffman, ۲۰۰۶; Cotsarelis, ۲۰۰۶) که قادر به تولید تمام سلول های اپیتلیالی پوست از جمله کراتینوسیت ها، سبوسیت ها و مو بوده (Inoue et al. ۲۰۱۱) و در عین حال قابلیت تمایز به دودمان های اکتوردرمی، مزودرمی و اندودرمی را دارند (Amoh et al. ۲۰۰۸, ۲۰۰۴). این سلول های بنیادی، توانایی تولید پیش ساز^۱ های تمایز یافته را نیز در محیط آزمایشگاهی حفظ می کنند. از این رو پروتکل های مختلف تمایزی با استفاده از فاکتورهای رشد و سایر فاکتورهای القاگر بهینه سازی شده است که می توانند به طور موفقیت آمیزی دودمان ها یا رده های خاصی را تولید کنند.

تا کنون وجود زیرمجموعه های متعددی از سلول های بنیادی با پتانسیل های تمایزی مختلف در فولیکول های مو، از جمله نستین مثبت^۲ (Li et al. ۲۰۰۳) و سلول های کراتین ۱۵ منفی^۳ (Amoh et al. ۲۰۰۵) ، سلول های بنیادی ستیغ عصبی-اپیدرمی^۴ (Sieber-Blum et al. ۲۰۰۴; Esmailzade et al. ۲۰۱۲) ، سلول های CD۳۴ مثبت^۵ (Amoh et al. ۲۰۰۵; Najafzadeh et al. ۲۰۱۵) و سلول های CD۲۰۰ مثبت^۶ (Ohyama et al. ۲۰۰۶) به اثبات رسیده اند. بعنوان مثال سلول های بنیادی بالج فولیکول موی CD۳۴⁺ به سهولت به دودمان های عصبی بویژه نورون هائی با مارکرهای عمومی سلولی تمایز می یابند (Najafzadeh et al. ۲۰۱۵) و یا سلول های بنیادی nestin⁺ ناحیه بالج رت قدرت تمایز به دودمان های گلیالی و نورونی را دارند (Nobakht et al. ۲۰۰۹).

۱-Progeny

۲-nestin-positive

۳-keratin 15-negative

۴-Epidermal-Neural Crest Stem Cells (Epi-NCSCs)

۵-CD۳۴-positive

۶-CD۲۰۰-positive

۱-۷-۳- کنترل تکوین فولیکول مو و میکروآرناها

در سطح مولکولی روند تکوین تا حد زیادی بواسطه فعال سازی و سرکوب برنامه های ژنی خاص از طریق مکانیسم های رونویسی، پس از رونویسی و ترجمه تحت کنترل قرار می گیرد لذا تنظیم برنامه های ژنی در ارتباط با شبکه ی پیچیده ای متشکل از مکانیسم های پیش خوردی^۱ و پس خوردی^۲ است که میکروآرناها یکی از اجزای بسیار مهم آن هستند. در مجموع می توان گفت miRNA ها و mRNA های هدف آن ها، متشکل از شبکه های تنظیمی متنوع قابل ملاحظه ای هستند (Lewis, ۲۰۰۳; Kim et al. ۲۰۰۵) که نقش مهم و متفاوتی را در تنظیم و تثبیت سرنوشت سلولی و نیز توقف برنامه های ژنی در دودمان های سلولی مختلف فولیکول مو ایفا می کنند (Andl T, ۲۰۱۵).

بنابراین، تکوین فولیکول مو و بازسازی ساختاری آن در دوران پس از تولد^۳ بواسطه تغییرات گسترده ای در میکروآرنا تومی و فعالیت سلولی آن مشخص می شود که توسط مسیر های سیگنالینگ متعدد، فاکتورهای رونویسی و تنظیم کننده های اپی ژنتیکی (اپی ژنتیک عبارتست از مطالعه تغییرات وراثتی در عملکرد ژن که شامل تغییرات در توالی DNA نمی شود) از جمله میکروآرناها کنترل می شود (Botchkarev et al. ۲۰۱۲; Frye et al. ۲۰۰۹; Schneider et al. ۲۰۰۳; al. بطور معمول، میکروآرناها نه تنها برای تکوین فولیکول مو بلکه برای رشد پس از تولد آن نیز ضروری هستند. miRNA های ویژه، بیان منحصر به فرد وابسته به مکان و زمان را در روند تکوین و چرخه فولیکول مو نشان می دهند (Yi et al. ۲۰۰۶). فراوانی متفاوت miRNA ها در سلول های اپیدرمی و دودمان فولیکول مو می تواند در اوایل روز ۱۷ ام نمو جنینی موش قابل تشخیص است (Yi et al. ۲۰۰۶). اعتقاد بر اینست که چنین تفاوت هائی در پروفایل بین میکروآرناها در دودمان های مختلف اپیدرمی پوست به ایجاد این دودمان های بسیار مشابه کمک می کند. حتی درون فولیکول مو، تفاوت های عمده ای بیان میکروآرناها بین نواحی بالچ، غلاف خارجی ریشه و سلول های ماتریکس مو مشهود است، در عین مشابهت بسیاری که در پروفایل بیان میکروآرناهای سلول های ناحیه بالچ و اپیدرم قاعده ای مشاهده می شود (Zhang et al. ۲۰۱۲). طبق مطالعات انجام شده، میکروآرناهای ویژه در پوست دوران پس از تولد در روشی وابسته به - سیکل مو و نوع سلول بیان می شوند بعنوان مثال فولیکول های مو در فازهای تلوزن و آنژن، تفاوت های قابل توجهی را در سطوح بیان میکروآرناهایشان نشان می دهند که به نوبه خود بیانگر اهمیت میکروآرناها در تنظیم روند تکثیر و آپوپتوزیس آنهاست (Mardaryev et al. ۲۰۱۰).

بعنوان نمونه ۲۴-miR از جمله میکروآرناهای با میزان بیان بسیار بالای پوست است که مستلزم تنظیم برنامه های تمایزی در فولیکول مو بوده و بطور عمده ای در کراتینوسیت های تمایز یافته ی غلاف داخلی ریشه بیان می شود (Amelio et al. ۲۰۱۳). بیان بسیار بالای ۲۴-miR در سلول های در حال تکثیر در طول مورفوزنریس پوست منجر به نمو غیر طبیعی HF توأم با کاهش در روند تکثیر و تمایز زودرس می گردد.

۱-feedforward

۲-feedback

۳-postnatal

۲۴- *miR* تنها میکروآرنا‌ی یافت شده تاکنون است که منحصراً در غلاف داخلی ریشه بیان شده و تمایز HF را در فاز آنژن تحت کنترل قرار می دهد. در میان miRNA های مختلف، *miR-۳۱* و *miR-۲۱۴* به فراوانی در کراتینوسیت های در حال تکثیر ماتریکس مو و غلاف خارجی ریشه در طول آنژن بیان می شود (Ahmed et al. ۲۰۱۴; Mardaryev et al. ۲۰۱۰). مهار فارماکولوژیکی *miR-۳۱* در پوست ناحیه پشت موش باعث پیشروی فاز آنژن شده و منجر به ایجاد نقایصی در ساقه مو می شود (Mardaryev et al. ۲۰۱۰). *miR-۳۱* اثرات خود را بر رشد مو، حداقل در این بخش از طریق تعدیل فعالیت مسیرهای سیگنالینگ BMP و FGF و همچنین از طریق تغییرات در بیان پروتئین های ساختاری مانند کراتین ۱۶ و کراتین ۱۷ می دهد (Mardaryev et al. ۲۰۱۰). در مقابل *miR-۳۱*، بیان بسیار بالای *miR-۲۱۴* منجر به رشد کوچکتر و کوتاهتر فولیکول های موی آنژن همراه با کاهش تکثیر در ماتریکس مو می شود. تأثیرات مهاری *miR-۲۱۴* روی رشد مو بواسطه هدف گیری فعالیت مسیرهای سیگنالینگ Wnt و Shh اعمال می شود (Ahmed et al. ۲۰۱۴). چنین اطلاعاتی نشانگر وجود یک لوپ-فیدبکی بین سیگنالینگ Wnt و روند کلی تنظیم ژن در سطح پس از-رونویسی بواسطه - میکروآرنا می باشد. بنابراین، *miR-۳۱* و *miR-۲۱۴* برای حفظ فاز آنژن بسیار ضروری بوده و شواهد محکمی را دال بر این مفهوم ارائه می دهند که بیان بسیار بالای miRNA ها در سلول های در حال تکثیر بمنظور حفظ تعادل بین تکثیر، تمایز و آپوپتوز حائز اهمیت اند.

۱-۱-۸- میکروآرناها (MicroRNAs or miRNAs)

۱-۱-۸-۱- معرفی میکروآرناها

ژنوم انسان متشکل از حدود ۲۰۰۰۰ الی ۲۵۰۰۰ ژن رمزکننده-پروتئین می باشد که فقط بخش بسیار کوچکی از مقدار کل DNA پستانداران را تشکیل می دهند در حالی که اکثریت عمده ی ترانس کریپتوم انسانی بصورت RNA های غیر-کدکننده ارائه می شوند. زیرگروه های مختلفی از RNA های غیر-کدکننده از جمله میکروآرناها، روند بیان ژن را بواسطه تنظیم آرایش کروماتین، رونویسی، ترجمه و تغییرات RNA در میان دیگر موارد تنظیم می کنند.

میکروآرناها در سال ۱۹۹۳ در نماتودها یعنی در *Caenorhabditis elegans* یافته شده اند (Lee et al. ۱۹۹۳) و رده ای از RNA های غیر کد کننده ی طبیعی کوچک حدود ۲۰-۲۲ نوکلئوتیدی بصورت واحد های مستقل رونویسی یا اینترون های سایر ژن ها و بعنوان تنظیم کننده بیان ژن در سطح پس از-رونویسی از طریق تجزیه ی mRNA یا مهار ترجمه می باشند. miRNA ها عمل تنظیم بیان ژن را با اتصال به "ناحیه غیرقابل ترجمه ی انتهای ۳' یا ۳'UTR" مولکول mRNA انجام می دهند. جفت شدن-بازهای نوکلئوتیدی یک میکروآرنا با ناحیه ۳'UTR مولکول mRNA ی هدف آن می تواند منجر به تجزیه یا مهار

۳'UTR (Un Translated Region) ۱-۲

روند ترجمه گردد. در ژنوم انسان بیش از ۶۰٪ از mRNA های رونویسی شده تحت کنترل تنظیمات میکروآرنا هستند (Friedman et al. ۲۰۰۹). یکی از مهم ترین روش های تنظیم ترجمه ی mRNA ی خاص ، ساخت RNA ی کوچکی است که مکمل بخشی از آن mRNA ی ویژه باشد. به نظر می رسد که میکروآرناها علاوه بر تنظیم ترجمه قادر به خاموش کردن برخی ژن ها در سطح رونویسی نیز هستند که اغلب این ژن ها واقع در ناحیه هتروکروماتین (ناحیه ای از ژنوم که DNA به شدت فشرده است و نوکلئوزوم های متراکم از انجام رونویسی جلوگیری می کنند) است . miRNA ها بعنوان سرکوب گر فعالیت های ژن در گیاهان و جانوران عمل کرده و نقش مهمی در کنترل تکوین ، تمایز ، تکثیر ، انعطاف پذیری ، ارگانوژنزیس ، فعالیت سلول های بنیادی ، کنترل رشد و آپوپتوزیس دارند (Andl et al. ۲۰۰۶; Poy et al. ۲۰۰۴; Yi et al. ۲۰۰۵, Chen et al. ۲۰۰۴). بعلاوه، میکروآرناها بمنظور تعدیل سرنوشت سلولی با سایر تنظیم کننده های رونویسی (فاکتورهای رونویسی و تنظیم کننده های اپی ژنتیکی) همکاری کرده و شبکه های تنظیمی ژن را تثبیت می کنند (Herranz and Cohen. ۲۰۱۰; Pelaez and Carthew. ۲۰۱۰). برآورد شده حدود ۳۰-۸۰٪ از ژن های رمزکننده- پروتئین احتمالاً توسط miRNA ها تنظیم می شوند. یک miRNA منفرد ممکن است با کل مجموعه ژن ها برهم کنش دهد در حالی که بیان یک ژن منفرد ممکن است توسط miRNA های متعددی کنترل شود (Friedman R C et al , ۲۰۰۹).

۱-۱-۸-۲- بیوژنزیس استاندارد میکروآرناها

ژن های رمز کننده میکروآرناها بطور معمول یا درون یک ژن میزبان^۱ و یا درون نواحی اینترونی قرار دارند. در مسیر بیوژنزیس استاندارد^۲ میکروآرناها (Gangaraju and Lin. ۲۰۰۹; Ha et al. ۲۰۱۴)، ژن های رمز کننده میکروآرنا توسط آنزیم RNA Polymerase II (Pol II) رونویسی شده و منجر به تولید نسخه اولیه طویلی موسوم به میکروآرنای اولیه^۳ یا pri-miRNA با ساختار موضعی سنجاق سری^۴ می شود؛ در چنین رونوشت اولیه میکروآرنا که ممکن است حاوی یک یا چندین تکرار از توالی میکروآرنا باشند، در محل وجود توالی های مکمل معکوسی یا پالیندرومی ، ساختارهای سنجاق سری یا ساختارهای موسوم به ساقه - حلقه^۵ تشکیل می گردد. این رونوشت بعداً توسط مجموعه ریز پردازنده^۶ ی موجود در هسته متشکل از Drosha (RNA اندونوکلاز) و DGCR^۸ یا "شریک دروشا"^۷ موسوم به Pasha (نوعی پروتئین متصل شونده به RNA - پردازش شده و تبدیل به Pre-miRNA حدوداً ۷۰ نوکلئوتیدی می شود که توسط

^۱ - Host Gene

^۲ - Canonical pathway

^۳ - primary miRNAs (pri-miRNA)

^۴ - Hair pin

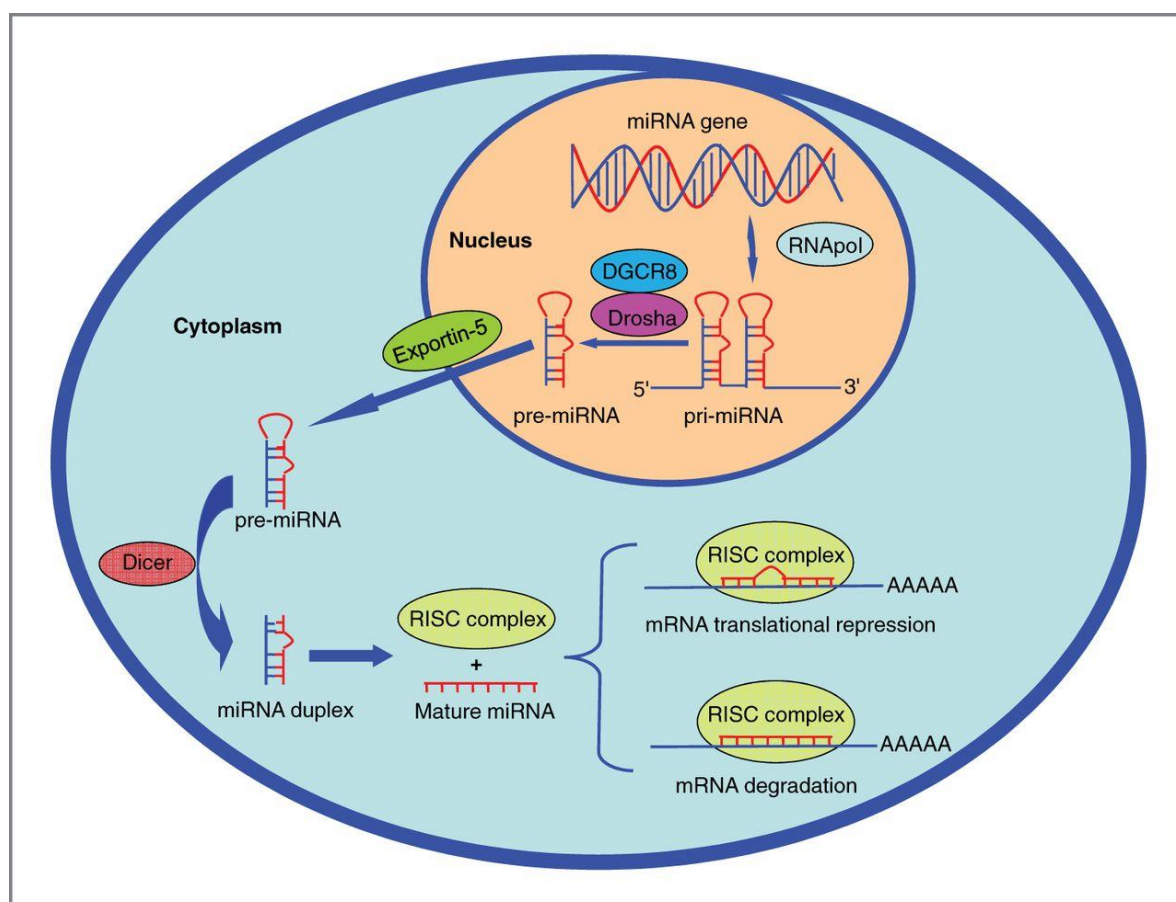
^۵ - stem & loop

^۶ - microprocessor

^۷ - DiGeorge syndrome Critical Region gene ۸ (DGCR^۸)

^۸ - Partner of Drosha (Pasha)

پروتئین Exportin-5 به سیتوپلاسم فرستاده می شود. Pre-miRNA پس از ورود به سیتوپلاسم مجدداً توسط آنزیم RNAase دیگری به نام Dicer با حذف حلقه بازهای جفت نشده به miRNA ی دو رشته ای بالغ طویل حدوداً ۲۲- نوکلئوتیدی متشکل از رشته های پیشرو^۱ و پیرو^۲ پردازش می شود؛ از طرفی دایسر بعنوان هلیکاز نیز عمل کرده و با جدا کردن رشته های میکروآرنا ی دو رشته ای آنها را به miRNA های تک رشته ای تبدیل می کند. سپس رشته پیشرو با اتصال به مجموعه ای از پروتئین ها "کمپلکس خاموش کننده القاء شونده"^۳ با miRNA موسوم به "miRISC" را ساخته و به جایگاه های هدف خود یعنی ناحیه ۳' UTR آن هم بواسطه قطعات ۶-۸ نوکلئوتیدی واقع در انتهای ۵' مولکول miRNA که تحت عنوان جایگاه اتصالی mRNA های هدف بر روی مولکول miRNA هستند، متصل می شود و بسته به طول ناحیه مکمل ما بین miRNA و mRNA هدفش باعث مهار ترجمه آن mRNA و یا تجزیه آن می گردد (شکل ۱-۴).



شکل ۱-۴ - شماتیکی از مسیر بیوژنیز miRNA ها و مکانیسم سرکوب بیان ژن (Bin et al. ۲۰۱۳)

۱ -Leading strand

۲ -Lagging strand

۳ -RNA Induced Silencing Complex (RISC)

۱-۱-۸-۳- میکروآرناها و سلول های بنیادی

مشخصه یک سلول بنیادی، توانایی آنها برای خودنوزائی و تولید سلول های دختری تمایز یافته متعدد است (Hsu and Fuchs. ۲۰۱۲). تقسیمات روند خود-نوزائی سلول های بنیادی توسط مکانیسم های درون سلولی و بین سلولی کنترل می شود (Lin, ۲۰۰۲). در حالی که مکانیسم های بین سلولی شامل سیگنالینگ سلول های کنام مجاور و مکانیسم های درون سلولی شامل بیان افتراقی ژن هائی است که در سطوح اپی ژنتیک، رونویسی، ترجمه و پس از ترجمه کنترل می شوند. در طول این تقسیم منحصر به فرد که تحت عنوان تقسیم نامتقارن^۱ نیز شناخته می شود، سلول های بنیادی، سلول های دختری را به منظور تعیین سرنوشت شان از طریق تعدیل مکانیسم های تنظیمی متعدد ضمن حفظ وضعیت بنیادین آنها برنامه ریزی مجدد^۲ می کنند. بنابراین، برنامه ریزی مجدد سلول های دختری با تغییرات همزمان در پروفایل بیان ژن بمنظور خاموش کردن توانائی خودنوزائی و نیز روشن کردن ژن های اختصاصی سرنوشت-سلول، توأم می شود.

تحقیقات اخیر نشان می دهد miRNA ها، نقش مهمی در تنظیم روند خود-نوزائی سلول های بنیادی و تمایز با سرکوب کردن ترجمه mRNA های هدف در سلول های بنیادی و سلول های دختری در حال تمایز ایفا می کنند (Gangaraju and Lin. ۲۰۰۷). چنین نقش هایی در سلول های بنیادی جنینی، سلول های بنیادی رده زایا^۳ و سلول های بنیادی بافت های سوماتیک متعدد مشاهده شده است. اخیراً miRNA ها بعنوان عوامل مهم در تنظیم ترجمه پدیدار شده اند و مستلزم کنترل سرنوشت و رفتار سلول های بنیادی می باشند (Blakaj and Lin. ۲۰۰۸) یعنی در طول تمایز، میکروآرناها به تثبیت و حفظ سرنوشت های سلولی خاص کمک می کنند (Ivey and Srivastava. ۲۰۱۰). در واقع می توان گفت miRNA ها، تنظیم کننده های بسیار مهم حفظ و تغییر وضعیت سلولی در طول تکثیر یا تمایز یا تکوین سلول های بنیادی بواسطه تنظیم منفی یا کاهش^۴ صد ها ژن هدف حفاظت شده در سطح پس از-رونویسی بوسیله جفت شدن جایگاه های اتصال miRNA ها در سر ۵' با ناحیه 3'UTR مولکول های mRNA ی هدف می باشند (Blakaj and Lin. ۲۰۰۸). miRNA ها وظایف بسیار مهمی در محدوده وسیع تغییرات ترانس کریپتومی دارند که در طول تغییرات سلولی رخ می دهد. در سلول های بنیادی سوماتیک و پیش ساز - اعم از سلول هائی که درگیر میوزنزیس، هماتوپویزیس، تکوین عصبی و تکوین پوست می شوند- عملکرد میکروآرناها تنظیم دقیق پیشبرد و تثبیت انتخاب های سرنوشت سلولی در قالب لوپ های فیدبکی مثبت و منفی می باشد. در مجموع این مکانیسم های تنظیمی منجر به پاسخ های مولکولی مناسب سلولی است که تمایز و عملکرد صحیح سلولی را امکان پذیر می سازند را امکان پذیر می سازند (Shenoy and Belloch. ۲۰۱۴).

^۱ -asymmetric division

^۲ -reprogramming

^۳ -germline stem cells

^۴ -downregulation

۱-۲- بیان مسئله

سلول های بنیادی فولیکول مو قابلیت القای تولید جمعیت فراوان دودمان های نورونی و گلیالی ، متعاقب انکوباسیون با فاکتورهای رشد اگزوزن یا خارجی را دارند (El Seady, ۲۰۰۸). نوروزنریس بعنوان فرآیند تولید نورون های بالغ و عملکردی از سلول های بنیادی و پیش ساز عصبی تعریف می شود. miRNA ها در تقریبا تمام فرآیندهای بیولوژیکی، از جمله نوروزن، شرکت کرده (Stefani and Slack, ۲۰۰۸; Lao and Hudson, ۲۰۱۰; Li and Jin, ۲۰۱۰; Shi et al, ۲۰۱۰). سلول های بنیادی عصبی قابلیت حفظ وضعیت تمایز نیافتگی و نیز تمایز یافتن به دودمان نورونی و گلیالی را دارند (Gage, ۲۰۰۰).

تنوع چشمگیر نورون های یافت شده در سیستم عصبی از مجموعه ی محدودی از پیش سازهای عصبی ، ناشی از برنامه های مختلف بیان ژن جهت کسب سرنوشت های متمایز سلولی می باشند. مدارک اخیر گویای آنست که miRNA ها تا حدود زیادی مستلزم ایجاد مشخصات سلول عصبی در طول القای عصبی، تمایز نورونی و تخصصی سازی زیرمجموعه ها می باشد (Stappert et al, ۲۰۱۵). بطور ویژه ای، تصمیمات زیرگروه نورونی اغلب وابسته به جفت های متقابل-سرکوبگر فاکتورهای رونویسی می باشد که ممکن است توسط miRNA ها مورد تنظیم قرار گیرند (Nam et al, ۲۰۱۱).

به هنگام القای سرنوشت عصبی شبکه بسیار هماهنگی از عوامل تکوینی، تکثیر و تمایز و نیز توزیع مکانی پیش سازهای نورونی را تنظیم می کنند. فراوانی این عوامل توسط مجموعه خاصی از miRNA های فراوان- مغزی تحت تنظیم- دقیق واقع می شود. بطوری که نقش *miR-124*، *miR-125b*، *miR-137*، *miR-9* و *let-7* در پیشبرد روند تمایز عصبی به اثبات رسیده است اما میکروآرناهای دیگری نیز مانند *miR-134* و *miR-184* مستلزم حفظ و تکثیر پیش سازهای عصبی می باشند. بعلاوه ممکن است میکروآرناها تغییر سرنوشت را از نورونی به گلیالی را تنظیم کرده و تولید آستروسیت ها و الیگودندروسیت ها را به پیش برند (He et al, ۲۰۱۲ ; Zheng et al, ۲۰۱۱).

بعنوان مثال ، REST-SCP1 کمپلکس پروتئینی خاموش کننده ژن های نورونی در سلول های غیر نورونی می باشد که از طریق چرخه های فیدبکی میکروآرناهای اختصاصی-نورونی یعنی *miR-9* و *miR-124* را در پیش سازها سرکوب می کند. در طول تمایز، خروج از سیکل سلولی با فعال سازی برنامه رونویسی اختصاصی-نورونی همراه می شود. در طول این فرآیند، میکروآرناها برای تخصصی سازی عملکردی و مورفولوژیکی نورون های در حال تمایز ضروری اند. چنین نقشی تا حدودی بواسطه هدف گیری فاکتورهای اپی ژنتیکی و سرکوب گرهای رونویسی حاصل می شود (Shenoy and Belloch, ۲۰۱۴)؛ و یا میکروآرنا *let-7b* روند تکثیر و تمایز سلول های بنیادی عصبی را با هدف گیری تنظیم کننده سلول بنیادی یعنی TLX^۱ (یا NR2E1^۲) و تنظیم کننده سیکل سلولی یعنی CyclinD1 (یا CCND1) مورد تنظیم قرار می دهد (Zhao et al, ۲۰۱۰).

۱- Tailless

۲- Nuclear Receptor subfamily ۲ group E member ۱

از طرف دیگر شواهد جدید حاکی از آنست که miRNA ها تا حدود زیادی مستلزم ایجاد مشخصات نورونی در طول القای عصبی ، تمایز نورونی و اختصاصی بودن زیرمجموعه ها ، تنظیم مهاجرت عصبی ، رشد خارجی نوریت ها و انعطاف پذیری سیناپسی (Siegel et al. ۲۰۱۱) است . میرناها نقش مهمی در بیولوژی سلول های بنیادی ایفا می کنند (Lang et al. ۲۰۱۲) . برخی از میرناهای اختصاصی – بافت ، می توانند بواسطه کنترل سطح سرکوب گرهای عمومی بیان ژن منجر به پایداری سلول های خاصی شوند (Ponomarev et al. ۲۰۱۳) .

طبق مطالعات مختلف مشخص شده که سه میکروآرنا *miR-124* ، *miR-9* و *let-7b* میکروآرناهای اختصاصی بافت عصبی بوده و مؤثر در روند نوروزنزیس و تمایز عصبی می باشند. البته در میان میکروآرناهای فراوان-مغز عملکردهای *miR-124* و *miR-9* در پیشبرد تمایز نورونی تا حدود زیادی مورد مطالعه قرار گرفته است (۲۰۱۴ Akerblom and Jakobsson ; Coolen et al. ۲۰۱۳)؛ چرا که هر دو میکروآرنا با شبکه های تنظیمی ژن و تغییرات ژنتیکی جهت القای بیان برنامه تمایز نورونی برهم کنش می دهند. همانطور که قبلاً در سال ۲۰۰۵ نشان داده شده ، بیان بیش از *miR-124* در سلول های سرطانی *Hela* قادر به تغییر پروفایل بیان خودشان به شکل مشابه با سلول های نورونی می باشد (Lim et al. ۲۰۰۵) .

تا کنون از طیف گسترده ای از القاگرها در مطالعات مختلف جهت القای تمایز عصبی سلول های بنیادی بالچ فولیکول مو مانند نوروتروفین ۳ یا ۳-NT^۱ (Nobakht et al. ۲۰۱۰) ، فاکتور نوروتروفیک مشتق از مغز (BDNF)^۲ و فاکتور نوروتروفیک مشتق از رده سلول های گلیال (GDNF)^۳ (El Seady et al. ۲۰۰۸) ، Neuregulin-۱ (Sieber-Blum . ۲۰۰۴) و محیط کشت RPMI-۱۶۴۰^۴ حاوی ۱۰٪ از سرم یا FBS^۵ (Amoh, ۲۰۰۹) مورد استفاده قرار گرفته است. محیط های کشت مکمل احتمالاً قابلیت تحت تأثیر قرار دادن روند تمایز سلولی را دارند چرا که گروهی از مطالعات ثابت کرده اند پروتکل محیط های عاری از سرم منجر به تسهیل روندهای نوروزنزیس و آستروژنزیس در سلول های بنیادی فولیکول مو در محیط های *in vitro* می شود ؛ همچنین تیمار با رتینوئیک اسید تمام ترانس^۶ (ATRA) نیز تعداد نوروها را نسبت به شرایط کنترل افزایش می دهد؛ لذا ما برای اولین بار با استفاده از پروتکل جدید القای نورونی که شامل محیط کشت DMEM-F۱۲^۷ ، BDNF^۸ ، EGF^۸ ، ATRA ، bFGF^۹ و محیط حاوی ۱۰٪ سرم می باشد سلول های بنیادی فولیکول مو را به سلول های عصبی یعنی نورونی یا گلیالی تمایز داده و بیان میرناهای عصبی انتخاب شده و موردنظر یعنی *miR-124* ، *miR-9* و *let-7b* را قبل و بعد از تمایز نورونی با استفاده از روش Real-time PCR مورد بررسی قرار دادیم .

۱-Neurotrophin-۳

۲-Brain-Derived Neurotrophic Factor

۳-Glial cell line-Derived Neurotrophic Factor

۴ -Roswell Park Memorial Institute

۵ -Fetal Bovine Serum (FBS)

۶ -All Trans Retinoic Acid

۷ -Dulbecco's Modified Eagle's medium

۸ -Epidermal Growth Factor

۹ -basic Fibroblast Growth Factor

سپس بر مبنای نتایج حاصل miRNA ئی را که بیان بالاتری را داشته بعنوان مهم ترین miRNA از بین miRNA های مورد مطالعه بعد از تمایز نورونی انتخاب کرده و عملکرد آن را با استفاده از تکنیک Transfection of miRNA که جزو آزمایشات مولکولی "کسب و فقدان عملکرد"^۱ است، در سلول های تمایز یافته فولیکول مو جهت حصول اطمینان از درستی انتخاب این میکروآرنا بعنوان miRNA ی عصبی مؤثر در تمایز نورونی سلول های بنیادی مورد مطالعه یعنی HFSC ها مورد بررسی قرار دادیم .

۱-۳- ضرورت انجام تحقیق

بیماری های تحلیل برنده عصب^۲ از قبیل پارکینسون، هانتینگتون، آلزایمر، ام اس و آسیب نخاعی به دلیل از بین رفتن سلول های گلایالی و نورونی در مغز و نخاع می باشند، به عنوان مثال در مالتیپل اسکلروزیس^۳ الیگودندروسیت ها و میلین آکسون ها توسط مکانیسم های التهابی تخریب می شوند. دمیلینه شدن موجب از بین رفتن عملکرد صحیح سلول های عصبی می شود. بهبود اختلالات سیستم عصبی مرکزی^۴ به دلیل توانایی محدود CNS پستانداران در جایگزینی سلول های از دست رفته، جایگزینی میلین آسیب دیده و برقراری اتصالات مجدد عصبی به گندی صورت می گیرد و ناکافی است (Bonab et al. ۲۰۰۷). با وجود ترمیم هایی که در CNS رخ می دهد و استفاده از داروهای تعدیل کننده ایمنی یک نیاز آشکاری برای درمان های پیشرفته حس می شود. بنابراین ضرورت دارد که از سلول های اگزوزن برای ترمیم CNS آسیب دیده و بازیابی عملکرد استفاده شود. سلول های بنیادی دارای توانایی خود نوزایی و تمایز به چندین دودمان می باشند. بنابراین سلول درمانی ابزاری برای غلبه بر عدم موفقیت میلین سازی مجدد در ترمیم عصبی می باشد. انواع سلول های منتخب برای سلول درمانی در ترمیم بافت شامل سلول های بنیادی جنینی (Glaser et al. ۲۰۰۷)، سلول های بنیادی مزانشیمی (Mani et al. ۲۰۰۸) یا سلول های بنیادی عصبی می باشند (Lu et al. ۲۰۰۳). بیان ژن های ستیغ عصبی^۵ و نیز مارکرهای سلول های بنیادی عصبی توسط سلول های بنیادی فولیکول مو حاکی از پتانسیل تمایز عصبی این سلول ها می باشد (Sieber-Blum et al. ۲۰۰۶). انواعی از سلول های بنیادی فولیکول موی موشی موسوم به سلول های nestin⁺ برخی از مارکرهای سلول بنیادی مانند CD۳۴ را بیان کرده و می توانند به انواع سلول های غیر فولیکولار اعم از سلول های عصبی (Li L., ۲۰۱۰) تمایز یابند. با توجه به تنوع سلول های بنیادی فولیکول مو پتانسیل تمایز و تکثیر آنها تا حد زیادی وابسته به فاکتورهای رشد اگزوزن می باشد. مثلاً ۱-Neuroregulin مستلزم تمایز HFSC ها به سلول های شوآن و سلول های عصبی موسوم به بتا III توبولین مثبت^۶ می باشد (Sieber-Blum. ۲۰۰۴).

۱-gain and loss of function experiments

۲ -Neurodegenerative

۳- Multiple Sclerosis (MS)

۴- Central Nervous system

۵ -Neural Crest

۶-β-III tubulin⁺

به دنبال القای تمایز نورونی با پروتوکل القای نورونی، سلول‌های بنیادی به سلول‌های شبه نورونی تبدیل می‌شوند. پس از تمایز یافتن سلول‌های بنیادی، این سلول‌ها از سیکل سلولی خارج شده و مارکرهای مختلف عصبی را بیان می‌کنند. مثلاً سلول‌های بنیادی تاج عصبی - اپیدرمی مشتق از فولیکول‌های موی بینی موش، مارکرهای عصبی Nanog و Oct4 را بیان می‌کنند (Sieber-Blum M, 2008)؛ لذا نورون‌های حاصل از سلول‌های بنیادی فولیکول مو ارائه‌دهنده‌ی یک منبع بالقوه سلولی برای فراکاشت^۱ عصبی نه تنها در علم درماتولوژی بلکه در درمان اختلالات تحلیل‌برنده عصب و بیماری‌های سیستم عصبی نیز مورد توجه قرار گرفته است. می‌باشند (Amoh et al. 2005a, 2008; Sieber-Blum et al. 2006).

مطالعات حاکی از نقش miRNA‌ها بعنوان تنظیم‌کننده‌های بسیار مهم روند تکثیر، تمایز و انتخاب سرنوشت سلول‌های عصبی می‌باشند (Stappert et al. 2015). از طرف دیگر سه میکروآرنا‌ی موردنظر در این تحقیق یعنی miR-124، miR-9 و let-7b جزو میکروآرنا‌هایی هستند که تحت عنوان miRNA‌های فراوان - مغزی^۲ شناخته می‌شوند و تأثیر و عملکردشان به نحوی در طول نمو و تمایز عصبی به اثبات رسیده است.

miR-124، از جمله میرنا‌های اختصاصی - سیستم عصبی (Lagos-Quintana et al., 2002) و فراوان ترین میرنا‌ی مغزی است که ۲۵ الی ۴۸ درصد کل میرنا‌ها شامل می‌شود. این میرنا در پستانداران توسط سه ژن مستقل مستقر بر روی سه کروموزوم مختلف (miR-124-1، miR-124-2، و miR-124-3) رمز گردانی می‌شود (Lagos-Quintana et al., 2002) که در نورون‌ها (و نه آستروسیت‌ها) بیان شده و سطح آن در طول نمو سیستم عصبی افزایش می‌یابد (Krichevsky et al., 2003; Miska et al., 2005; Smirnova et al., 2004). چنین به نظر می‌رسد miR-124 در پستانداران، تضمین‌کننده تغییر بیان ژن‌های غیر-نورونی به نورونی باشد. miR-124، ممکن است صدها و حتی هزاران ژن مختلف را تنظیم نماید (Conaco et al. 2006; Hendrickson et al. 2009; Lim et al. 2005; Makeyev et al. 2008) و احتمالاً بواسطه سرکوب طیفی از mRNA‌های رمزکننده پروتئین‌های دخیل در تکثیر سلولی، در تمایز نورونی شرکت می‌کنند (Fang et al. 2012).

نمونه‌های مهم ژن‌های هدف شامل ژن‌های رمزگردان SCP^۳ بعنوان زیر واحد سرکوب‌گر عمومی ژن‌های اختصاصی - سیستم عصبی موسوم به REST^۴، فاکتورهای رونویسی Sox9^۵، لیگاند Jagged^۱ مسیر سیگنالینگ Notch، زیر واحد BAF53a^۶ مربوط به کمپلکس تغییر کروماتین و mRNA^۱ PTBP هستند (Cheng et al. 2009, Rajasethupathy et al. 2009, Visvanathan et al. 2007, Yoo et al. 2009).

^۱-transplantation

^۲-enriched-brain miRNAs

^۳-small C-terminal domain phosphatase 1

^۴-Repressor-Element-1 Silencing Transcription factor

^۵-Sry-type high-mobility-group box 9

^۶-Polypyrimidine tract-binding protein 1

REST بعنوان سرکوب گر رونویسی ژن های عصبی در بافت غیرعصبی از جمله *miR-124* است (Conaco et al. ۲۰۰۶). سطوح پایین REST توأم با بیان بالای *miR-124*، منجر به تمایز نهایی سلول های نورونی می شود (Visvanathan et al. ۲۰۰۷).

miR-124 با هدف گیری و سرکوب mRNA های غیر نورونی از جمله SCP1 (فسفاتاز کوچک اختصاصی فسفوسرین های دومین انتهای کربوکسیلی آنزیم RNA polymerase II که مستلزم عملکرد مسیر ضد-عصبی REST در سلول های غیر نورونی است) (Visvanathan et al. ۲۰۰۷) منجر به پیشبرد تمایز نورونی می شود (Yeo et al. ۲۰۰۵).

miR-9 هم یکی دیگر از میرناهای اختصاصی - سیستم عصبی است که در مراحل نوروزنزیس مغز بیان شده و نقش بسیار مهمی در نمو مغز مهره داران ایفا می کند. TLX رسپتور هسته ای منحصر بفرد (Qu et al. ۲۰۰۹) و تنظیم کننده ی سلول های بنیادی (Zhao et al. ۲۰۰۹) است که در مغز قدامی مهره داران بیان شده و یکی از ژن های هدف مهم *miR-9* است.

طبق تحقیقات، *miR-9*، با سرکوب بیان mRNA ی TLX و تنظیم منفی روند تکثیر سلول های بنیادی عصبی، تمایز عصبی را تسریع می کند. *miR-9*، حتی در سطح پس از رونویسی هم با سرکوب بیان TLX، باعث پیشبرد بیشتر بیان میرناها در طی تمایز می شود. TLX هم، بیان ژن یا pri-miRNA ی *miR-9* (Zhao et al. ۲۰۰۹) را سرکوب می کند. هم چنین لازم به ذکر است که این میرنا در سطح رونویسی هم توسط کمپلکس ضد-عصبی REST مورد سرکوب واقع می شود (Conaco et al. ۲۰۰۶, Deo M et al. ۲۰۰۶). بطوریکه در طول تمایز عصبی با هدف گیری کوفاکتور Co REST (یا *RCOR2*) مربوط به کمپلکس REST منجر به بیان خود و سایر ژن های نورونی می شود.

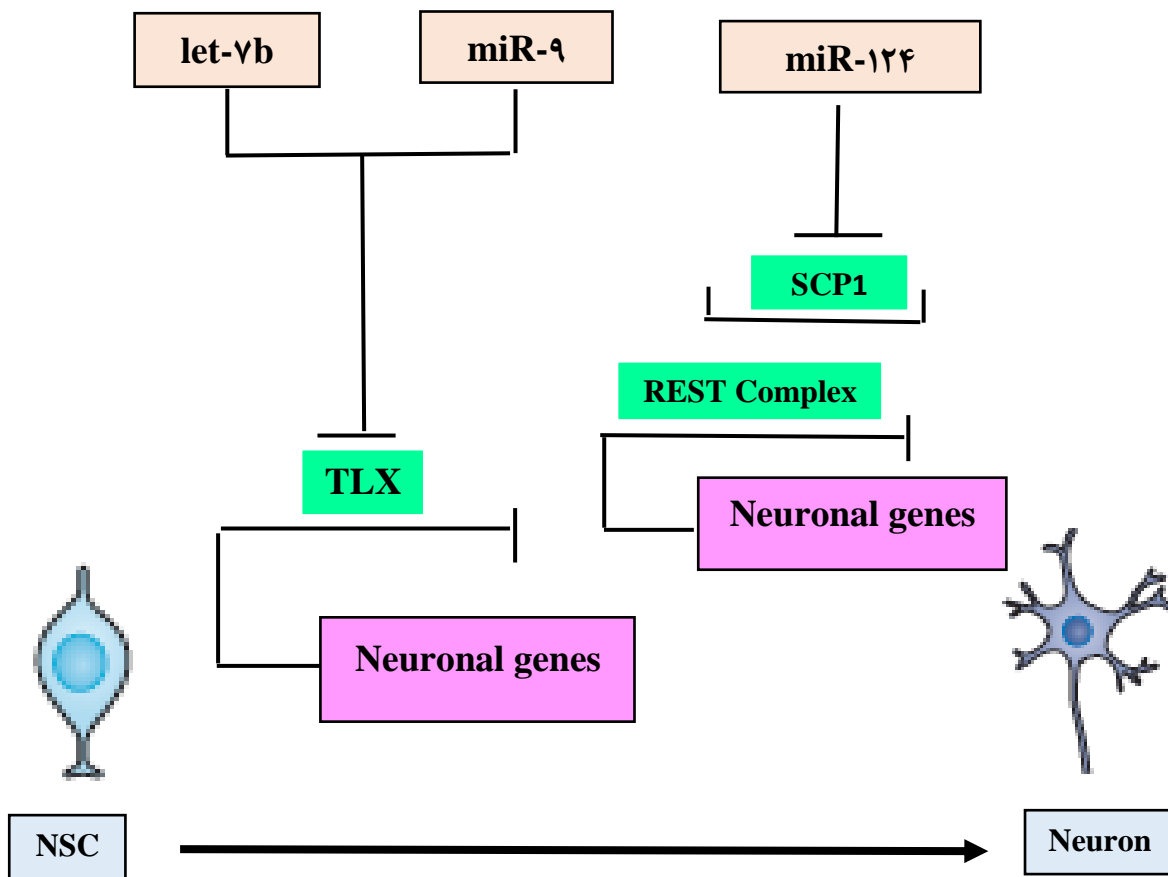
ژن *let-7 lethal-1* یکی از نخستین دو میرنای کشف شده در *C.elegans* و نخستین میرنای شناخته شده ی انسانی است (Reinhart et al. ۲۰۰۰) که در میان گونه های جانوری با ایزوفرم های حاوی توالی های کمی متفاوت، بشدت حفاظت شده اند. (Lagos-Quintana et al. ۲۰۰۰; Pasquinelli et al. ۲۰۰۲). اعضای خانواده ی *Let-7* بعنوان تنظیم کننده های مکانیسم های سلولی مختلف از قبیل تکثیر و تمایز هستند که بواسطه مهار تنظیم کننده های سیکل سلولی مثل RAS، HMGA2، CyclinD و CDC25 روند تکثیر را تضعیف می کنند (Kumar MS et al. ۲۰۰۸, Dong Q et al. ۲۰۱۰, Johnson CD et al. ۲۰۰۷).

let-7b هم عضوی از خانواده miRNA های *Let-7* بوده و در مغز پستانداران بیان شده و بیان بالایی را در طول تمایز عصبی نشان می دهد . TLX بعنوان یکی از اهداف بسیار مهم *let-7b* در سلول های بنیادی عصبی است که وضعیت تمایز نیافتگی و خود-نوزائی NSC ها را با سرکوب رونویسی ژن های هدف پائین دستی خود یعنی مهار کننده کیناز وابسته به cyclin- موسوم به *p21* (تنظیم کننده سیکل سلولی) و *Pten* (ژن سرکوب گر تومور) بواسطه اجتماع با هیستون داستیلازها ، حفظ می نماید (Zhao et al. 2010).

let-7b ، بیان TLX و Cyclin D1 را با اتصال به ناحیه 3' UTR در mRNA هایشان سرکوب کرده و بعنوان تنظیم کننده مهم تکثیر و تمایز سلول های بنیادی عصبی عمل می کنند . بطوریکه ، *let-7b* با هدف گیری و سرکوب TLX و Cyclin D1 منجر به مهار تکثیر سلول های بنیادی عصبی ، تمایز نورونی و نهایتاً پیشرفت نورونزیز می شود (Zhao et al. 2010) .

در طول تمایز، بیان میرناها می تواند توسط لوپ های فیدبکی منفی و مثبتی متشکل از فاکتورهای رونویسی و اپی ژنتیکی تحت کنترل قرار گیرد (Shenoy and Blelloch, 2014). داده ها بیانگر اینست که پروتئین کمپلکس REST-SCP1 سرکوب کننده ی میرناهای اختصاصی - نورونی یعنی *miR-9* و *miR-124* ، در پیش سازها است. *miR-124* هم بواسطه مهار SCP1 با کمپلکس REST فیدبک داده و به این ترتیب فعالیت آن را در طول تمایز نورونی سرکوب می کند (Visvanathan et al. 2007) .

نمونه دیگری از لوپ فیدبکی منفی شامل TLX و *miR-9* است که طی آن TLX، *miR-9* را در NSC ها سرکوب کرده ، *miR-9* هم طی فیدبک با TLX ، ترجمه آن را مهار می کند (Zhao et al. 2009) ؛ لذا لوپی را بمنظور تنظیم تعادل بین وضعیت های بنیادی و تمایز یافتگی تشکیل می دهند که نهایتاً سرنوشت سلول های بنیادی عصبی را کنترل می کند (Zhao et al. 2010). بیان *miR-9* و *miR-124* به ترتیب با کوفاکتورهای SCP1 کمپلکس سرکوب گر نورونژنتیکی REST و فاکتور TLX کنترل و سرکوب می شوند. در طول تمایز نورونی، این دو میرنا، بیان خود را با هدف گیری تنظیم کننده های منفی خود تقویت می کنند ؛ مثلاً *miR-9* با تشکیل لوپ های خود تنظیمی بواسطه *let-7*، *Tlx* را مورد هدف قرار می دهد . *miR-124* با هدف گیری کمپلکس REST ، *miR-9* و *let-7b* هم مشترکاً با هدف گیری TLX بعنوان سرکوب گر ژن های نورونی باعث پیشبرد سرکوب ژدایی و هدایت فعال سازی برنامه ی بیان ژن های نورونی (عصبی) در طول تمایز می شوند (Zhao et al. 2009 , 2010) (شکل ۱-۵)



شکل ۱-۵- لوپ فیدبکی بین *miR-9*، *miR-124* و *let-7b* (Shenoy and Btleloch, ۲۰۱۴)

بررسی کارآمدی پروتکل جدید القای نورونی و متعاقب آن بررسی نوع و درصد انواع سلول های عصبی حاصل بدنال القای تمایز عصبی در سلول های بنیادی فولیکول مو یکی از مهم ترین ضروریات در این مطالعه بوده است. از طرف دیگر، تا کنون عملکرد *miR-9*، *miR-124* و *let-7b* در روند تمایز عصبی سلول های بنیادی فولیکول مو که بارها پتانسیل و قابلیت تمایز عصبی آنها در محیط های *in vivo* و *in vitro* به اثبات رسیده است، بررسی نشده است لذا برای اولین بار پروفایل بیان این miRNA ها پس از القای تمایز نورونی در این سلول ها مورد مطالعه و بررسی قرار داده شد .

۱-۴- فرضیه های پژوهش

در این پژوهش فرض بر این شد که اگر سلول های بنیادی ناحیه بالج فولیکول مو پس از قرار گیری در معرض فاکتورهای رشد اگزوزن EGF, bFGF و BDNF و ATRA و محیط حاوی سرم به تدریج به سلول های عصبی اعم از نوروئی یا گلیالی تبدیل خواهند شد. در مرحله بعد فرض کردیم در صورت دست یابی به سلول های عصبی و ترانسفکت نمودن آنها با میکروآرنائی که بالاترین میزان بیان را متعاقب القای تمایز نوروئی در این سلول ها خواهد داشت، به بررسی اثر و عملکرد میکروآرنائی موردنظر با استفاده از تکنیک کسب و فقدان عملکرد جهت حصول اطمینان از این که میکروآرنائی عصبی انتخاب شده در تمایز عصبی سلول های بنیادی تحقیق خواهیم پرداخت. در این مطالعه برای بررسی این فرضیات از سلول های بنیادی بالج فولیکول مو به عنوان منبعی از سلول های بنیادی اپی تلیالی در دسترس و بدون مشکلات اخلاقی برای تمایز به انواع سلول های عصبی استفاده شد و اهداف زیر در این تحقیق دنبال شد.

۱-۵- اهداف تحقیق

۱-۵-۱- اهداف اصلی

- تمایز سلول های بنیادی فولیکول مو به سلول های عصبی متعاقب استفاده از پروتکل القای تمایز نوروئی موردنظر
- بررسی پروفایل بیان سه میکروآرنائی مهم عصبی یعنی *miR-124*، *miR-9* و *let-7b* دخیل در تمایز نوروئی سلول های بنیادی جدا شده از ناحیه بالج فولیکول مو

۱-۵-۲- اهداف فرعی

- جداسازی و کشت سلول های بنیادی بالج فولیکول مو
- اثبات بنیادی بودن سلول های اپی تلیالی جداسازی شده با تمایز به سمت دودمان عصبی مانند نورون، آستروسیت و یا الیگودندروسیت ها
- تمایز سلول های بنیادی بالج فولیکول مو به سلول های عصبی به کمک مکمل فاکتور های رشد EGF، bFGF و BDNF به همراه القاگر ATRA
- بررسی بیان پروتئین های $^1\text{Map2}$ ، $^2\text{Neu N}$ یا $^3\text{Rbfox}$ و $^4\text{GFAP}$ قبل و بعد از القای تمایز نوروئی با ایمونوسیتوشیمی بمنظور بررسی کارآمدی پروتکل القای تمایز نوروئی مورد استفاده

^۱-Microtubule Associated Protein 2 (MAP 2)

^۲- Neuronal Nuclei

^۳- RNA Binding protein Fox-1 Homolog 3

^۴- Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP)

- بررسی بیان ژن های هدف : *NR2E1* ، *CCND1* ، *Ptp1* ، *Sox9* ، *Rbfox3* ، *Map2* ، *DLK1* و *RCOR2* توسط Real-time-PCR قبل و بعد از القای نوروینی
- ترانسفکت *Mimic* و *Inhibitor* میکروآرناهای هدف (منتخب از بین سه میکروآرناهای مورد مطالعه) به HFSC های تحت کشت
- گروه بندی سلول ها پس از ترانسفکشن میکروآرنا
- پیاده سازی پروتوکل القای تمایز نوروینی طبق گروه بندی انجام شده
- بررسی بیان مجدد ژن های هدف توسط Real-time-PCR پس از ترانسفکشن میکروآرناهای هدف *miR-124-3p* به سلول های تحت کشت
- بررسی بیان پروتئین های مارکرهای نوروینی و گلایالی توسط ایمونوسیتوشیمی متعاقب ترانسفکشن در سلول های تمامی گروه ها

۱-۵-۳- اهداف کاربردی

در صورت اثبات کارآمدی مطلوب پروتوکل مورد استفاده برای القای تمایز نوروینی HFSC ها و تأیید اینکه *miRNA* ی ترانسفکت شده موردنظرمان یک میکروآرناهای عصبی مؤثر در تمایز نوروینی این سلول ها بوده است ؛ می توان بواسطه بهینه سازی روند نوروژنیزاسیون از نوروین های حاصل از HFSC ها در محیط های *in vitro* بعنوان منبع بالقوه سلولی برای فراکاشت های عصبی در روند درمان اختلالات نوروژنراتیو بهره برد.

۱-۶- تعریف متغیرها ، اصطلاحات و پیش فرض های تحقیق

- فولیکول مو : از ضمایم پوست می باشد که شامل بدنه مو، ناحیه بالب و ناحیه بالج است که حاوی سلول های بنیادی می باشد.
- ناحیه بالج : قسمتی از غلاف ریشه ای خارجی مو هست که بلافاصله زیر عضله راست کننده مو قرار گرفته و حاوی سلول های بنیادی فولیکول مو می باشد.
- *microRNA* ها : RNA های کوچک ۲۰~۲۲ نوکلئوتیدی که تنظیم کننده های ویژه ی بیان ژن در سطح پس از رونویسی بواسطه تجزیه mRNA ی هدف یا سرکوب ترجمه آن بوده و در عین حال تعدیل کننده های بسیار مهم روند نمو و تکوین می باشند که درگیر بسیاری از فرآیندهای مهم بیولوژیکی از جمله نوروژنیزاسیون می شوند.

فصل دوم : مروری بر تحقیقات انجام شده

۲-۱- سلول های بنیادی فولیکول مو

سلول های بنیادی اپی تلیالی یا پوست در قشر قاعده ای اپیدرم ، غدد سبابه و ناحیه بالج فولیکول های مو قرار دارند ؛ سلول های نگهدارنده - لیبل (Morris et al. ۲۰۰۸) مستقر در ناحیه بالج فولیکول های مو تحت عنوان سلول های بنیادی فولیکول مو شناخته می شوند (; Rishikaysh et al. ۲۰۱۴; ۱۹۹۰; ۱۹۹۹. Dlugosz, Cotsarelis) که دارای بیشترین قابلیت تکثیری در محیط های *in vitro* همانند سلول های بنیادی جنینی هستند (Kobayashi et al. ۱۹۹۳). نخستین HFSC های جدا سازی و کشت شده مربوط به فولیکول های موی سبیل^۱ رت (موش صحرائی) بودند (Kobayashi et al. ۱۹۹۳) و چندین سال پس از آن نیز نخستین کشت سلولهای بنیادی فولیکول موی موش، رت و انسان پایه گذاری شد (Kobayashi et al. ۱۹۹۳ ; Yu et al. ۲۰۱۰) .

سابقاً به روش تشریح دستی سلول های ناحیه بالج با خلوص نامعلوم جداسازی می شدند . چندین سال پیش Ohyama و همکاران از تکنیک " تشریح میکروسکوپی با دوربین لیزری^۲ " برای جداسازی دقیق سلول های بالج استفاده نمود . هم اکنون متدهای جداسازی متفاوتی برای این سلول ها با بهره گیری از CD۳۴ بعنوان مارکر سطح سلول های بنیادی فولیکول مو از تکنیک های " جداسازی سلولی فعال شده با - فلورسنس^۳ یا "FACS" (Trempe et al. ۲۰۰۳) و "جداسازی سلولی فعال شده با-میدان مغناطیسی^۴ یا MACS" استفاده می شود (Najafzadeh et al. ۲۰۱۳) .

طبق مطالعات EGF و b-FGF مولکول های تغذیه کننده ای هستند که نقش قابل توجهی را در حفظ و تکثیر HFSC ها در پروره کشت ایفا می کنند (Huang et al. ۲۰۱۳) . این سلول های بنیادی قابلیت رشد در محیط مکمل با EGF ، کلراتوکسین^۵ ، انسولین و هیدروکورتیزون^۶ را دارند (Ghoroghi et al. ۲۰۱۳). سلول های بنیادی فولیکول مو بعنوان انواعی از سلول های بالغ بافتی با دسترسی آسان، تومورزا نبوده و در عین حال پتانسیل تمایز به دودمان های اکتودرمی و مزودرمی را دارند (Blanpain et al. ۲۰۱۴; Amoh et al. ۲۰۰۸، ۲۰۰۵b) بطوریکه می توانند به انواع مشتقات اکتودرمی اعم از سلول های عصبی یا نورون ها ، آستروسیت ها^۷ ، الیگودندروسیت ها^۸ و سلول های شوآن^۹ (Amoh et al. ۲۰۰۸; El Seady et al. ۲۰۰۸، ۲۰۰۵b) et al. ۲۰۰۸، ۲۰۰۵b) و هم چنین دودمان مزودرمی از قبیل کندروسیت ها (Sieber-Blum, ۲۰۰۴) ، اندوتلیال و میوسیت ها (Amoh et al. ۲۰۰۴; Hoffman, ۲۰۰۶) ، آدیپوسیت ها و استئوسیت ها (Yu et al. ۲۰۱۰) متمایز می شوند..

۱ -vibrissa

۲ - Laser Capture MicroDissection

۳ - Fluorescence- Activated Cell Sorting (FACS)

۴ - Magnetic- Activated Cell Sorting (MACS)

۵ -cholera toxin

۶ -hydrocortisone

۷-Astrocyte

۸-Oligodendrocytes

۹- Schwann cells

سلول های بنیادی ناحیه بالچ در شرایط آزمایشگاهی بصورت جمعیت های سلولی مشابهی با سلول های بنیادی بالغ با توجه مورفولوژی و مارکرهای سطح سلول گسترش می یابند. بعنوان مثال، nestin مارکری است برای سلول های پیش ساز عصبی که در سلول های ناحیه بالچ فولیکول مو بیان می شوند (Li et al. ۲۰۰۵)؛ و سلول های بنیادی فولیکول موی بیان کننده nestin موسوم به سلول های بنیادی پرتوان وابسته به فولیکول مو (HAP) (Li et al. ۲۰۰۵) می توانند به کراتینوسیت ها، سلول های عصبی (Najafzadeh et al. ۲۰۰۹) (Sieber-Blum and Grim ۲۰۱۳; Amoh et al. ۲۰۰۴)، سلول های شوآن (Amoh et al. ۲۰۰۴) تمایز یابند. در مجموع می توان گفت HFSC ها قابلیت ایجاد سلول های تمایز یافته را در محیط های *in vitro* حفظ می کنند (Najafzadeh et al. ۲۰۱۵).

۲-۲- پتانسیل تمایز عصبی سلول های بنیادی فولیکول مو

پتانسیل تمایز عصبی مستقیم HFSC ها نخستین بار توسط Sieber-blum و Amoh و همکارانشان به ترتیب در سالهای ۲۰۰۴ و ۲۰۰۵ گزارش شد. آن ها نشان دادند جمعیتی از این سلول های بنیادی پس از پیش تیمار با ۱-neuregulin یا پیوند بر روی اعصاب مختلف محیطی و آسیب های طناب نخاعی به سلول های شوآن تبدیل می شوند (Amoh et al. ۲۰۰۵; Sieber-Blum et al. ۲۰۰۴). از آن پس در بسیاری از مطالعات از القاگرهایی برای تمایز عصبی سلول های بنیادی فولیکول مو از جمله فاکتور نوروتروفین-۳ (Ghoroghi et al. ۲۰۱۳)، فاکتور نوروتروفیک مشتق از سلول های گلیال، فاکتور نوروتروفیک مشتق از مغز (El Seady et al. ۲۰۰۸)، محیط های کشت عاری از سرم، رتینوئیک اسید تمام ترانس و سایر القاگرهای عصبی شیمیایی (Najafzadeh et al. ۲۰۱۵) استفاده شد.

HFSC ها قادر به القای تولید جمعیت سرشاری از دودمان های سلولی گلیال و نورونی متعاقب انکوباسیون با فاکتورهای رشد آگزوزن هستند (El Seady et al. ۲۰۰۸). با توجه به تنوع این سلول های بنیادی، پتانسیل تمایز و تکثیر HFSC ها به شدت وابسته به فاکتورهای رشد آگزوزن است. مثلاً ۱-Neuroregulin مستلزم تمایز HFSC ها به سلول های شوآن و سلول های عصبی β -III tubulin⁺ است. اخیراً، پس از جداسازی HFSC های رت و کشت آنها بر روی داربست های پلی L-لاکتیک اسید یا PLLA برای تأمین میکرومحیط مناسب برای تمایز عصبی از ۳-NT برای القای تمایز عصبی در سلول ها استفاده نمودند (Ghoroghi et al. ۲۰۱۳). محیط های کشت مکمل احتمالاً قابلیت تحت تأثیر قرار دادن روند تمایز سلولی را دارند چرا که گروهی از مطالعات ثابت کرده اند پروتکل محیط های عاری از سرم منجر به تسهیل روندهای نوروتزئیس و آستروتنزئیس در سلول های بنیادی فولیکول مو در محیط های *in vitro* می شود (Najafzadeh et al. ۲۰۱۴)؛ مطالعه دیگری نشان داده که تیمار با RA (با غلظت ۱ μ M) و محیط های بدون سرم منجر

به موفولوژی شبه-نورونی توأم با بیان مارکر اختصاصی عصبی MAP2 می شود (Najafzadeh et al. ۲۰۱۵). بعلاوه تیمار با رتینوئیک اسید نیز تعداد نورون ها را نسبت به شرایط کنترل افزایش می دهد (Najafzadeh et al. ۲۰۱۴). در همین راستا مطالعه دیگری نشان داد تیمار با رتینوئیک اسید ، القاکننده ی تمایز عصبی سلول های بنیادی CD34⁺ و nestin⁺ در ناحیه بالج فولیکول مو در محیط های *in vivo* و *in vitro* می باشد (Najafzadeh et al. ۲۰۱۴)؛ البته رتینوئیک اسید ، منجر به تمایز سلول های بنیادی جنینی و سایر انواع سلول های بنیادی به نورون ها و گلیال ها نیز می شود (Reali et al. ۲۰۰۶).

به دنبال القای تمایز نورونی با پروتوکل القای نورونی ، سلول های بنیادی به سلول های شبه نورونی تبدیل می شوند. پس از تمایز سلول های بنیادی ، این سلول ها از سیکل سلولی خارج شده و مارکر های مختلف عصبی را بیان می کنند. مثلاً HFSC ها موسوم به سلول های بنیادی ستیغ عصبی-اپیدرمی^۱ (Epi-NCSCs) مشتق از فولیکول موی بینی موش نیز مارکر های سلول های بنیادی عصبی از قبیل Nanog و Oct4 را بیان می کنند (Sieber-Blum and Hu. ۲۰۰۸). فاکتورهای رونویسی ستیغ عصبی از قبیل nestin ، Slug ، Snail ، Twist ، Sox9 ، Sox10 ، Wnt-1 و BMP4 نقش های بسیار مهمی را در حفظ وضعیت تمایز نیافتگی سلول های ناحیه ی بالج ایفا می کنند (Sieber-Blum et al. ۲۰۰۴).

سلول های بنیادی ناحیه بالج موشی ، ژن های ستیغ عصبی و نیز مارکر های سلول های بنیادی عصبی^۲ از قبیل CD34 ، K19 ، CD200 ، K15 و nestin را بیان می کنند که حاکی از وجود پتانسیل تمایز عصبی در آنهاست (Cotsarelis, ۲۰۰۶). بعنوان نمونه سلول های بنیادی فولیکول موی nestin⁺ برخی از مارکرهای سلول بنیادی مانند CD34 را بیان کرده و می توانند به انواع سلول های غیر فولیکولار اعم از سلول های عصبی تمایز یابند بطوریکه در محیط *in vitro* قابلیت تشکیل کلنی های بیضی شکل یا گرد کوچکی با ساختارهای شبه - دندریتی هستند (Li et al. ۲۰۰۳). طبق مشاهدات سلول های بنیادی فولیکول مو بدلیل دارا بودن پتانسیل تشکیل ساختار آناتومیکی سیستم عصبی در هر دو شرایط *in vitro* یا *in vivo* پس از پیوند به محل آسیب طناب نخاعی^۳ (SCI) (Najafzadeh et al. ۲۰۰۶; Sieber-Blum et al. ۲۰۱۳) و بیماری آلزایمر^۴ (AD) (Esmailzade et al. ۲۰۱۲) در مدل های حیوانی نیز قابلیت تمایز خود را کنند. اخیراً در یکی از مطالعات ، محققان زیرمجموعه ای از HFSC ها موسوم به Epi-NCSC ها را جهت تمایز به نورون های کولینرژیک در مدل موش AD کشت دادند؛ مشاهده شد که نورون های کولینرژیک حاصل از این سلولهای بنیادی کاهش حافظه و یادگیری را مدل AD بهبود بخشیدند (Najafzadeh et al. ۲۰۱۵). در مطالعه ای دیگر، تمایز گسترده ی سلول های شوآن از HFSC های nestin⁺ پس از پیوند به طناب نخاعی قطع شده گزارش شد (Amoh et al. ۲۰۰۸).

^۱ -Epidermal-Neural Crest Stem Cells

^۲ -Neural Stem Cells (NSCs)

^۳ -Spinal Cord Injury (SCI)

^۴ -Alzheimer Disease (AD)

همچنین طی پیوند Epi-NCSC های مشتق از - ناحیه بالچ به طناب نخاعی له شده، برخی از سلول های پیوند شده بصورت نوروون های حرکتی عملکردی تمایز یافتند (Yu et al. ۲۰۰۶). در همین راستا هشت هفته پس از پیوند HFSC ها به اعصاب سیاتیک قطع شده ی موش ، بسیاری از سلول های دوکی در اعصاب سیاتیک آسیب دیده نسبت به گروه کنترل رشد کرده و بطور گسترده ای به سلول های شوآن تمایز یافتند (Amoh et al. ۲۰۰۵، ۲۰۰۹). در مطالعه دیگری، تمایز نوروونی گسترده ای در سلول های بنیادی بیان کننده nestin پس از پیوند سلول های پیش تیمار شده با RA - به عصب سیاتیک دیستال قطع شده گزارش شد (Liu et al. ۲۰۱۰). HFSC ها پس از پیوند به بافت زیرجلدی و عصب سیاتیک قطع شده به ترتیب به عروق خونی (Amoh et al. ۲۰۰۴) و سلول های شوآن (Amoh et al. ۲۰۰۵) تمایز یافتند.

۲-۳- سلول های بنیادی فولیکول مو و miRNA ها

طبق مطالعات مشخص شده که miRNA های پوست صرفاً تمایز سلول های بنیادی پوست را به پیش می برند. *miR-۲۰۳* و *miR-۲۰۵* می توانند به عنوان miRNA های بافت پوششی سنگفرشی در نظر گرفته شوند (Andl et al. ۲۰۰۶; Yi et al. ۲۰۰۶).

miR-۲۰۳ تمایز پوست را با محدود کردن ظرفیت تکثیری سلول های بنیادی پوست به پیش برده و منجر به خروج از سیکل سلولی می شود (Yi et al. ۲۰۰۶). این میکروآرنا دارای بیان افتراقی است بدین صورت که در سلول های پیش ساز و بنیادی تکثیری بیان نمی شود اما بیان بالائی در سلول های تمایز یافته دارد. مکانیسم احتمالی عملکرد *miR-۲۰۳* هدف گیری p۶۳ بعنوان تنظیم کننده ی بسیار مهم حفظ سلول های بنیادی می باشد (Gangaraju and Lin. ۲۰۰۹).

مطالعات نشان دادند که *miR-۲۰۵* در پیش سازهای اپی تلیالی و سلول های بنیادی در طول تکوینی پوست به مقدار فراوانی یافت می شود. *miR-۲۰۵* گسترش سلول های بنیادی را در طول اوایل تکوین HF به پیش برده و تخریب آن بطور منفی تکثیر سلول های بنیادی و زاده های مستقیم آنها را تحت تأثیر قرار می دهد در حالی که تأثیری بر سلول های ماتریکس مو با قدرت تکثیر بالا نشان نمی دهد (Yi et al. ۲۰۰۶). مطالعات انجام شده نشان دادند که *miR-۲۰۵* بعنوان فعال کننده ی سلول های بنیادی فولیکول مو می باشد که اهمیت حیاتی برای مورفوزنریس HF دارد (Wang et al. ۲۰۱۳). *miR-۱۲۵b* نیز ترجیحاً در سلول های پیش ساز اپیدرم و فولیکول مو بیان شده و بعنوان سرکوب گر تمایز سلول های بنیادی HF عمل می کند و لذا لازمه آغاز فاز آنارژن می باشد ؛ البته چنین نقشی از *miR-۱۲۵b* همسو با عملکردهای آن در تنظیم فعالیت انواع مختلف سلول های بنیادی خارج از پوست اعم از سلول های بنیادی جنینی ، سلول های بنیادی خونساز و سلول های بنیادی/پیش ساز عصبی می باشد (Zhang et al. ۲۰۰۱).

غربالگری اهداف *miR-125b* در سلول های انسان و موش حاکی از آنست که این میکروآرنا ، هموستازیس سلول های بنیادی را از طریق بازدارندگی و تنظیم- دقیق فعالیت شبکه p53 و تنظیم سطوح بیان تنظیم کننده های تکثیر و آپوپتوزیس کنترل می کند . p53 بعنوان تنظیم کننده ی مثبت بیان miRNA ها عمل کرده و همینطور می تواند بطور مستقیم ژن های میکروآرناها را فعال نماید (Le et al. 2011) . بطور کلی، *miR-125b* ممکن است نه تنها طریق حفظ وضعیت بنیادی سلول های بنیادی HF عمل کند بلکه در حفظ فنوتیپ اختصاصی-دودمانشان با هدف گیری ژن های اختصاصی-دودمان نیز دخیل باشد. Tcf3 ، فاکتور رونویسی عمل کننده در سلول های بنیادی فولیکولی و پیش سازهایشان واقع در غلاف خارجی ریشه بمنظور حفظ وضعیت تمایز نیافتگی شان است (DasGupta et al. 1999) که بعنوان یکی از اهداف *miR-24* می باشد ؛ لذا عدم بیان *miR-24* در سلولهای در حال تکثیر با حفظ فعالیت تکثیری آنها توأم می شود (Amelio et al. 2012).

۲-۴- miRNA ها تنظیم کننده های سلول های بنیادی

میکروآرناها نقش مهمی در تنظیم خود-نوزائی و تمایز سه نوع سلول های بنیادی - سلول های بنیادی جنینی، سلول های بنیادی سوماتیکی بافت بالغ و سلول های بنیادی زایا - از طریق سرکوب ترجمه mRNA های منتخب در سلول های بنیادی و سلول های دختری در حال تمایز دارند (Gangaraju and Lin. 2009) . بطور خلاصه در مورد سلول های بنیادی جنینی (ES) مطالعات اخیر نشانگر نقش گروه *miR-290-295* در القای تمایز آنها است. در مقابل سطوح *miR-21* و *miR-22* متعاقب القای تمایز این سلول ها در موش افزایش می یابد (Singh et al. 2008) سایر میکروآرناهای مرتبط با تمایز سلول های ES شامل *miR-134* ، *miR-296* و *miR-470* هستند که با هدف گیری مناطق کد کننده Nanog ، SOX2 ، OCT4 (یعنی پروتئین های مهم دخیل در خود-نوزائی سلول های بنیادی) باعث پیشبرد روند تمایز می شوند (Tay et al. 2008) . مطالعه مشابهی در سلول های ES انسانی نیز نشان داد که سطوح miRNA های اختصاصی سلول های بنیادی جنینی پرتوان متعاقب تمایز سلولی کاهش می یابد (Suh et al. 2004).

در سلول های بنیادی بالغ نیز نقش miRNA ها در تنظیم مراحل مختلف تمایز دودمان های متعدد از جمله هماتوپویزیس ، میوزنزیس و کاردیوژنزیس، نوروژنزیس و تکوین پوست به اثبات رسیده است (Gangaraju and Lin. 2009) . مثلاً در روند هماتوپویزیس *miR-128* و *miR-181* فقط در سلول های پیش ساز اولیه بیان شده و از تمایز همه دودمان های هماتوپویتیک ممانعت بعمل می آورد (Georgantas et al. 2007) ؛ *miR-221* ، *miR-222* و *miR-223* کنترل کننده مسیره های تمایز نهائی می باشند (Georgantas et al. 2007) . در روند میوزنزیس هم می توان به *miR-1* و *miR-133* اشاره کرد که پس از رونویسی همزمان در بافت های ماهیچه ای اسکلتی و قلبی بالغ بطور اختصاصی پردازش شده و میوزنزیس را در سبک های

مختلف به پیش می برند (Chen et al. ۲۰۰۴) و یا *miR-۲۶a* بطور غیر مستقیم با هدف گیری EZH^۱ تمایز ماهیچه اسکلتی را به پیش می برد (Wong et al. ۲۰۰۶). در پوست هم *miR-۲۰۵* و *miR-۱۲۵* باعث پیشبرد خود-نوزائی سلول های بنیادی اپیدرمی می شوند، اما در طول تمایز دچار تنظیم منفی و کاهنده می شوند. *miR-۲۰۵* مهار کننده های مختلف مسیر PI^۳K-AKT را سرکوب می کند. در مقابل *miR-۲۰۳* با تنظیم مثبت در طول تمایز، ژن های کد کننده پروتئین های پیشرفت سیکل سلولی مانند p^{۶۳} را مورد هدف قرار داده و از این طریق باعث خروج از سیکل سلولی می شود (Shenoy and Blelloh, ۲۰۱۴).

۲-۴-۱- miRNA ها و نورونزئیس

سلول های بنیادی عصبی اتخاذ کننده تصمیمات اختصاصی - دودمان مبنی بر ادامه روند خود-نوزائی یا متمایز شدن بصورت نورون ها و آستروسیت ها هستند (Shi et al. ۲۰۰۸)؛ به این صورت که miRNA ها سرنوشت سلول های بنیادی عصبی را با هدف گیری فاکتورهای تنظیمی بسیار مهم تحت تنظیم قرار می دهند. اما در بافت های دیگر، بیان افتراقی miRNA های مختلف بعد از القای تمایز عصبی، اعمال کننده ی تصمیمات اختصاصی-دودمان می باشد. بعنوان مثال *miR-۱۲۴* و *miR-۱۲۸* اختصاصی دودمان نورونی هستند در حالیکه *miR-۲۶*، *miR-۲۹* و *miR-۲۳* ترجیحاً و بطور اختصاصی به ترتیب در دودمان های آستروسیتی بیان می شوند (Smirnova et al. ۲۰۰۵) یعنی میکروآرناها احتمالاً تغییر سرنوشت نورونی به گلیالی را تنظیم می کنند (Zheng et al. ۲۰۱۱).

میکروآرناها مستلزم مراحل متعدد فرآیند نورونزئیس - تکثیر، خودنوزائی، تعهد عصبی، مهاجرت، بلوغ و یکپارچگی سلول های بنیادی عصبی- می باشند (Shi et al. ۲۰۰۸). عبارت دیگر می توان گفت miRNA ها نقش آفرینان مهم تخصصی سازی زیرگروه های نورونی در محیط های *in vivo* هستند که می توانند بعنوان ابزارهای فرعی جهت تعدیل تصمیمات سرنوشت سلول نورونی در محیط های *in vitro* ظاهر می شوند (Stappert et al. ۲۰۱۵). تأثیر کلی miRNA ها به عنوان تنظیم کننده های بسیار مهم تمایز و نمو عصبی نخستین بار توسط آزمایش های *loss-of-function* از طریق حذف اجزای کلیدی مکانیسم پردازنده ی miRNA، یعنی Dicer یا Drosha نشان داده شد (Wang et al. ۲۰۰۵; Kanellopoulou et al. ۲۰۰۷; Davis et al. ۲۰۰۸).

^۱-histone methyl-transferase Enhancer of Zeste Homologue^۲ (EZH^۲)

۲-۴-۲ - miRNA های عصبی

miR-۲۱۹ و *miR-۳۳۸*: در طول تمایز آلیگودندروسیتی افزایش یافته و با هدف گیری فاکتورهای رونویسی SOX۶ و HES۵ با تکثیر پیش سازها و وضعیت بنیادین مرتبط می شود (Zhao et al. ۲۰۱۰).

miR-۱۷ و *miR-۱۰۶*: در آزمایش های *in vitro* با استفاده از نوروسفرهای مشتق از سلول های بنیادی جنینی موش، بیان بسیار بالای *miR-۱۷* و *miR-۱۰۶* با سرکوب تغییر به سرنوشت گلیالی موجب گسترش سلول های پیش ساز نورونی می شود (Naka-Kaneda et al. ۲۰۱۴).

miR-۱۲۸: سطح بیان بالایی را در طول تکوین مغز نشان می دهد (Krichevsky et al. ۲۰۰۳)؛ این میکروآرنا بطور عمده در نورون های بالغ و نه در آستروسیت ها بیان می شود (Bruno et al. ۲۰۱۱). بیان بسیار بالای *miR-۱۲۸* توانست تمایز نورونی را به پیش برد و طول دندریتی را افزایش دهد (Bhuvanagiri et al. ۲۰۱۰).

miR-۱۳۷: با مهار تکثیر باعث پیشبرد تمایز NSC های مشتق از ناحیه تحت بطنی (SVZ)^۱ مغز موش بالغ می شود (Silber et al. ۲۰۰۸) که در واقع نشانگر نقش پیش-تمایزی *miR-۱۳۷* در این سلول هاست (Sun et al. ۲۰۱۱). در مطالعه ای، رسپتور هسته ای TLX با رساندن سرکوب گر-کمکی LSD۱^۲، به پروموتور *miR-۱۳۷*، بیان این میکروآرناها را سرکوب می کند؛ لوب تنظیمی *TLX-miR-۱۳۷-LSD۱* ارائه کننده مکانیسمی جهت کنترل دینامیک بین تکثیر و تمایز NSC ها می باشد (Sun et al. ۲۰۱۱). در مطالعه دیگری MeCP۲^۳ با مشارکت Sox۲^۴ به پروموتور *miR-۱۳۷* متصل شده و بیان آن را سرکوب می کند. تنظیم اپی ژنتیکی *miR-۱۳۷* منجر به تغییر وضعیت کروماتین از طریق Ezh۲ می شود که به نوبه خود کنترل کننده ی تکثیر و تمایز NSC هاست (Szulwach et al. ۲۰۱۰).

miR-۱۸۴ به پیش برنده ی تکثیر و مهار کننده ی تمایز عصبی NSC ها می باشند (Liu et al. ۲۰۱۳). MBD۱^۵ تنظیم کننده ی بیان *miR-۱۸۴* در NSC هاست بطوریکه بیان بالای *miR-۱۲۸* در NSC های فاقد MBD۱- به اثبات رسیده است (Bogdanovic and Veenstra, ۲۰۰۹). طبق مطالعه ای، از کار انداختن ژنی یا ناک اوت^۶ MBD منجر به تغییر وضعیت تکثیری NSC ها به سوی تمایز نورونی می گردد (Liu et al. ۲۰۱۳).

^۱-Sub Ventricular Zone

^۲-Lysin-Specific histone Demethylase^۱ (LSD^۱)

^۳-Methyl CpG binding Protein^۲ (MeCP^۲)

^۴-SR Y-box^۲ (Sox^۲)

^۵-Methyl CpG binding protein^۱ (MBD^۱)

^۶-Knockout

miR-132 و *miR-132b*: اثر منفی *miR-132b* بر تولید نورون های دوپامینرژیک از سلول های بنیادی جنینی موش گزارش شده است (Kim et al. 2007). لذا این میکروآرنا به وفور در مغز میانی انسان یافت شد ولی در نمونه های مغز بیماران پارکینسون کاهش یافت (Kim et al. 2007). بیان بسیار بالای *miR-132b* در طول تمایز سلول های ES یا در کشت های اولیه ی مغزیانی بطور شگفت آوری، تولید نورون های دوپامینرژیک تیروزین هیدروکسیلاز مثبت (TH^+) را تضعیف نمود. در راستای آن، مهار *miR-132b* منجر به افزایش تمایز دوپامینرژیکی سلول های ES موشی شد (Kim et al. 2007). مطالعه ای دیگر نشان داد موش های ناک اوت *miR-132b* نمو طبیعی نورون های دوپامینرژیک را به نمایش گذاشتند (Heyer et al. 2012). تأثیر منفی مشابهی بر تمایز نورون های دوپامینرژیک از سلول های ES موشی برای *miR-132* گزارش شد (Yang et al. 2012). بطوریکه مهار آن باعث پیشرفت تمایز نورون های TH^+ ، و بیان بیش از حد آن نیز دارای اثری متضاد بود.

miR-378: در مطالعه ای نشان داده شد بیان بسیار بالای *miR-378* به میزان قابل توجهی بیان مارکر آستروسیتی یعنی GFAP را در NSC های تحت تیمار با forskolin و FBS افزایش داد بهمین ترتیب بیان بسیار بالای *miR-378* به میزان قابل توجهی بیان مارکر نورونی β -III tubulin (Tuj1) را در NSC های تحت تیمار با RA و FBS افزایش داد؛ بعبارت دیگر بیان بالای این میکروآرنا در NSC ها تمایز را افزایش و تکثیر را کاهش داد. در مقابل سرکوب *miR-378* بطور قابل ملاحظه ای باعث افزایش بیان β -catenin و cyclinD1 و کاهش بیان p21 و PTEN در NSC ها گردید (Huang et al. 2015). اهمیت عملکرد TLX در تمایز NSC ها نخستین بار توسط Shi و همکارانش (2004) گزارش شد که طی آن مشخص شد سلول های بیان کننده-TLX پس از جداسازی از مغز موش بالغ توانستند تکثیر یافته، خود-نوزائی کرده و به نورون ها، آستروسیت ها و الیگودندروسیت ها تمایز یابند. ناک داون TLX منجر به کاهش قابل توجهی در روند تکثیر NSC ها شد (Zhang et al. 2008) و هم چنین باعث افزایش آستروژنزیس در NSC ها از طریق فعال سازی سیگنالینگ BMP نیز گردید (Qin et al. 2014).

miR-125b: بالاترین سطح بیان را در بافت مغز بویژه در نورون های بالغ و نه آستروسیت ها دارد. (Sempere et al. 2004; Smirnova et al. 2005; Wainhold et al. 2005). این میکروآرنا در طول نوروزنزیس موش (Smirnova et al. 2005) و تمایز عصبی سلول های بنیادی جنینی موش (Krichevsky et al. 2006, 2005) تحت تنظیم مثبت^۱ (افزاینده) واقع می شود. این میکروآرنا احتمالاً مستلزم تنظیم زمانی پیدایش زیرگروه های مختلف نورونی باشد (Stappert et al. 2015).

۱- up-regulation

در مطالعه ای مشخص شد که *miR-1۲۵b* روند مهاجرت، تکثیر و تمایز NSC ها را بواسطه هدف گیری nestin تنظیم می کند (Tan et al. ۲۰۱۲).

miR-۲۶b: در سطح پس از-رونویسی در طول تمایز عصبی دچار تنظیم مثبت شده بعلاوه باعث خاموش شدن فعالیت REST می شود. سرکوب بیان *Ctdcp۲* (بعنوان یکی اجزای کمپلکس REST) با واسطه-*miR-۲۶b* مستقیماً با تمایز نورونی مشارکت می کند (Dill et al. ۲۰۱۲).

miR-۲۱: بیان *miR-۲۱* در طول تمایز سلول های بنیادی ستیغ عصبی (NCSCs) مشتق از فولیکول مو به سلول های شوآن افزایش می یابد (Ni et al. ۲۰۱۴). طبق مطالعه ای، بیان *miR-۲۱* به طور قابل توجهی در بافت عصبی محیطی آسیب دیده افزایش می یابد. مطالعه ی دیگری با استفاده از تکنیک میکروآری^۱ نشان داد که بیان *miR-۲۱* به تدریج، سلول های شوآن در حال میلین سازی را در عصب سیاتیک موش افزایش داد (Gokey et al. ۲۰۱۲). نتایج مطالعه دیگری نشان داد که پس از ترانسفکت با *agomir-۲۱* و *antagomir-۲۱*، قابلیت تمایز NCSC ها به سلول های شوآن به ترتیب افزایش و کاهش یافت (Ni et al. ۲۰۱۴). در همین راستا، ناک اوت *Sox۲* در NCSC ها به میزان قابل توجهی اثر مهاری-*antagomir-۲۱* بر روی NCSC های در حال تمایز به سلول های شوآن را بلوکه کرد (Ni et al. ۲۰۱۴).

miR-۹ در اوایل روز 10.5 جنینی بیان شده و سطح بیان آن در طول نمو مغز جنین رو به افزایش گذاشته تا اینکه در دوران پس از تولد کاهش می یابد (Krichevsky et al. ۲۰۰۳، ۲۰۰۶; Smirnova et al. ۲۰۰۵; De Pietri Tonelli et al. ۲۰۰۸). در مطالعه ای وجود ارتباط معکوس بین بیان *miR-۹* و سرکوب گره های رونویسی مانند REST و TLX در طول تمایز NSC ها نشان داده شد (Zhao et al. ۲۰۰۹). بیان بالای *miR-۹* به طور چشمگیری باعث کاهش تکثیر NSC های موشی شد و تمایز نورونی و آستروگلیالی را افزایش داد؛ بطوریکه افزایش سلول های *GFAP+* در سلول های ترانسفکت شده با *miR-۹* مشاهده شد و نشان داد بیان بسیار بالای *miR-۹* باعث پیشرفت تمایز آستروگلیالی در محیط *in vivo* نیز می شود (Zhao et al. ۲۰۰۹). بالعکس ناک داون^۲ *miR-۹* منجر به افزایش تکثیر NSC ها شد. طی مطالعه ای، *In utero electroporation* (یکی از متدهای ترانسفکشن) *miR-۹* به NSC های ناحیه بطنی در مغز جنین موش منجر به تمایز زودرس نورونی شد (Zhao et al. ۲۰۰۹). مطالعه ی دیگری نیز نشان داد این میکروآرنا علاوه بر NSC ها در سلول های بنیادی جنینی موش نیز با هدف گیری *sirtuin۱* باعث پیشرفت تمایز نورونی می شود (Saunders et al. ۲۰۱۰).

^۱-Microarray
^۲-Knockdown

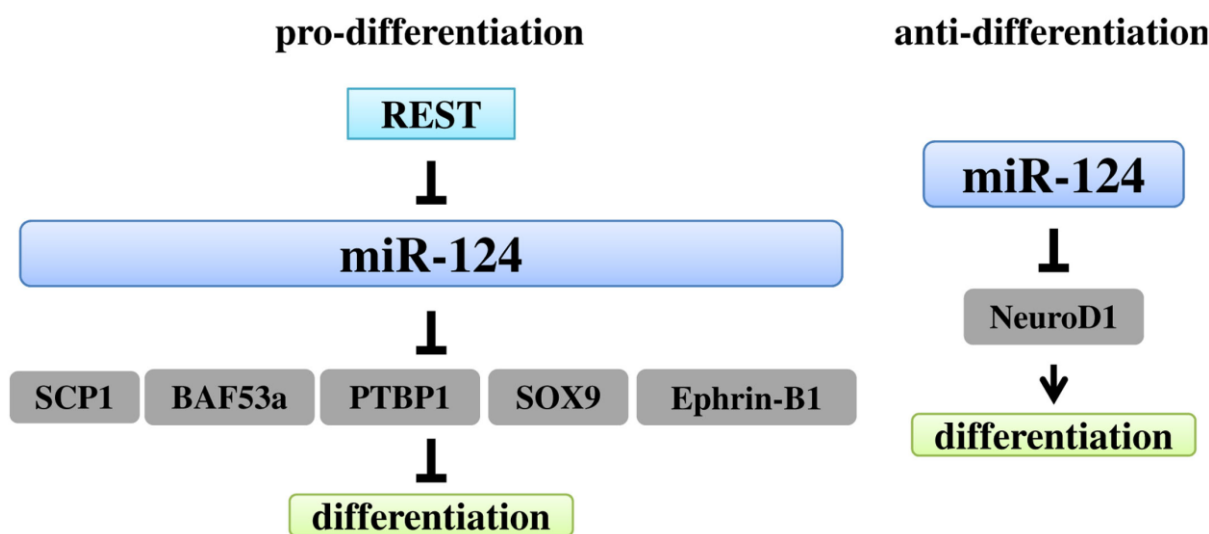
میکروآرناهای گروه LET-۷ : طبق مطالعات مشخص شده که در میان اعضای این گروه *let-۷b* ، *let-۷a* ، *let-۷c* و *let-۷e* در مغز بیان می شود (Wulczyn et al. ۲۰۰۷; Sempere et al. ۲۰۰۴). طبق یافته ها ، اعضای گروه *let-۷* نقش مهم و در عین حال مشابهی در پیشرفت نورونزایی دارند (Roush and Slack. ۲۰۰۸). نخستین شاهد بر هم کنش بین *let-۷a* و *Lin-۲۸* (Rybak et al. ۲۰۰۸) بعنوان یک فاکتور پرتوان است که در سلول های ES بیان می شود (Yu et al. ۲۰۰۷). تنظیم منفی و کاهنده ی بیان *Lin-۲۸* باعث از بین رفتن سرکوب بیان *let-۷a* شده و این اجازه را به *let-۷a* می دهد که تمایز نورونی را القا کند (Kawahara et al. ۲۰۱۱).

مطالعات حاکی از آنست که *let-۷b* در میان دیگر اعضای گروه *let-۷* متناسب با سن سلول تا حد زیادی دچار تنظیم مثبت و افزایشده می شود. بیان بیش از حد *let-۷b* منجر به کاهش خود-نوزایی NSC ها می شود. *let-۷b* ، نورونزایی را در NSC ها با هدف گیری ناحیه ۳'UTR از TLX و CyclinD۱ گسترش می دهد (Zhao et al. ۲۰۱۰). بیان بسیار بالای *let-۷b* در NSC ها روند تکثیر را کاسته و تمایز نورونی و آستروگلیالی را افزایش می دهد. آنالیز سیکل سلولی در محیط *in vivo* نشان داد که *let-۷b* باعث خروج NSC ها از سیکل سلولی شده و زمینه را جهت تمایز عصبی آنها مساعدتر می کند (Lang and Shi, ۲۰۱۲). طی مطالعه ای، ناک داون-آنتی سنس *let-۷b* باعث افزایش تکثیر NSC ها شد؛ بعلاوه *In utero* electroporation آن به NSC های جنینی منجر به کاهش پیشرفت سیکل سلولی گردید (Zhao et al. ۲۰۰۹). *miR-۱۲۵b* اغلب با *let-۷b* هم بیانی داشته و مورفونزایی دندریت ها و تشکیل سیناپس ها را کنترل می کند (Akerblom et al. ۲۰۱۴).

miR-۱۲۴ : *miR-۱۲۴-۳p* یکی از زیرگروه های این میکروآرناست. تنظیم کننده ی تمایز نورونی در طناب نخاعی در حال تکوین و در کنام نورونیک SVZ بالغ می باشد (Conaco et al. ۲۰۰۶; Wu et al. ۲۰۰۷; Li et al. ۲۰۰۶; *miR-۱۲۴* al. ۲۰۰۶). در نوروون ها و نه در آستروسیت ها بیان شده و سطوح آن در طول زمان در سیستم عصبی در حال تکوین افزایش می یابد (Krichevsky et al. ۲۰۰۳; Miska et al. ۲۰۰۴). Smirnova et al. (۲۰۰۵)؛ *miR-۱۲۴* در صورت همراهی با *miR-۹* باعث تحریک تمایز نورونی و سرکوب تمایز گلیالی در سلول های ES در محیط *in vitro* می گردد (Krichevsky et al. ۲۰۰۶)؛ در رده سلولی پرتوان کارسینومای جنینی P۱۹ تحت تیمار با RA ، نیز *miR-۱۲۴* تمایز عصبی را افزایش داد (Makeyev et al. ۲۰۰۷). در نوروون های پستانداران، *miR-۱۲۴* عمدتاً در بخش های سلولی حاوی کمپلکس mRNA و پلی ریبوزوم (Kim et al. ۲۰۰۴) یعنی در محل انجام ترجمه فعال یافت می شود که در واقع حاکی از دخالت آن در تنظیم ترجمه ی پروتئین های نورونی است.

بیان اکتوییک ۱۲۴-*miR* در سلول های سرطانی *Hela*، ژن های غیر-نورونی را سرکوب کرده در حالیکه ژن های نورونی را تا حد زیادی تحریک می کنند که بیانگر نقش پیش-نورونی^۱ این میکروآرنا است (Lim et al. ۲۰۰۵)؛ بعلاوه بیان اکتوییک ۱۲۴-*miR* در سلول های *SVZ* هم منجر به تمایز زودرس نورونی می شود. در مقابل، بیان بیش از حد ۱۲۴-*miR* باعث کاهش قابل توجه نسبت کلی سلول های در حال تقسیم و افزایش نرون های پس-میتوزی^۲ شد (Cheng et al. ۲۰۰۹).

ناک داون ۱۲۴-*miR*، تکثیر سلول های در حال گسترش گذار^۳ (یا انتقالی) را حفظ کرد ولی نتوانست نوروبلاست های تکثیری را بازیابی کند که نشانگر نقش مهم ۱۲۴-*miR* در انتقال مرحله از تکثیر به تمایز دارد (Lang and Shi, ۲۰۱۲). در مطالعه ی دیگری کاهش تمایز نورونی در کشت های ترانسفکت شده با مهارکننده ۱۲۴-*miR* مشاهده شد (Stappert et al. ۲۰۱۳)؛ همسو با آن مهار ۱۲۴-*miR* با آنتی سنس یا الیگونوکلوئوتیدهای ۲'-OMe-RNA، منجر به افزایش سطوح ترانس کریپت های غیرعصبی در نرون های قشری اولیه (Conaco et al. ۲۰۰۶) و نیز کاهش بیان مارکرهای اختصاصی-نورونی (Visvanathan et al. ۲۰۰۷) شد. مطالعات اخیر حاکی از آنست که ۱۲۴-*miR* مجموعه ای از mRNA های غیرعصبی هدف پیش بینی شده را در محیط *in vivo* به صورت منفی (کاهنده ای) تحت تنظیم قرار می دهد (Visvanathan et al. ۲۰۰۷) (شکل ۱-۲).



شکل ۱-۲- تنظیم و عملکردهای ۱۲۴-*miR*: (A) نقش اصلی ۱۲۴-*miR* پیشبرد روند تمایز در نورونزیز است. کمپلکس REST می تواند بیان ۱۲۴-*miR* را سرکوب نماید. ۱۲۴-*miR* از طریق ۵ مکانیسم شامل هدف گیری *SCP1*، *BAF53a*، *SOX9*، *PTBP1* و *Ephrin-B1* روند تمایز را به پیش می برد. (B) ۱۲۴-*miR* هم چنین می تواند تمایز NSC ها با هدف گیری یک ژن پیش-نورونی یعنی *NeuroD1* مهار نماید. (Lang and Shi, ۲۰۱۲).

^۱ -pro-neuronal

^۲ -postmitotic neurons

^۳ -transit amplifying cells

بیان بسیار بالای *miR-124* با غیرفعال سازی فعالیت SCP1 بعنوان یک فاکتور ضد-عصبی که مانع از بیان ژن های عصبی در بافت های غیر-عصبی می شود (Yeo et al. 2005)، باعث القای تمایز بیشتر نورونی می شود (Conaco et al. 2009; Visvanathan et al. 2007). *miR-124* با هدف گیری 3'UTR در SCP1 منجر به تمایز آستروسیتی می شود (Visvanathan et al. 2007) و یا القای تمایز نورونی و رشد نوریت ها توسط *miR-124*، وابسته به کاهش سطح ephrin-B1 است بطوریکه در موش های ناک اوت ephrin-B1، بیان بالای *miR-124* و تمایز نورونی مشاهده شد (Arvanitis et al. 2010).

Sox9 در سلول های اپاندیمال، آستروسیت های SVZ، سلول های در حال گسترش انتقالی و نه در نوروبلاست بیان می شود. در طول تمایز NSC های بالغ، *miR-124* تغییر پیش سازهای نوروزیک به نوروبلاست را با مهار *Sox9* به پیش می برد (Cheng et al. 2009). طبق مطالعات، *Sox9* یک تعیین کننده بسیار مهم در آلیگوژنیزاسیون می باشد (Stolt et al. 2003).

ناک داون *miR-124*، بیان *Sox9* را در نوروبلاست افزایش داد. ناک داون *Sox9* هم منجر به افزایش نوروزنیزاسیون و کاهش تشکیل گلیال می شود (Cheng et al. 2009). از طرف دیگر، بیان بیش از حد سازه های *Sox9* فاقد 3'UTR مانع از تمایز نورونی NSC ها گردید؛ بیان بسیار بالای *Sox9* باعث ابقای سلول های SVZ بصورت آستروسیت های GFAP⁺ شده و بطور کامل تولید نورونی را از بین می برد (Cheng et al. 2009). در مجموع می توان گفت *miR-124* بواسطه ی سرکوب بیان *Sox9* باعث پیشرفت تصمیم سرنوشت نورونی می شود (Lang and Shi, 2012).

طبق شواهد *miR-124*، تنظیم کننده روند پردازش متناوب¹ (Makeyev et al. 2007) است که لایه ای دیگر از پیچیدگی در کنترل بیان ژن در سطح پس از-رونویسی را ارائه می دهد. تنظیم منفی و کاهنده PTBP1 بعنوان سرکوب گر پردازش اختصاصی-نورونی (Black, 2013) توسط *miR-124* باعث تنظیم مثبت PTBP2 (همولوگ فراوان-در سیستم عصبی) می شود که به نوبه خود به نفع پردازش اختصاصی-نورونی و تمایز نورونی است (Makeyev et al. 2007).

طبق یافته ها، نقصان فعالیت PTBP1 در سلول های غیر عصبی برای آغاز تبدیل نورونی کافی است (Xue et al. 2013). PTBP1 با *miR-124* و *miR-96* برای اتصال به mRNA ی SCP1 (بعنوان کوفاکتور کمپلکس ضد عصبی REST) رقابت می کند (Xue et al. 2013). *miR-124* و *miR-9/9** به میزان قابل توجهی در تبدیل مستقیم فیبروبلاست ها به نرون ها مشارکت می کنند (Ambasudhan et al. 2011; Yoo et al. 2011).

¹-Alternative Splicing

مسیر سیگنالینگ Notch نقش تنظیمی بسیار مهمی در خود-نوزائی و تمایز سلول های بنیادی / پیش ساز عصبی در جنین و مغز بالغ ایفا می کند (Bolos et al. ۲۰۰۷; Chiba, ۲۰۰۶; Tanigaki et al. ۲۰۰۵; Yoon and Giaano, ۲۰۰۱; al. ۲۰۰۱)؛ عبارت دیگر طبق گزارشات این مسیر نقش بسیار مهمی در نوع عصبی دارد (Hitishi et al. ۲۰۰۱; Yoon et al. ۲۰۰۵). فعال سازی مسیر سیگنالینگ Notch با حفظ جمعیت NSC ها مشارکت می کند در حالیکه غیرفعال سازی مسیر سیگنالینگ Notch روند تمایز نوروینی NSC ها را به پیش می برد (Roos et al. ۲۰۰۳; Kageyama et al. ۲۰۰۸).

در طول تمایز عصبی، لیگاندها و رسپتورهای مسیر سیگنالینگ Notch در سیستم عصبی مرکزی بیان می شود و این بدان معنی است که این مسیر بطور نزدیکی در ارتباط با تنظیم تکثیر، حفظ و تمایز سلول های پیش عصبی می باشد (Louvi et al. ۲۰۰۶).

بیان *DLK*^۱ در سیستم عصبی مرکزی در حال نمو اعم از نوروئهای دوپامینرژیک مغز میانی گزارش شده است (Bauer et al. ۲۰۰۸; Christophersen et al. ۲۰۰۷; da Rocha et al. ۲۰۰۷). در مطالعه ای نشان داده شد *DLK*، تمایز نوروینی پیش سازهای مشتق از- سلول های بنیادی جنینی انسان و موش را با تعدیل سیگنالینگ Notch با واسطه-فاکتور رونویسی *Hes* ۱ و مسیرهای BMP/Smad به پیش می برد؛ عبارت دیگر *DLK* باعث افزایش توانائی نوروژنیک و تسریع روند تبدیل سرنوشت نوروینی از سلول های نورواکتوردردمی متعهد شده می گردد (Surmacz et al. ۲۰۱۱). مطالعه ای نشان داد که ترانسفکشن *miR-124* ی اندوژن باعث مهار مسیر Notch در NSC ها می شود (Jiao et al. ۲۰۱۷). یعنی *miR-124* تکثیر و تمایز NSC ها را با غیرفعال سازی مسیر Notch از طریق هدف گیری لیگاندهای این مسیر مانند *DLK* ۱ یا *DLL4* به پیش می برد.

^۱ -delta like non-canonical Notch ligand

فصل سوم : مواد و روش ها

۳-۱- نوع مطالعه

نوع مطالعه تجربی- آزمایشگاهی و از نوع کاربردی - بنیادی می باشد.

۳-۲- مکان و زمان انجام مطالعه

این تحقیق پس از تصویب نهایی طرح پیشنهادی، در آزمایشگاه های سلول های بنیادی، سلولی مولکولی و تحقیقاتی مرکزی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اردبیل از سال ۹۴-۹۶ به انجام رسید.

۳-۳- جمعیت و حیوانات آزمایشگاهی مورد مطالعه

حیوانات آزمایشگاهی اغلب به دو دسته جوندگان (موش و رت.....) و غیر جوندگان (سگ و خوک) تقسیم می شوند. در اکثر آزمایشگاه های دنیا از مورد اول بیشتر استفاده میشود زیرا این حیوانات دارای جثه کوچکی بوده و شرایط نگهداری آنها نیز راحت تر بوده، از طرف دیگر زاد و ولد این حیوانات سریع بوده و تعداد فرزندان در هر زایمان بیشتر است.

از طرف دیگر حیوانات آزمایشگاهی به دو گروه *inbred* و *outbred* تقسیم می شوند. جمعیت *inbred* جمعیت تولید مثلی درون گونه ای است که بین فرزندان یک پدر و مادر جفت گیری صورت می گیرد و در نتیجه فرزندان ایجاد شده بیشتر به سمت هوموزیگوسی پیش رفته و در اکثر ژنها خالص می شوند، در حالی که در جمعیت *outbred*، تولید مثل بین افراد خواهر و برادری صورت نمی گیرد و افراد بیشتر هتروزیگوس می باشند. مورد اخیر در تحقیقات ژنتیکی کاربرد بیشتری دارند، چون خزانه ژنی آنها طبیعی بوده و خصوصیات فنوتیپی و ژنوتیپی آنها تغییر نکرده است.

نمونه های *Inbred* طول عمر کوتاهتر و جثه کوچکتری نسبت به نمونه های مشابه *outbred* خود دارند. همچنین نمونه های *inbred* در طول زندگی دارای بحران تولید مثلی بالایی بوده و در نتیجه کاهش جفت گیری و زاد ولد، تعداد افراد کمتری تولید شده که در نتیجه کنترل این حیوانات را در آزمایشگاه راحتتر می کند. در بیشتر آزمایشگاهها استفاده از نمونه های *inbred* یا *outbred* به صورت انتخابی و براساس نوع تحقیق مورد نظر صورت می گیرد. ولی تحقیقات نشان داده که موارد استفاده از حیوانات *inbred* در آزمایشگاهها از نمونه های *outbred* مشابه بیشتر است (Phinney, ۱۹۹۹).

جمعیت مورد مطالعه در این تحقیق، موش های سوری (*Mouse*) با نام علمی *Mus musculus* بودند که از انیسیتو پاستور ایران تهیه شده بودند. سن حیوانات انتخابی بین ۶ تا ۸ هفته می باشد (شکل ۳-۱).



شکل ۳-۱- تصویری از موش سوری (*Mus musculus*)

۳-۴- دلایل انتخاب این حیوانات

۱. شباهت به انسان از نظر ساختار بافتی و فیزیولوژی بدنی
۲. قدرت زاد و ولد بالا (تعداد نوزادان در هر زایش ۱۰-۱۲ سر می باشد)
۳. دوره بارداری نسبتاً کوتاه (۱۹-۲۱ روز)
۴. کوچک بودن و راحتی کار با حیوان

۳-۵- شرایط نگهداری از حیوانات

در این مطالعه از موش‌های سوری نر و ماده‌ی نژاد BALB/C با سن تقریبی دو ماه و وزن تقریبی ۲۰۰-۳۰۰ گرم استفاده شد. در مدت آزمایش این حیوانات در خانه حیوانات دانشگاه علوم پزشکی اردبیل با شرایط نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی نگهداری شدند. درجه‌ی حرارت اتاق نیز در حدود ۳۷ درجه سانتی‌گراد حفظ می‌شد. حیوانات در قفس‌های پلاستیکی استاندارد و پوشیده شده از خورده چوب که دسترسی آزاد به آب و موادغذایی داشتند، نگهداری شدند. شرایط نگهداری و کار با حیوانات بر اساس توصیه‌های قوانین حمایت از حیوانات آزمایشگاهی بوده است.

۳-۶- آماده کردن حیوانات به منظور نمونه گیری

بمنظور دیپلاسیون هر موش، توسط اتر بیهوش و پس از بیجانی کامل، ناحیه ی لب بالای موش توسط بتادین ضد عفونی شد. سپس این ناحیه، توسط تیغ بطور کامل تراشیده شده و با استفاده از پنس و تیغ، نمونه پوستی این ناحیه که حاوی فولیکول های مو می باشد، جدا شدند. این نمونه ها به لوله فالکون ۱۵ میلی لیتری که حاوی بافر PBS می باشد، انتقال داده شدند.

۳-۷- فهرست تجهیزات آزمایشگاهی مورد استفاده

- اتوکلای Tomy ژاپن
- هود لامینار Jal tajhiz ایران
- میکروسکوپ معکوس Olympus ژاپن
- انکوباتور memmert آلمان
- میکروسکوپ فاز کنتراست Olympus ژاپن
- بن ماری memmert آلمان
- آون Behdad ایران
- سانتریفیوژ Behdad ایران
- سانتریفیوژ یخچال دار Sigma آلمان
- سانتریفیوژ Eppendorf mini spin آلمان
- سانتریفیوژ mini spin
- دستگاه آب دیونیزه Millipore فرانسه
- پیپتور Brand آلمان
- سمپلر تک کاناله ۱۰ μl Brand آلمان
- سمپلر تک کاناله ۱۰۰ μl Brand آلمان
- سمپلر تک کاناله ۱۰۰۰ μl Brand آلمان
- ترمال سایکلر BIO-RAD آمریکا
- ترمال سایکلر Eppendorf آلمان
- یخچال ۴ درجه سانتیگراد Hanzad
- یخچال ۲۰- درجه سانتیگراد Beco ترکیه
- یخچال ۸۰- درجه سانتیگراد Lab national آلمان
- ورتکس labtron ایران
- UVdoc انگلیس

- دستگاه الکتروفورز Akhtareian ایران
- PH متر Sartorius آلمان
- شیکر pol Ideal Pars ایران
- دستگاه Light cycler یا Real-time PCR شرکت Roche
- ترازو فوق حساس Sartorius آلمان
- ترازوی معمولی (KERN , KB^{۳۶۰-۳N})
- اسپکتروفوتومتر نانودراپ Thermo Scientific آمریکا
- دستگاه مایکروویو (جهت تهیه ژل الکتروفورز)
- دستگاه آب مقطر گیری

۳-۸- فهرست وسایل و ظروف آزمایشگاهی مورد استفاده

- فلاسک کشت سلولی فیلتردار SPL کره جنوبی
- پلیت کشت ۶ خانه ای SPL کره جنوبی
- پتری دیش ۱۰ سانتی متری Labtron ایران
- لوله فالکون ۱۵ میلی لیتر SPL کره جنوبی
- لوله فالکون ۱۵ میلی لیتری Sophra
- لوله فالکون ۵۰ میلی لیتری SPL کره جنوبی
- لوله فالکون ۵۰ میلی لیتری Sophra
- فیلتر سرسرنگی ۰/۲ میکرومتر Jet Biofeild (۱۵۰۶۲۳-۰۵۲)
- میکروتیوپ های ۰/۲ ، ۰/۵ و ۱/۵ میلی لیتری
- کرایوتیوب (Freezing tube (sorfa)
- وسایل جراحی
- تیغ بیستوری
- پیپت مدرج ۱۰ میلی لیتر
- سر سمپلر کریستالی (۱۳۱۰۰۹۰۲۰) membrane solution
- سر سمپلر ۱۰۰ میلی لیتری زرد (Global Roll (NLD۰۱۳)
- سر سمپلر ۱۰۰۰ میلی لیتری آبی Membrane
- Light cycler ۸-tube strips (Roche: ۰۶۶۱۲۶۰۱۰۰۱)
- استوانه مدرج ۱۰۰ و ۲۵۰ میلی لیتری
- ارلن مایر ۱۰۰ میلی لیتری
- ظرف تهیهی محلول ۱ لیتری قابل اتوکلاو

- تانک الکتروفورز
- سرنگ انسولین، سرنگ ۲ سی سی و ۵ سی سی
- رک میکروتیوپ و فالكون

۳-۹- فهرست مواد و کیت های مورد استفاده

- Agarose D\ Low EEO (Pronadisa:۸۰۱۲)
- Amphotericin B (Cipla:V.O.۰۶۹)
- BETADIN (Gibco : ۶۷۶۱۸-۱۵۰)
- Bovin Serum Albumin or BSA (biowest:P۶۱۵۴-۱۰GR)
- Chloroform (MERK: ۱۰۲۴۴۴)
- DispaseII (Gibco:۱۷۱۰۵-۰۴۱)
- DMEM low Glucose (Gibco:۱۷۱۴۵۴۰)
- DNA safestaine (cinna gen:EP۵۰۸۲)
- EDTA(Sigma:E۶۷۵۸)
- Ethanol ۱۰۰ (هامون طب مرکزی)
- Ethanol ۹۶(pars alcohol: ۵/۴۲/۸۳/۰۳۱)
- Fetal Bovine Serum or FBS (Gibco: ۱۰۲۷۰۱۰۶)
- Isopropanol (w۲۹۲۹۰۷)
- DNA Ladder (sinagene)
- DNA Loading dye (sinagene)
- Paraformaldehyde ۴٪
- Penicilin/streptomysin (Gibco:۱۵۱۴۰-۱۲۲)
- RPMI (Gibco:۱۱۲۷۸۵۹)
- Sodium acetate
- Sodium citrate
- Tri Reagent or TRIzol (Invitrogen,Carlsbad,CA)
- Triton /X۱۰۰(sigma ۹۰۰۲-۹۳-۱)
- Trypsin (sigma ۸۵۴۵۰C)
- Tween۲۰(sigma ۹۰۰۲-۹۳-۱)
- NaHCO_۳
- Nacl
- Kcl

- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
- KH_2PO_4
- CuSO_4 or Copper(II) sulfate
- Retinoic Acid (sigma ۳۰۲-۷۹-۴)
- BDNF (R&D SYSTEM : ۲۴۸-BD)
- SG qPCRMaster Mix ۲X(EURX :E۰۴۰۱-۰۱)
- Hydrocortisone (sigma: ۵۰-۲۳-۷)
- Insulin Regular (Human) (sigma : ۱۱۰۶۱-۶۸-۰)
- Non-Essential Amino Acids (NEAA)
- Cholera toxin (sigma: ۹۰۱۲-۶۳-۹)
- EGF (sigma: ۶۲۲۵۳-۶۳-۸)
- bFGF (sigma: ۱۰۶۰۹۶-۹۳-۹)
- TBE buffer 5X (Invitrogen : ۱۵۵۸۱۰۴۴)
- Donkey anti-rabbit Alexa Fluor 488 (Invitrogen, A۲۱۲۰۶)
- Rabbit anti-GFAP poly clonal antibody (sigma : G۴۵۴۶)
- Rabbit anti-MAP2 poly clonal antibody (sigma : M۳۶۹۶)
- Rabbit anti-NeuN poly clonal antibody (Abcam : ab۱۰۴۲۲۵)
- Vivantis ۲-Steps RT-PCR Kit (Lot No: ۲۰۱۴-۰۱)
- BON-miR miRNA 1st-Strand cDNA Synthesis Kit (Catalog # BON۲۰۹۰۰۱)
- miR-124-3p Inhibitor (Qiagen : MIN۰۰۰۰۱۳۴)
- miR-124-3p Mimic (Qiagen: MSY۰۰۰۰۱۳۴)
- HiPerFect Transfection Reagent (Qiagen)

۳-۱۰- روش تهیه محیط های کشت و محلول های مورد استفاده

۳-۱۰-۱- روش تهیه محیط کشت DMEM

پودر DMEM ۹/۹۹ گرم

NaHCO_3 ۲/۷ گرم

آب دیونیزه رساندن حجم نهایی به ۱۰۰۰ میلی لیتر

pH ۷/۲

ابتدا ۹/۹۹ گرم از پودر DMEM را توسط ترازوی دیجیتالی وزن نموده و سپس در بالن ژوژه یک لیتری که دقیق ترین حجم را جهت ساختن محلول های شیمیایی دارد ریخته و سپس ۲/۷ گرم بی کربنات سدیم را به آن اضافه می کنیم و کل حجم را توسط بالن ژوژه به یک لیتر رسانده و خوب مخلوط می کنیم . سپس توسط pH متر، pH محلول را اندازه می گیریم که معمولاً باید بین ۰/۳-۰/۲ کمتر از حد نرمال باشد (کمتر از ۷/۲) چون بعد از فیلتر کردن ۰/۳-۰/۲ به pH محلول اضافه می شود. حال اگر محلول قلیایی بود به آن مقداری اسید HCl یک نرمال اضافه می کنیم و اگر محیط اسیدی بود مقداری بی کربنات اضافه می کنیم تا pH محلول به حد مورد نظر برسد و بعد این محلول را در شرایط کاملاً استریل (در زیر هود) با فیلتر ۰/۲۲ میکرون در داخل یک ظرف استریل فیلتر می کنیم و سپس به آن محلول استرپتو مایسین - پنی سلین با نسبت یک درصد اضافه می کنیم و این محلول را در یخچال ۴ درجه سانتیگراد نگهداری می کنیم . حال در هنگام استفاده به ازای هر ۵۰ ml محیط کشت FBS ۵ ml به محیط در شرایط کاملاً استریل اضافه می کنیم و این محیط جهت کشت سلول های بنیادی فولیکول مو آماده می باشد.

۳-۱۰-۲- روش تهیه محیط کشت RPMI-1640

RPMI پودر ۱۰/۴۳ گرم

۲ گرم NaHCO₃

آب دیونیزه رساندن حجم نهایی به ۱۰۰۰ میلی لیتر

pH ۷/۲

محلول تهیه شده، توسط فیلترهای سرسرنگی ۰/۲۲ میکرومتر در فالكون های ۵۰ میلی لیتر، استریل شدند و در یخچال ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. مدت نگهداری محیط کشت حداکثر ۶ ماه می باشد.

۳-۱۰-۳- روش آماده سازی سرم جنینی گاو (FBS)

سرم در اثر عملکرد بیش از ۲۵ فاکتور انعقادی تشکیل می شود بطوری که لخته خون پس از تشکیل به طور طبیعی شروع به انقباض می کند و معمولاً ظرف ۲۰ تا ۶۰ دقیقه مایعی از خود خارج می کند که سرم نام دارد. سرم محتوی فاکتورهای رشدیست که تکثیر سلولی را پیش می برد و فاکتورهای چسبندگی و فعالیت آنتی تریپسین که اتصال سلول را پیش می برد، می باشد. همچنین سرم به عنوان منبعی از مواد معدنی ، لیپیدها و هورمونها می باشد که ممکن است به پروتئینها متصل شوند. سرم هایی که اغلب در کشت بافت استفاده می شود سرم گاو، جنین گاو، سرم اسب بالغ و سرم انسانی هستند، سرم جنین گاو اغلب به طور وسیع استفاده می شود. سرم جنین گاو به صورت آماده از شرکت GIBCO, USA خریداری و بوسیله انکوباسیون

در 56°C برای ۳۰ دقیقه غیر فعال شد و تا زمان استفاده در دمای 20°C نگهداری گردید. گرمایش باعث برداشتن کمپلمان ها^۱ (گروهی از مواد که در خون مهره داران وجود دارند و نقش اساسی در انهدام باکتریها و سلولهای دیگر را از طریق پادتن به عهده دارند که حرارت باعث از بین رفتن سریع تاثیرات این مواد می شود) از سرم می شود و فعالیت سیتوتوکسیک ایمنوگلوبین ها را بدون تخریب فاکتورهای رشد پلی پپتیدی کاهش می دهد.

۳-۱۰-۴- روش تهیه بافر (1X) PBS^۲

NaCl ۸ گرم

KCl ۰/۲ گرم

Na₂HPO₄ ۱/۴۴ گرم

KH₂PO₄ ۰/۲۴ گرم

آب دیونیزه رساندن حجم نهایی به ۱۰۰۰ میلی لیتر

pH ۷/۴-۷/۲

اندازه گیری pH این محلول توسط دستگاه pH متر در ۷/۴ صورت پذیرفت، سپس در دستگاه اتوکلاو استریل و برای مصارف بعدی در یخچال ۴ درجه نگهداری و قبل از هر بار استفاده دمای آن به 37°C رسانیده شد. این بافر به عنوان شستشو دهنده قبل از تریپسینه کردن سلول ها و همچنین به عنوان رقیق کننده Trypsin EDTA - به کار رفت.

۳-۱۰-۵- روش تهیه محلول (1X) Trypsin/EDTA

پودر تریپسین ۰/۲۵ گرم

EDTA ۰/۰۴ گرم

PBS ۱۰۰ میلی لیتر

محلول فوق توسط فیلتر سرسرنگی ۰/۲۲ میکرومتر استریل شد و پس از تقسیم در میکروتیوپ های ۱/۵ میلی لیتری، در فریزر ۳۰- نگهداری شدند. حداکثر مدت نگهداری در فریزر ۶ ماه می باشد. این محلول برای کندن سلول ها از کف ظروف کشت هنگام پاساژ آنها مورد استفاده قرار می گیرد.

۱- Complements

۲- Phosphate Buffered Saline

۳-۱۰-۶- روش تهیه محلول آمفوتریپسین B با غلظت ۵mg/ml

پودر آمفوتریپسین B ۰/۵ میلی گرم

PBS ۱۰۰ میلی لیتر

محلول نهایی توسط فیلتر سرسرنگی ۰/۲ میکرومتر، فیلتر شد. در فالكون‌های ۱۵ میلی لیتر ریخته و در یخچال ۴ درجه سانتی‌گراد برای مصرف یکساله نگهداری شدند.

۳-۱۰-۷- روش تهیه محلول دیسپاز II با غلظت ۱mg/ml

پودر دیسپاز ۱۰ میلی گرم

PBS ۱۰ میلی لیتر

محلول فوق توسط فیلتر سرسرنگی ۰/۲۲ میکرومتر استریل شد. در میکروتیوپ‌های ۱/۵ میلی لیتر توزیع و در ۳۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند. این آنزیم برای هضم آنزیمی و شل شدن قطعات اکسپلنت حاوی فولیکول‌های موی موش به هنگام پروسه کشت سلول مورد استفاده قرار می‌گیرد.

۳-۱۰-۸- روش تهیه کلاژن از پوست و تاندون پای گوسفند

پای گوسفند ۱ عدد

محلول سدیم استات ۰/۵ مولار ۳۰۰ میلی لیتر

محلول سدیم سترات ۰/۰۷۵ مولار ۱۰ میلی لیتر

آب دیونیزه ۱۰۰ میلی لیتر

پوست پای گوسفند و فاسیای زیرین آن توسط تیغ بیستوری جدا شدند و در پتری‌دیش شیشه‌ای قرار داده شدند. پس از آن، روی سطح پوست، کرم دپیلاتور به منظور زدودن موها به مدت ۵-۱۰ دقیقه قرار داده شد. پس از زدودن کامل موها، سطح پوست با آب شسته شد. پوست و تاندون‌ها به قطعات کوچک تقسیم شدند. این قطعات پس از تقسیم، توزین شدند. ۵ گرم از آن‌ها به درون فالكون ۵۰ میلی لیتر استریل منتقل شدند. ۳۰ میلی لیتر از محلول سدیم استات ۰/۵ مولار به محتوای فالكون اضافه شد. ۱ دقیقه میکس توسط دستگاه ورتکس صورت گرفت. پس از آن، محیط رویی دور ریخته شد و مجدداً محلول سدیم استات ۰/۵ مولار به آن اضافه شد (این مراحل، هفت بار تکرار شد). پس از اتمام هفت مرحله‌ی انجام شده، به منظور حذف سدیم استات باقی‌مانده، با آب دیونیزه شستشو داده شد. سپس، ۲ میلی لیتر از بافر سدیم سترات ۰/۰۷۵ مولار به

ازای هر گرم از نمونه افزوده شد. انجام ورتکس به مدت یک دقیقه و افزودن مجدد بافر سدیم سیترات ۰/۰۷۵ مولار (این مرحله نیز ۶ مرتبه تکرار می‌شود، با این اصول که در هر مرحله، محلول رویی دور ریخته نمی‌شود و فقط اضافه می‌شود). پس از اتمام این ۶ مرحله ورتکس، مایع شفاف و شناور رویی به فالكون استریل ۵۰ میلی‌لیتر مجزا منتقل می‌شود. مایع حاصل به مدت ۱۰ دقیقه در سانتریفیوژ با دور rpm ۱۲۰۰، قرار داده شد تا سدیم سیترات به همراه اندازه ذرات بزرگتر حذف گردند. محلول رویی فیلتر شد و بار دیگر به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با دور rpm ۱۲۰۰۰ سانتریفیوژ شد. در نهایت مایع حاصل به فالكون‌های ۱۰ میلی‌لیتر استریل انتقال داده شدند و برای مصارف بعد در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند. از این کلاژن‌ها برای پوشاندن^۱ کف فلاسک‌ها و پلیت‌های کشت سلولی، به منظور چسبیدن اکسپلنت‌ها و کشت نمونه استفاده می‌شود.

۳-۱۰-۹- روش تهیه محلول سدیم استات ۰/۵ مولاری

پودر $C_2H_3NaO_2$ (MW: 82.0343 gr/mol) ۱۳/۶ گرم

آب دیونیزه‌ی استریل ۲۰۰ میلی‌لیتر

محلول فوق، پس از حل شدن کامل و تنظیم pH بین ۷ تا ۷/۴، به یخچال ۴ درجه انتقال داده شد و در روند استخراج کلاژن مورد استفاده قرار گرفت.

۳-۱۰-۱۰- روش تهیه محلول سدیم سیترات ۰/۰۷۵ مولاری

پودر $Na_3C_6H_5O_7$ (MW: 258.06 gr/mol) ۱۴/۷ گرم

آب دیونیزه‌ی استریل ۲۰۰ میلی‌لیتر

ابتدا با حل کردن ۱۴/۷ گرم از پودر سدیم سیترات در ۵۰ میلی‌لیتر آب دیونیزه محلول یک مولاری حاصل می‌شود. سپس برای بدست آوردن ۲۰۰ میلی‌لیتر از محلول ۰/۰۷۵ مولاری، مقدار ۱۵ میلی‌لیتر از محلول سدیم سیترات یک مولاری را برداشته و توسط آب دیونیزه به حجم ۲۰۰ میلی‌لیتر می‌رسانیم. محلول فوق، پس تنظیم pH بین ۷ تا ۷/۴، به یخچال ۴ درجه انتقال داده شد و در روند استخراج کلاژن مورد استفاده قرار گرفت.

۳-۱۰-۱۱- روش تهیه رتینوئیک اسید با غلظت 10^{-2} مولار

پودر RA ۳ میلی گرم

اتانول ۹۶٪ ۱ میلی لیتر معادل ۱۰۰۰ میکرولیتر

تهیه این محلول باید در شرایط بدون نور و بصورت فویل پیچ و نیز بدون انجام فیلتراسیون انجام شود. برای بهتر حل شدن پودر RA از ورتکس استفاده شد. بعد از انحلال کامل و شفاف شدن ۱۰۰ میکرولیتر از آن را در ۹/۹۰۰ میکرولیتر از محیط کشت DMEM اضافه می کنیم تا مقدار ۱۰ میلی لیتر محلول رتینوئیک اسید ۱ میکرومولاری بدست آید. محلول حاصل پس از توزیع در بین ۲۰ میکروتیوب ۰/۵ میلی لیتری در یخچال ۳۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد. این استوک ها در روند تهیه محیط کشت تمایزی یا القای نورونی برای سلول های بنیادی مورد استفاده قرار گرفت.

۳-۱۰-۱۲- روش تهیه استوک های هیدروکورتیزون

پودر هیدروکورتیزون ۱ میلی گرم

اتانول ۹۶٪ ۱ میلی لیتر معادل ۱۰۰۰ میکرولیتر

آب دیونیزه‌ی استریل برای رساندن حجم نهائی به ۱۰ میلی لیتر

محلول فوق پس از استریل شدن توسط فیلتر سرسرنگی ۰/۲۲ میکرومتری در میکروتیوب‌های ۰/۵ میلی‌لیتر توزیع و در ۳۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند. از این استوک ها در روند تهیه محیط کشت مغذی یا پیش القا برای سلول های بنیادی تحت کشت استفاده شد.

۳-۱۰-۱۳- روش تهیه آلبومین سرم گاوی^۱ (BSA) ۰/۱٪

پودر BSA ۲۵ میلی گرم

بافر PBS ۲/۵ میلی لیتر

تهیه این محلول باید در شرایط بدون نور و بصورت فویل پیچ انجام شود. محلول فوق توسط فیلتر سرسرنگی ۰/۲۲ میکرومتری استریل شد و در یخچال ۳۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد. از این محلول در آماده سازی استوک های BDNF و تهیه محلول بلاکینگ در روند ایمونوسیتوشیمی استفاده گردید.

^۱ - Bovine Serum Albumin

۳-۱۰-۱۴- تهیه فاکتور نوروتروفیک مشتق از مغز BDNF

هر ویال این فاکتور حاوی $5\mu\text{g}$ BDNF نو ترکیب لیوفیلیزه است که با افزودن 1ml محلول استریل آب مقطر دیونیزه حاوی 0.1% BSA به آن یک محلول $5\mu\text{g/ml}$ تهیه می شود، سپس در حجم های مساوی در میکروتیوب ها 0.2ml توزیع شده و در یخچال 30°C - درجه ی سانتی گراد نگهداری شد. رقیق سازی این فاکتور رشد باید در شرایط بدون نور و بصورت فویل پیچ انجام شود. برای انحلال کامل از ورتکس استفاده شد. از این استوک ها در روند تهیه محیط کشت تمایزی یا القای نرونی برای سلول های بنیادی استفاده شد.

۳-۱۰-۱۵- تهیه فاکتور رشد فیبروبلاستی bFGF

هر ویال این فاکتور حاوی $100\mu\text{g}$ bFGF نو ترکیب لیوفیلیزه است که با افزودن 1ml محلول استریل آب مقطر دیونیزه حاوی 0.1% BSA به آن یک محلول $100\mu\text{g/ml}$ تهیه شده ، سپس در حجم های مساوی در میکروتیوب ها 0.2ml توزیع شده و در یخچال 30°C - درجه ی سانتی گراد نگهداری شد. از این استوک ها در روند تهیه محیط کشت تمایزی یا القای نرونی برای سلول های بنیادی استفاده شد.

۳-۱۰-۱۶- تهیه فاکتور رشد اپی تلیالی EGF

هر ویال این فاکتور حاوی $100\mu\text{g}$ EGF نو ترکیب لیوفیلیزه است که با افزودن 1ml محلول استریل آب مقطر دیونیزه حاوی 0.1% BSA به آن یک محلول $100\mu\text{g/ml}$ تهیه می شود، سپس در حجم های مساوی به میکروتیوب های 0.2ml تقسیم کرده و در فریزر 30°C - قرار داده و در تهیه محیط کشت تمایزی یا القای نرونی برای سلول های بنیادی مورد استفاده قرار می دهیم.

۳-۱۰-۱۷- آنتی بیوتیک Penicillin/ Streptomycin

این محلول به صورت آماده و در ظروف 100ml از شرکت GIBCO, USA خریداری شده و پس از توزیع در فالكون های 15 سی سی توسط پیپتور در دمای 30°C - نگهداری گردید.

۳-۱۰-۱۸- نحوه تهیه محیط کشت های مغذی^۱ یا پیش تمایزی^۲ برای کشت HFSC ها

DMED medium	۴۳ cc
FBS	۵ cc
Penicillin/ Streptomycin	۵۰۰ μl or ۵ cc
Insulin Regular (Human)	۱۰ μl
Hydrocortisone	۵۰۰ μl
Non-Essential Amino Acids (NEAA)	۵۰۰ μl
Cholera toxin	۱۰ μl
EGF	۱ μg or ۱۰۰۰ ng

جدول ۳-۱- تهیه محیط مغذی یا پیش تمایزی در حجم ۵۰ میلی لیتر

۳-۱۰-۱۹- نحوه تهیه محیط کشت تمایزی یا القای نورونی^۳ برای HFSC ها

Nutrient DMEM medium	۹/۵ cc
BDNF	۲۰ μl
bFGF	۱۰ μl
ATRA ۱ μM	۵۰۰ μl

جدول ۳-۲- تهیه محیط کشت القای نورونی در حجم ۱۰ میلی لیتر

تذکر : پس از آماده سازی محیط القای نورونی دور فالكون حاوی محیط را فویل پیچی می کنیم چون حاوی فاکتورهای رشد پروتئینی بوده و بهتر است در معرض نور قرار نگیرند.

۱- Nutrient medium
۲- pre-treat Medium
۳- Neural induction medium

۳-۱۰-۲۰- روش تهیه محلول پارافرمالدهید (PFA) ۴٪

ابتدا ۸۰۰ میلی لیتر محلول PBS را روی هیتر مغناطیسی قرار داده تا به دمای 60°C برسد سپس ۴۰ قرص یک گرمی پارافرمالدهید (Merck, Germany) داخل آن حل گردید. ابتدا محلول کدوری به دست می آید ولی با اضافه کردن یک عدد قرص NaOH محلول شفاف می شود. پس از حل شدن کامل PFA محلول را سرد کرده و با کاغذ صافی فیلتر کردیم. سپس با PBS به حجم ۱۰۰۰ میلی لیتر رساندیم. در مرحله بعد pH را به $7/4-7/2$ رساندیم. محلول را می توان به مدت یک ماه در یخچال ۴ درجه نگهداری کرد. از این محلول جهت فیکس کردن سلول ها در ایمونوسیتوشیمی استفاده می شود.

۳-۱۰-۲۱- روش تهیه محلول بلاکینگ^۱ سلولی

PBS	۲۰ cc
BSA powder	۲۰۰ mg
Triton X ^{۱۰۰}	۵۰ μl
Tween ۲۰	۵۰ μl

جدول ۳-۳- تهیه محیط محلول بلاکینگ سلولی

۳-۱۰-۲۲- روش تهیه محلول بلاکینگ آنتی بادی

PBS	۲۰ cc
BSA powder	۲۰۰ mg
Triton X ^{۱۰۰}	۵۰ μl
Tween ۲۰	۵۰ μl
FBS	۵۰۰ μl

جدول ۳-۴- تهیه محیط محلول بلاکینگ آنتی بادی

^۱ -Blocking reagent

۳-۱۰-۲۳- روش تهیه محلول DAPI با غلظت ۵ میلی گرم بر میلی لیتر

DAPI ۱ میلی گرم

Triton-x۱۰۰ ۱۰ میکرولیتر

بافر PBS ۱۰۰ میلی لیتر

محلول بدست آمده را که به عنوان استوک تهیه شده داخل ویال های کوچک ریخته و در فویل آلومینیومی پیچیده در ۴ درجه سانتیگراد قرار می دهیم تا در موقع نیاز یعنی ایمونوسیتوشیمی بمنظور رنگ آمیزی هسته ی سلول ها ، انجام شمارش سلولی ، بررسی میزان آپوپتوزیس هسته ای و بررسی میزان نکروزیس سلولی استفاده گردد.

۳-۱۰-۲۴- روش تهیه بافر EDTA (۰/۵ M)

Na₂EDTA ۲H₂O ۱/۸۶ گرم

DDH₂O ۸ میلی لیتر

NaOH ۲۰۰ میلی گرم

مواد فوق خوب حل شده و حجم آن با آب دیونیزه، به ۱۰ میلی لیتر رسانده شد. pH محلول نیز در حدود ۸ تنظیم گردید.

۳-۱۰-۲۵- روش تهیه بافر TBE(۵X)

H₂O ۴۰ میلی لیتر

EDTA ۰/۵ مولار ۱ میلی لیتر

Boric Acid ۱/۳۷۵ گرم

پودر Tris base ۲/۷ گرم

ترکیبات فوق خوب حل شده و حجم آن توسط آب دیونیزه، به ۵۰ میلی لیتر رسانده شد. pH این بافر روی ۷,۴ تنظیم شد. از رقت سازی این بافر، TBE(۰,۵X) مورد نیاز برای الکتروفورزیس تهیه شد.

۳-۱۱- روش انجام تکنیک ها

۳-۱۱-۱- کشت سلول های ناحیه بالچ فولیکول موی ناحیه ی سبیل موش سوری

۳-۱۱-۲- برداشت نمونه از ناحیه ی سبیل موش سوری

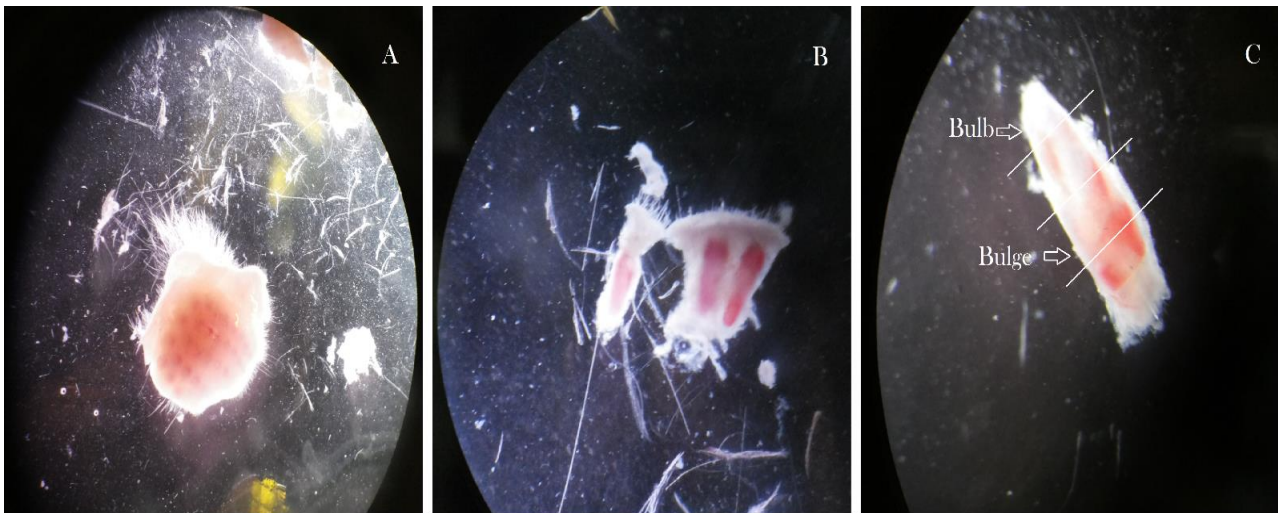
جهت جدا کردن فولیکول مو از ناحیه بالچ از روش تعدیل شده ی کوبایشی استفاده شد. برای برداشت نمونه، موش سوری به وزن تقریبی ۲۵۰ میلی گرم ۸ هفته ای انتخاب شد. پس از بیهوشی کامل با اتر، ناحیه ی سبیل (لب بالا) موش توسط بتادین به مدت ۳ دقیقه استریل شد. پس از آن، توسط تیغ و تراش مخصوص، موهای این ناحیه به طور کامل زدوده شدند. برای برداشت لب بالای موش، از پنس و تیغ استفاده شد. نمونه ها پس از برداشت به درون فالكون استریل حاوی ۳ میلی لیتر PBS جهت انتقال به آزمایشگاه ریخته شد.

۳-۱۱-۲- انتقال نمونه به آزمایشگاه و جداسازی فولیکول های مو

نمونه در آزمایشگاه بلافاصله به زیر هود انتقال داده شد. سه بار با PBS شستشو داده شد. پس از آن بمنظور ضد عفونی بیشتر اکسپلنت ها به مدت ۴۰ ثانیه با الکل ۷۰٪ استریل شدند. یکبار شستشو با PBS و پس از این برای سست شدن بافت های همبند و جداسازی راحت تر فولیکول های مو، روی نمونه ۲ میلی لیتر از محلول دیسپاز II ریخته شد و به مدت ۳۰ دقیقه در انکوباتور، در دمای ۳۷ درجه ی سانتی گراد انکوبه شد. پس از سپری شدن زمان ۳۰ دقیقه، نمونه ها پس از شستشو توسط PBS در مجاورت محیط کشت RPMI به پتری دیش استریلی انتقال داده شدند. وجود محیط در پتری دیش حاوی نمونه ها برای زنده ماندن سلول ها و جلوگیری از خشک شدن اکسپلنت ها ضروری است. در زیر میکروسکوپ، پس از برداشتن و پاک سازی کامل رشته های فیبروبلاستی اطراف فولیکول، به آرامی فولیکول های مو را جدا می کنیم.

۳-۱۱-۳- جداسازی ناحیه بالچ فولیکول مو

پس از جداسازی کامل فولیکول ها، در زیر میکروسکوپ، با توجه به جهت و شکل فولیکول ها، این ارگان به ۴ قسمت تقسیم می شود. به ترتیب از سمت ساقه ی مو، ۱/۴ ثانویه که برجسته دیده می شود، ناحیه ی بالچ می باشد. انتهائی ترین ناحیه ی فولیکول مو، که همان ۱/۴ انتهایی است، ناحیه ی بالب است. (شکل ۳-۱).



شکل ۳-۲- مراحل جداسازی فولیکول موی سبیل موش سوری زیر میکروسکوپ

(A) بافت ناحیه سبیل موش ، (B) فولیکول های موی جدا شده و (C) تقسیمات چهارگانه ی یک فولیکول مو

نواحی بالچ پس از برش توسط تیغ بیستوری استریل، در پتری دیش های جدا که حاوی محیط کشت RPMI بودند، انتقال داده شدند. در زیر هود، پس از کشیدن محیط کشت و شستشو با PBS ، روی هر ناحیه، ۲ میلی لیتر PBS همراه با ۱۰۰ میکرولیتر پنی سیلین / استرپتومايسين و ۱۰۰ میکرولیتر محلول آمفوتریپسین B ریخته شد. پس از گذشت ۱ دقیقه، ترکیبات فوق به آرامی کشیده شده و مجدداً با PBS شستشو داده شدند. پس از خورد کردن این نواحی توسط تیغ بیستوری، به طور جداگانه به فلاسک کشت کوت شده با کلاژن، انتقال و با محیط کشت DMEM حاوی ۱۰٪ FBS کشت داده شدند.

۳-۱۱-۱-۴- کوت کردن فلاسک کشت با کلاژن

در زیر هود، مقدار ۲ میلی لیتر از کلاژن استخراج شده را به فلاسک کشت ریخته و با پی پتاژ کردن، تمامی سطوح فلاسک را آغشته به این ماده می کنیم. فلاسک کشت برای استریل شدن، به مدت ۳۰ دقیقه، در زیر هود در معرض نور UV قرار گرفت. این عمل دوبار پیاپی تکرار شد. برای رفع اسیدیته ی کلاژن، ابتدا مقدار ۳ میلی لیتر از PBS روی آن ریخته شد. پس از تکرار سه بار این عمل با بازه ی زمانی نیم ساعت، در انتها میزان ۳ میلی لیتر از محیط کشت RPMI ریخته شد. در نتیجه ی مشاهده ی عدم تغییر رنگ محیط پس از گذشت نیم ساعت، اسیدیته ی کلاژن از بین رفته و فلاسک کشت برای کشت اکسپلنت آماده شد.

۳-۱۱-۵- کشت سلول‌های ناحیه بالچ فولیکول موی موش سوری

پس از انتقال اکسپلنت‌های بالچ به فلاسک‌های کوت شده، به طور جداگانه این نواحی با محیط کشت DMEM که حاوی ۱۰٪ FBS ، ۱٪ پنی سیلین / استروپتومايسين و اسیدآمینه‌های ضروری و غیرضروری بودند، کشت داده شدند. سپس به انکوباتور با دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد، رطوبت ۹۵٪، و ۵٪ CO₂ انتقال داده شدند. مهاجرت سلول از نمونه‌ی کشت داده شده، ۵ روز پس از کشت رخ خواهد داد.

۳-۱۱-۲- پاساژ سلول‌ها (تقسیم و انتقال به محیط جدید)

با تکثیر سلول‌ها و رسیدن سلول‌ها به مرحله‌ی تراکم یک لایه‌ای در کف فلاسک کشت، این سلول‌ها باید به فلاسک‌های جدید انتقال پیدا کنند که این فرآیند پاساژ سلولی نامیده می‌شود. در واقع پاساژ سلولی به منظور ایجاد فضای بیشتر جهت رشد سلول‌ها در حال تکثیر و افزایش جمعیت سلول‌ها است. از دیگر فواید پاساژ سلولی رسیدن به جمعیت سلولی خالص تر در پاساژهای بالاتر است. برای این کار، در زیر هود و در محیط استریل، ابتدا محیط کشت رویی قدیمی سلول دور ریخته شده و با افزودن ۲-۳ میلی‌لیتر از PBS، سلول‌ها شستشو داده شدند. مقدار ۱ الی ۱/۵ میلی‌لیتر از تریپسین ۱X با سمپلر به درون فلاسک و روی سلول‌ها اضافه شد و به مدت ۵ دقیقه در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شد. پس از گذشت این زمان، سلول‌ها در زیر میکروسکوپ بررسی شدند. تریپسین اتصالات بین سلولی را سست کرده و در نتیجه سلول‌ها از سطح فلاسک جدا می‌شوند. پس از جدا شدن سلول‌ها از کف فلاسک، برای خنثی‌سازی تریپسین میزان ۱ میلی‌لیتر از FBS و ۲ میلی‌لیتر از محیط کشت به فلاسک اضافه و پس از شستشو به فالكون ۱۵ میلی‌لیتر استریلی منتقل شد و ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۸۰۰ rpm سانتریوفیوز شد. پس از اتمام سانتریفوژ، محیط رویی حذف و با وارد کردن چند ضربه به قسمت انتهایی لوله‌ی فالكون، پلاک سلولی از کف لوله فالكون جدا شده و ۲ میلی‌لیتر محیط کشت به آن اضافه کرده، پس از پی‌پتاز در فلاسک‌های جدید توزیع و در انکوباتور ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و ۵٪ CO₂ نگهداری شدند.

۳-۱۲- تمایز سلول‌های بنیادی فولیکول مو به سمت سلول‌های نوروئی

بدلیل وجود پتانسیل تمایز عصبی در HFSC ها، از این سلول‌ها برای تمایز به سلول‌های نوروئی استفاده گردید. در اینجا، ما از یک روش اندکی اصلاح شده برای تمایز HFSC ها به سلول‌های عصبی استفاده کردیم. به این صورت که بمنظور تمایز سلولی در وهله اول سلول‌ها در پاساژ دوم توسط تریپسین ۱X از فلاسک جدا شدند و با تراکم ۲×۱۰^۵ سلول در cm^۲ در محیط مغذی پیش‌تمایزی حاوی DMEM ، FBS ، ۱۰٪ ، ۱٪ آنتی بیونتیک پنی سیلین / استروپتومايسين ، ۱٪ اسیدهای آمینه‌های غیر ضروری ، انسولین ۵ μg/ml ، هیدروکورتیزون ۰/۵ mg/ml ، کلراتوکسین ۱×۱۰^{-۹} مولار و EGF ۲۰ ng/ml به مدت ۱۴ روز در ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO₂ کشت داده شدند .

در وهله دوم پس از اتمام ۱۴ روز ابتدا محیط روئی قبلی آنها برداشته شد سپس سلول ها با PBS شستشو داده شدند و تحت کشت با محیط القای تمایز نورونی متشکل از DMEM ، ۵٪ FBS ، ۱ μM ATRA ، ۱۰ μg/ml BDNF و ۱۰ ng/ml bFGF به مدت ۱۰ روز قرار گرفتند. هر سه روز یکبار محیط القای نورونی تعویض می شد. بعد از گذشت ۱۰ روز سلول ها برای بیان ژن و پروتئین های تمایزی به روش ایمونوسیتوشیمی و Real-Time PCR آماده سازی شدند.

۳-۱۳- اثبات تمایز HFSC ها به سمت سلول های عصبی

۳-۱۳-۱- ایمونوسیتوشیمی^۱

ایمونوسیتوشیمی (ICC) تکنیک رایج بسیار اختصاصی و حساس آزمایشگاهی برای تشخیص یک پروتئین یا آنتی ژن خاص در سلول ها با استفاده از آنتی بادی های نشان دار اختصاصی اولیه ای که به آن متصل می شوند. آنتی بادی اولیه به هنگام اتصال با آنتی بادی ثانویه ی دارای فلوروفور یا فلوروکروم همراه منجر به مرئی شدن پروتئین زیر یک میکروسکوپ فلورسنت می شود. فلوروفور ترکیب شیمیایی فلورسنتی است که می تواند پس از تحریک نوری ، نور را بطور مضاعفی منتشر نماید. در واقع آنتی بادی نشان دار، سیگنالی مانند فلورسانس یا رنگ را در اثر یک واکنش آنزیمی ایجاد می کند که برای مشاهده آن به میکروسکوپ نوری نیاز است. ICC برای آنالیز سلول های کشت شده یا سلول هائی با ماتریکس خارج سلولی حذف شده می باشند.

۳-۱۳-۱-۱- کشت و آماده سازی سلول ها

سلول های ناحیه بالچ پس از کشت طبق روش توضیح داده شده، باتوجه به گروه بندی کنترل و القای نورونی، به طور مجزا، در دو پلیت کشت ۶ خانه ای کشت داده شدند. پس از پر شدن حداقل ۵۰ درصد از خانه ها از سلول، این سلول ها به مدت ۴ روز در معرض محیط های کشت پیش تمایزی و تمایزی طبق گروه بندی قرار گرفتند. پس از اتمام این مدت، سلول ها برای انجام تکنیک منظور، آماده شدند.

۳-۱۳-۲- روش انجام تکنیک ایمونوسیتوشیمی

- کشیدن محیط رویی سلول های کشت شده در پلیت
- شستشوی این سلول ها با بافر PBS

^۱-Immunocytochemistry (ICC)

- فیکس کردن سلول ها با افزودن ۴۰۰ میکرولیتر از محلول پارافرمالدهید ۴٪ به درون هر ول از پلیت به مدت ۱۰ الی ۱۵ دقیقه در زیر هود
- کشیدن محلول پارافرمالدهید ۴٪ از روی سلول ها پس از گذشت ۱۰ تا ۱۵ دقیقه
- سه مرتبه شستشوی سلول ها با بافر PBS (هر بار به مدت ۱ تا ۳ دقیقه)
- افزودن ۵۰۰ میکرولیتر از محلول بلاکینگ سلولی به درون هر ول و قرار دادن در دمای اتاق به مدت ۳۰ دقیقه (بهتر است نمونه ها در معرض مستقیم نور نباشند).
- کشیدن محلول بلاکینگ از روی سلول ها پس از اتمام مدت زمان ۳۰ دقیقه ای مرحله قبل
- سه مرتبه شستشوی سلول ها با بافر PBS هر بار به مدت ۱ تا ۳ دقیقه
- افزودن ۳۰۰ تا ۴۰۰ میکرولیتر از آنتی بادی های اولیه رقیق شده با محلول بلاکینگ آنتی بادی با نسبت های مختلف بر روی سلول ها (جدول ۳-۵) و قرار دادن پلیت های فویل پیچ به مدت یک شب (overnight) یعنی ۲۴ ساعت در دمای ۸-۲ درجه سانتی گراد
- برداشتن محلول آنتی بادی اولیه از روی سلول ها در فضای بدون نور
- سه مرتبه شستشوی متوالی سطح سلول ها توسط ۴۰۰ الی ۵۰۰ میکرولیتر بافر PBS
- افزودن ۳۰۰ تا ۴۰۰ میکرولیتر از محلول آنتی بادی ثانویه رقیق شده با محلول بلاکینگ آنتی بادی با نسبت ۱ به ۲۰۰ بر روی سلول ها (جدول ۳-۵)
- قرار دادن پلیت کشت فویل پیچ بر روی دستگاه شیکر به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق
- کشیدن محلول روئی سلول ها پس از طی شدن ۲ ساعت
- سه مرتبه شستشو با بافر PBS در اتاق تاریک
- رنگ آمیزی افتراقی با DAPI (۱ μg/ml) به مدت ۵ دقیقه در اتاق تاریک
- سه مرتبه شستشو با بافر PBS در اتاق تاریک
- ثبت تصاویر سلولی توسط میکروسکوپ فلورسنت Olympus

Antibody		Vendor & Catalog Number	Dilution
Primary	rabbit anti-MAP- ^۲ polyclonal antibody	Sigma-Aldrich: M۳۶۹۶	۱:۴۰۰
	rabbit anti-GFAP polyclonal antibody	Sigma-Aldrich: G۴۵۴۶	۱:۵۰۰
	rabbit polyclonal Anti-NeuN antibody	Abcam : ab۱۰۴۲۲۵	۱:۲۰۰
Secondary	donkey anti-rabbit Alexa Fluor 488	Invitrogen: A۲۱۲۰۶	۱:۲۰۰
	Goat Anti-Rabbit Alexa Fluor ۵۹۴	Abcam : ab۱۵۰۰۸۰	

جدول ۳-۵- آنتی بادی های اولیه و ثانویه استفاده شده برای رنگ آمیزی ایمونوسیتوشیمی سلول های تمایز

برای کمی سازی نتایج، ابتدا از ۱۰ میدان تصادفی از لام های رنگ آمیزی شده با میکروسکوپ فلورسنس عکسبرداری شد. سپس توسط نرم افزار Image J ابتدا تعداد هسته های رنگ شده و سپس تعداد سلول های رنگ شده شمارش شد. در نهایت نسبت میانگین تعداد سلول های رنگ شده به میانگین هسته ها به دست آمد و به صورت درصد بیان گردید.

۳-۱۳-۲- بررسی بیان ژن های هدف با استفاده از تکنیک Real-time PCR^۱

واکنش زنجیره ای پلیمرازی یا PCR، روش کلون کردن ژن در شرایط آزمایشگاه است. هدف از آن سنتز رشته های DNA جدید از روی رشته های الگوست که به صورت زنجیره وار تکرار می شود. PCR، دارای انواع متعددی می باشد که یکی از آنها Real-time PCR است. تکنیک Real time PCR مشاهده لحظه به لحظه و بی وقفه پیشرفت واکنش PCR (یا همان فرآیند تکثیر اسید نوکلئیک) در طول زمان می باشد. این روش بر مبنای فلوروسنت تولیدی از مولکول گزارشگر^۲ متصل شونده به DNA- یا پرایمرهای لیبل دار فلورسنسی موسوم به پروب ها^۳ است که در طول واکنش افزایش می یابد و قابلیت توصیف کمی دارد. در واقع پروب یا مولکول گزارشگر نشاندار در طی واکنش حضور داشته و در هر سیکل تکثیر در طی تکثیر و متناسب با میزان محصولات، تجزیه شده و نور ساطع شده از آن در هر سیکل قابل اندازه گیری بوده و توسط نمایانگر شناسایی و ثبت می شود.

روش Real time PCR دارای مزایای زیر می باشد:

- ۱- تکثیر در هر زمان قابل مشاهده است.
- ۲- امکان بهینه سازی واکنش به گونه ای که مناسب ترین غلظت DNA و پرایمر و همچنین تعداد سیکل لازم برای تکثیر مشخص می شود.

^۱-Real-time Polymerase Chain Reaction

^۲-Reporter

^۳-probes

- ۳- امکان قطع واکنش در زمان دلخواه
- ۴- انجام PCR کمی با استفاده از روش سنجش مطلق و سنجش نسبی میزان دقیق و نسبی الگوی اولیه قابل اندازه گیری است.
- ۵- واکنش بسیار سریع اتفاق می افتد و زمان کمتری لازم است.
- ۶- محدوده تشخیص آن از PCR معمولی بالاتر است.
- مواد شیمیایی متفاوتی برای Real- Time PCR استفاده می شوند
- در این روش از یک کنترل درونی یا مثبت که همراه نمونه اصلی تکثیر می یابد به منظور نرمال کردن نمونه استفاده می شود. کنترل درونی ، یک ژن House keeping بوده و در همه نمونه ها و در شرایط مختلف بیان ثابتی دارد .

۳-۱۳-۲-۱- استخراج RNA از بافت و سلول

- استخراج RNA برای بررسی سطح بیان ژن های مورد نظر انجام گرفت. باید توجه داشت از آنجایی که RNA نسبت به فعالیت RNase بسیار حساس می باشد، کلیه وسایل و مواد باید عاری از RNase باشند ؛ پس می بایستی برای حفظ RNA موارد زیر را رعایت کرد :
- ۱- تمامی سطح هود و سطوحی که در حین کار با آنها سروکار داریم، مثل سطوح سانتریفوژ و رک ها باید با الکل ۷۰٪ شستشوداده شوند.
- ۲- از ظروف، میکروتیوب ها، لوله ها و سرسمپلرهای RNase free که اختصاصاً برای کار با RNA تهیه شده اند استفاده شود.
- ۳- از دستکش های یکبار مصرف و بدون پودر لاتکس استفاده شود و از تماس با دست خودداری شود زیرا پوست دست حاوی آنزیم RNase است.
- مراحل کار برای بافت و سلول یکی است، هردو استخراج توسط تریزول^۱ انجام پذیرفت، فقط در سلول، میزان کمتر از این ماده و در بافت به میزان بیشتر از این ماده ریخته شد. (سلول ۷۰۰ میکرولیتر و بافت ۱۰۰۰ میکرولیتر). استخراج RNA برای بررسی سطح بیان ژن های مورد نظر و به شرح ذیل انجام گرفت:

- ۱) خورد کردن کامل ناحیه بالج با تیغ بیستوری استریل در زیر هود
- ۲) انتقال کامل بافت های خورد شده به میکروتیوب های استریل جداگانه
- ۳) الف- در نمونه های بافتی : اضافه کردن ۱ میلی لیتر از تریزول روی نمونه ها و ورتکس نمونه ها به مدت ۳ دقیقه به منظور حل شدن قطعات بافتی در تریزول
- ب- در نمونه سلولی : خروج نمونه های سلولی حاوی تریزول از فریزر ۸۰- درجه و ورتکس چند ثانیه ای پس از ذوب شدن نمونه ها بمنظور انحلال کامل در تریزول

۴- TRI Reagent or Trizol

- ۴) اضافه کردن ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم به ازای هر یک میلی لیتر از بافت هموزن شده
- ۵) سانتریفیوژ به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴°C با دور ۱۲۰۰۰ g
- ۶) در این مرحله سه لایه مشاهده شد: لایه رویی (upper phase) حاوی RNA، لایه حد واسط (Mid phase) حاوی DNA و لایه زیرین که پروتئین ها در آن هستند.
- ۷) انتقال فاز بالایی حاوی RNA به میکروتیوب جدید
- ۸) اضافه کردن نسبت یک به یک ایزوپروپرانول سرد (Merck, Germany)
- ۹) قرار دادن میکروتیوب ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد
- ۱۰) سانتریفیوژ به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴°C با دور ۱۲۰۰۰g در این مرحله رسوب RNA قابل مشاهده است.
- ۱۱) تخلیه محلول رویی پس از اتمام سانتریفیوژ
- ۱۲) شستشو رسوب RNA با اتانول ۷۵ درصد (برای این منظور به رسوب RNA مقدار ۵۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۵ درصد اضافه شده و به آرامی مخلوط گردید).
- ۱۳) سانتریفیوژ به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴°C و دور ۷۵۰۰g
- ۱۴) برداشت مایع رویی و خشک کردن نسبی رسوب RNA (خشک کردن لبه میکروتیوب حاوی رسوب به آرامی با دستمال کاغذی یا قرار دادن در مجاورت هوا در زیر هود بمدت ۵ الی ۱۰ دقیقه با در باز)
- ۱۵) اضافه کردن ۳۵ میکرولیتر DEPC Water به محتویات درون میکروتیوب به منظور غیر فعال کردن DNase
- ۱۶) قرار دادن نمونه ها در بنماری با دمای ۵۸ درجه سانتی گراد و زمان ۱۰-۱۵ دقیقه به منظور حل شدن RNA

۳-۱۳-۲-۲- اندازه گیری مقدار RNA استخراج شده

غلظت RNA با روش تعیین دانسیته نوری (OD) توسط دستگاه Nano drop اندازه گیری شد. RNA را در طول موج های ۲۶۰ و ۲۸۰ ارزیابی گردید. اسید نوکلئیک حداکثر جذب را در ۲۶۰nm دارد و پروتئین های آلوده کننده RNA طول موج ۲۸۰nm را به خوبی جذب می کنند. برای تعیین دانسیته نوری توسط دستگاه Nano drop پس از کالیبراسیون دستگاه با DEPC Treated Water (به عنوان حلال RNA) ۱ میکرولیتر از RNA استخراج شده از هر گروه به دستگاه منتقل شده و نسبت جذب آن در طول موج ۲۶۰ نانومتر به ۲۸۰ نانومتر (OD_{۲۶۰/۲۸۰}) محاسبه گردید. غلظت RNA های به دست آمده در این مطالعه عددی بین ۲۰۰-۸۰۰ نانوگرم بر میکرولیتر بود. RNA به دست آمده در دمای ۸۰°C- نگه داری شد. برای بررسی کیفیت RNA استخراج شده ۱μg از آن را روی ژل ۱/۲ درصد (۴۸۰ میلی گرم پودر آگارز و ۴۰ میلی لیتر بافر ۰.۵X TBE) مورد بررسی قرار دادیم و باندهای ۵S، ۱۸S و ۲۸S مشاهده گردید.

۳-۱۳-۲-۳- سننز cDNA از RNA استخراج شده

برای انجام واکنش Real-time PCR نیاز به DNA داریم برای همین DNA مکمل یا cDNA^۱ از RNA ی استخراج شده از سلول ها باید ساخته شود. جهت انجام PCR ابتدا باید طی یک واکنش رونویسی معکوس RNA استخراج شده به cDNA تبدیل گردد. طی این واکنش به کمک آنزیم نسخه برداری معکوس (RT)^۲ از روی RNA رشته cDNA ایجاد می شود که می تواند الگویی برای پرایمرهای اختصاصی ژن های مورد نظر باشد. برای سننز از کیت VIVANTIS که شامل دو مرحله برای سننز می باشد ، استفاده شد. برای بدست آوردن حجمی از نمونه RNA که حاوی ۱ μg RNA باشد، باید عدد ۱۰۰۰ را بر غلظت RNA اندازه گیری شده توسط نانودراپ (برحسب ng/μl) تقسیم کرد. عدد حاصل را λ می نامیم. واحد λ، μl خواهد بود:

$$\text{غلظت RNA } \left(\frac{ng}{\mu l} \right) = \frac{1000 \text{ ng}}{\lambda \text{ } \mu l} \quad \lambda \text{ } (\mu l) = 1000 / \text{RNA}$$

جزئیات مراحل اول و دوم سننز cDNA طبق پروتوکول VIVANTIS به شرح زیر است :

Component	Volume
Total RNA	۳μl
Random Hexamer primer	۱μl
^۳ dNTP mix	۱μl
Noclease Free water	۵μl

جدول ۳-۶- مرحله اول سننز cDNA

۱- Complementary DNA

۲- Reverse Transcriptase

۳- deoxyNucleoside TriPhosphates

مواد مزبور به آرامی مخلوط شده و اسپین شدند. آنگاه مخلوط واکنش به مدت ۵ دقیقه در دمای ۶۵ درجه‌ی سانتی گراد درون ترمال سایکلر انکوبه گردید. پس از اتمام انکوباسیون و خروج از دستگاه، بلافاصله به مدت ۳-۲ دقیقه بر روی یخ قرار داده شد. سپس ترکیبات زیر به آن اضافه گردید:

Component	Volume
۱۰X Buffer M-MuLV	۲µl
M-MuLV Revers Transcriptase enzyme	۰/۵µl
Noclease Free water	۷/۵ µl

جدول ۳-۷- مرحله دوم سنتز cDNA

مواد فوق به آرامی مخلوط شده و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد انکوبه شدند. سپس جهت سنتز cDNA به مدت ۱ ساعت در معرض دمای ۴۲ درجه سانتیگراد قرار گرفته و پس از آن به مدت ۵ دقیقه در دمای ۸۵ درجه سانتیگراد قرار داده شدند تا اثر آنزیم ترانس کریپتاز معکوس خنثی شود. سپس cDNA سنتز شده پس از خروج از دستگاه ، در دمای ۲۰- برای انجام واکنش‌های بعدی نگهداری شد.

۳-۱۳-۲-۴- نحوه ی انجام واکنش RT-PCR با ژن GAPDH

برای اطمینان از cDNA سنتز شده RT-PCR با استفاده از GAPDH به صورت زیر انجام شد واکنش PCR در میکروتیوب های ۰/۲ میلی لیتری به شرح زیر می باشد :

Component	Volume
ddH ₂ O	۷۷۹ µl
10x Buffer	۱۳۰ µl
Mgcl ₂ (۵۰mM)	۶۵ µl
dNTP Mix (۱۰Mm)	۲۶ µl

جدول ۳-۸- تهیه ی مستر میکس برای انجام واکنش PCR

پس از تهیهی MasterMix، ترکیب مواد برای انجام واکنش PCR به شرح زیر است:

Component	Volume
Mastermix ^{۲/۵}	۲۰ μ l
cDNA	۳ μ l
Primer Forward (۱۰ pmol)	۱ μ l
Primer Reverse (۱۰ pmol)	۱ μ l
Taq DNA Polymerase	۰/۵ μ l

جدول ۳-۹- ترکیب مواد برای واکنش PCR

پس از آماده سازی مواد آنها را درون دستگاه ترمال سایکلر با تنظیمات زیر قرار می دهیم:

مراحل	دما (سانتی گراد)	زمان	تعداد سیکل
Initial denaturation	۹۴	۳ min	۱
Denaturation	۹۴	۳۰ sec	۳۵
Annealing	۶۰	۳۰ sec	۳۵
Extention	۷۲	۴۵ sec	۳۵
Final Extention	۷۲	۷ min	۱

جدول ۳-۱۰- مراحل دمایی واکنش PCR برای پرایمر GAPDH

۳-۱۳-۲-۵- طراحی پرایمر

توالی ژن ها از سایت [Http:// www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov) استخراج شد و پرایمرهای مستقیم (F) و معکوس (R) با استفاده از نرم افزارهای Gene runner (version ۳) و primer express (version ۳,۰۵) طراحی شدند.

ویژگی های یک پرایمر به صورت زیر است:

- ۱- طول پرایمر باید بین ۱۹ تا ۴۰ نوکلئوتید (در حالت بهینه بین ۲۰ تا ۲۵ نوکلئوتید) باشد.
- ۲- دمای هیبریداسیون پرایمرها T_m باید بین ۵۸ تا ۶۰ درجه سانتی گراد باشد.
- ۳- درصد CG پرایمرها باید بین ۳۰-۸۰ درصد باشد (که مقدار بهینه ۴۵-۵۵٪) است.

۴- طول قطعه تکثیری ۱۵۰-۱۰۰ نوکلئوتید باید باشد یعنی پرایمر معکوس ۱۵۰-۱۰۰ نوکلئوتید پائین دست باید انتخاب شود.

۵- در ۵ نوکلئوتید انتهایی، بیش از دو نوکلئوتید C یا G وجود نداشته باشد.

۶- در توالی پرایمرها بیش از ۳ نوکلئوتید G پشت سر هم قرار نگرفته باشد.

۷- پرایمرها فاقد ساختار ثانویه، پرایمر دایمر و سنجاق سر باشد.

۸- اختلاف T_m پرایمرها حداکثر ۰/۵ درجه سانتی گراد باشد.

پس از طراحی پرایمر در وب سایت NCBI، پرایمر طراحی شده در قسمت Blast primer بلاست شد. پرایمرهای سفارشی به صورت لیوفیلیزه می‌باشد، پس از ذوب پرایمرها در دمای اتاق و سانتریفوژ مختصر آنها، مقداری آب دیونیزه (ساخت شرکت سازنده) به پرایمرها اضافه می‌شود تا غلظت مورد نظر به دست آید سپس پرایمرها در فریزر ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری می‌شود. فهرست پرایمرها، توالی، نوع پرایمر، دمای ذوب و طول در جدول (۳-۱۱) آمده است.

Genes	Primer sequences (۵' - ۳')	Size (bp)	Annealing (°C)
<i>GAPDH</i>	F: TGAAGCAGGCATCTGAGGG	۲۱۵bp	۵۵-۶۰
	R: CGAAGGTGGAAGAGTGGGAG		
<i>Map ۲</i>	F: CTGGACATCAGCCTCACTCA	۱۶۴bp	۵۵
	R: AATAGGTGCCCTGTGACCTG		
<i>Rbfox ۳</i>	F: CAACATCCCCTTCCGGTTC	۳۱۳bp	۵۶
	R: TGACCTCAATTTCCGTCCC		
<i>PtbP ۱</i>	F: AGCAGAGACTACACTCGACCT	۳۳۰bp	۶۰
	R: GCTCCTGCATACGGAGAGG		
<i>CCND ۱</i>	F: GCGTACCCTGACACCAATCT	۱۱۰bp	۶۰
	R: ATCTCCTTCTGCACGCACTT		
<i>NR ۲E ۱</i>	F: ATGCCCCGTAGACAAGACAC	۱۴۷bp	۶۰
	R: CGGAAGTAGAGAGCCACCTG		
<i>RCOR ۲</i>	F: CCAAGGGCATGTACCTGAGT	۱۴۴bp	۵۸
	R: GGCTGCTATTGGTCTGCTTC		
<i>Sox ۹</i>	F: AGCTCACCAGACCCTGAGAA	۲۰۰bp	۶۰
	R: TCCAGCAATCGTTACCTTC		
<i>DLK ۱</i>	F: AGCTGGCGGTCAATATCATC	۱۶۲bp	۵۹
	R: AGCTCTAAGGAACCCCGGTA		

جدول ۳-۱۱- توالی پرایمرهای ژن‌های هدف

۳-۱۳-۲-۶- الکتروفورز محصول PCR بر روی ژل آگارز

برای اطمینان از انجام محصول PCR حاصل ، محصولات حاصل از آن بر روی ژل ۲ درصد در بافر TBE (۰/۵X) الکتروفورز گردید.

- مواد لازم جهت تهیه ژل آگارز ۲٪

پودر آگارز	۸۰۰ میلی گرم
بافر TBE ۰/۵X	۴۰ میلی لیتر

برای تهیه ی ژل ۲درصد ، ابتدا مقدار لازم آگاروز وزن شد (براساس حجم نهایی) و در مقدار مناسب بافر TBE (۰/۵X) ریخته و در میکروویو جوشانده تا کاملاً حل شده و شفاف گردد. سپس در مکان تاریک، ۱میکرولیتر از DNA Safe stain به ژل اضافه شد و به شکل 8 خوب هم زده شد پس از خنک شدن، ژل ذوب شده درون سینی شیشه ای یا پلاستیکی تمیز که قبلاً در آنها شانه‌های پلاستیکی برای تشکیل چاهک قرار داده شده بود، ریخته شد. سینی روی سطحی صاف قرار داده شد تا پس از حدود ۱۵-۲۰ دقیقه در حرارت محیط ببندد.

* به منظور بارگیری نمونه ها بدین صورت عمل شد:

۱- بعد از سفت شدن ژل آگاروز (حدود ۲۰ دقیقه)، ژل را درون تانک الکتروفورز حاوی بافر TBE ۰/۵X

قرار داده و شانه پلاستیکی برداشته شد.

۲- برای انتقال مقداری از محصول PCR به درون چاهک‌های ژل : ۲ میکرولیتر محلول رنگی Loading

Dye را به درون هر تیوب ریخته و سپس نمونه ها میکروسانتریفوژ می شوند تا رنگ با نمونه مخلوط شود، سپس ۱۲ میکرولیتر از هر نمونه برداشته و درون چاهک ها قرار داده شد.

۳- چاهک سمت راست به سایز مارکر یا DNA Ladder اختصاص داده شد(حدوداً ۳µl) تا شدت باند PCR، در مقایسه با آن سنجیده شود ؛ به علاوه استفاده از Ladder در مراحل تنظیم PCR، برای تشخیص باند مورد نظر بر اساس طول باند از سایر باندها مورد استفاده قرار گرفت.

۴- جریان الکتریکی ۱۰۰ ولت به مدت ۶۰-۴۰ دقیقه در تانک برقرار شد تا DNA به سمت قطب مثبت الکتروفورز حرکت کند.

۵- برای آشکار سازی ژل : ژل رنگ شده با DNA Safe Stain را از کست خارج کرده و داخل دستگاه Gel Doc قرار داده و جایگاه ژل را تنظیم کرده و درب دستگاه بسته شد. مانیتور را روشن کرده و از طریق مانیتور محل قرارگرفتن ژل را تنظیم گردید. سپس اشعه uv را روشن کرده تا باندها نمایان شوند. با کلید (+) و (-) نور را زیاد و کم کرده. وقتی باندها مرئی شد کلید save را فشار داده و عکس ژل گرفته می شود.

۳-۱۴-تعریف و مفهوم Real-time PCR

تکنیک Real-time PCR بسیار شبیه به روش PCR می باشد و در ریل تایم نیز همانند PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی، یک توالی تکثیر می گردد. اما تفاوت ریل تایم با PCR معمولی در سنجش کمی توالی تکثیر شده می باشد. یکی از ویژگی های تکنیک ریل تایم ، استفاده از یک گزارشگر فلورسنت در طی واکنش بمنظور ردیابی میزان تکثیر محصول و مشاهده پیشرفت PCR می باشد. این گزارشگرهای فلورسنت به گونه ای طراحی می شوند که در صورت تکثیر DNA ، با اتصال به دو رشته ی آن ، نور ساطع می کنند. بنابراین در روش ریل تایم با تکثیر DNA ، میزان قطعات دو رشته ای افزایش یافته و با اتصال رنگ های فلورسنت به آن ها میزان نور انتشار یافته نیز افزایش می یابد. به این ترتیب با انتشار نور فلورسنت در سیکل های متوالی بر اثر مضاعف شدن محصول PCR افزایش می یابد و با ثبت مقدار فلورسنت ساطع شده در هر سیکل، می توان پیشرفت تکثیر محصولات واکنش PCR را در طول مرحله نمایی PCR مشاهده نمود. اگر نموداری میان لگاریتم مقدار شروع واکنش و افزایش فلورسنت گزارشگر ترسیم شود، یک رابطه خطی مشاهده خواهد شد لذا می توان گفت افزایش شدت نور ثبت شده در دستگاه با میزان محصول بدست آمده نسبت مستقیم دارد.

۳-۱۴-۱- مواد شیمیایی و رنگ های فلورسنت

مواد شیمیایی متفاوتی برای Real-Time PCR مورد استفاده قرار می گیرد که بر همین اساس روش ریل تایم به دو دسته تقسیم بندی می شود :

۳-۱۴-۱-۱- روش استفاده از شناساگرهای فلورسنت اختصاصی

در این روش از تعدادی شناساگر های آلیگونوکلوئوتیدی ژن های هدف موسوم به پروب^۱ از قبیل پروب های دو سویه نشاندار^۲، پروب های هیدرولیز (تگ من^۳)، پروب های هیبریزیداسیون FRET^۴، آمپلی فلورها^۵، پروب بیگون مولکولی^۶، پروب های عقربی^۷، پروب های سایه افکن^۸، پروب های متحرک^۹، پروب های درخشان^{۱۰} و غیره استفاده می شود.

۱-Probe
۲- Dual hybridization probes
۳- Hydrolysis (TaqMan) probes
۴- FRET Hybridization Probes
۵-Amplifluor assays
۶- Molecular Beacons
۷- Scorpion® Probs
۸- Eclipse probes
۹- Displacing probes
۱۰- Light-Up Probes

۳-۱۴-۲- روش استفاده از شناساگرهای فلورسنت غیر اختصاصی

در این روش از رنگ های فلورسنت متصل شونده به-DNA^۱ ی دو رشته‌ای^۱ موسوم به رنگ های اینترکاله^۲ مانند سایبرگرین^۳ (SG) یا اواگرین^۴ به عنوان گزارشگر فلورسنت بمنظور ردیابی میزان تکثیر محصول و مشاهده پیشرفت PCR استفاده می گردد. این رنگ ها قابلیت اتصال به DNA ی تک رشته ای را ندارند . در این پروژه از رنگ اینترکاله SYBR-GreenI بعنوان گزارشگر استفاده می شود که به شکاف کوچک مارپیچ دو رشته‌ای DNA متصل می شود. هنگامی که SG به مولکول دو رشته‌ای متصل می شود انرژی تحریکی خود را به صورت نور فلورسانس تابش می دهد. زمانی که مولکول DNA طی واکنش PCR تکثیر می شود رنگ فلورسنت به محصول تکثیر شده ی دو رشته‌ای متصل شده و سیگنال فلورسنت افزایش می یابد. در داخل محلول، رنگ‌هایی که باند نشده‌اند فلورسنت خیلی کمی را نشان می دهند و فلورسنت زمانی به وضوح افزایش می یابد که رنگ به DNA دو رشته‌ای متصل شود، SYBR Green تحت شرایط PCR، پایدار و با ثبات باقی می ماند. سطح مطلوبی از درجه حرارت موجب تنظیم القاء و نشر طول موجها می شود بنابراین در دستگاه Real-Time PCR افزایش سیگنال فلورسنت را در مقابل میزان فلورسنت زمینه مورد آنالیز قرار می گیرد و از این طریق میزان تکثیر را می توان طی زمان از طریق اندازه گیری فلورسانس مورد بررسی قرار داد. البته برای انجام یک واکنش Real- Time PCR برخی شرایط واکنش مثل $dNTP, MgCl_2$ ، آنزیم تک‌پلی‌مراز و غیره باید تنظیم شود.

۳-۱۴-۲- تنظیم و بهینه سازی غلظت پرایمرها

بهینه کردن غلظت پرایمرها به صورت واکنش‌های رقت متوالی از پرایمرهای مستقیم (FW) و معکوس (RV) انجام می شود. دامنه غلظت پرایمرها در واکنش رقت‌های متوالی بین ۵۰ تا ۳۰۰ نانومولار می باشد، رقت‌های متوالی پرایمرها بایستی با مقدار ثابتی از DNA الگو انجام شود. یک واکنش بدون حضور DNA الگو (NTC)^۵ موسوم به کنترل منفی (NC)^۶ انجام می شود واکنش NTC دارای سیکل آستانه یا Ct^۷ بالایی است. در پایان این مرحله بایستی منحنی‌های ذوب بررسی شود. وجود پیک اضافی در دماهای پائین تر از نقطه ذوب بیانگر ایجاد پرایمر دایمر به علت غلظت بالای پرایمر است (نمودار ۳-۱). علاوه بر این پرایمرها باید خلوص بالایی داشته باشند و آلودگی نداشته باشد این باعث حساسیت بیشتر واکنش می شود و در ضمن خالص بودن پرایمر منجر به تفاوت زیاد در مقدار Ct می شود.

۱- fluorescent dsDNA-intercalating dyes

۲- Intercalating Dyes or fluorescent DNA-intercalating dyes

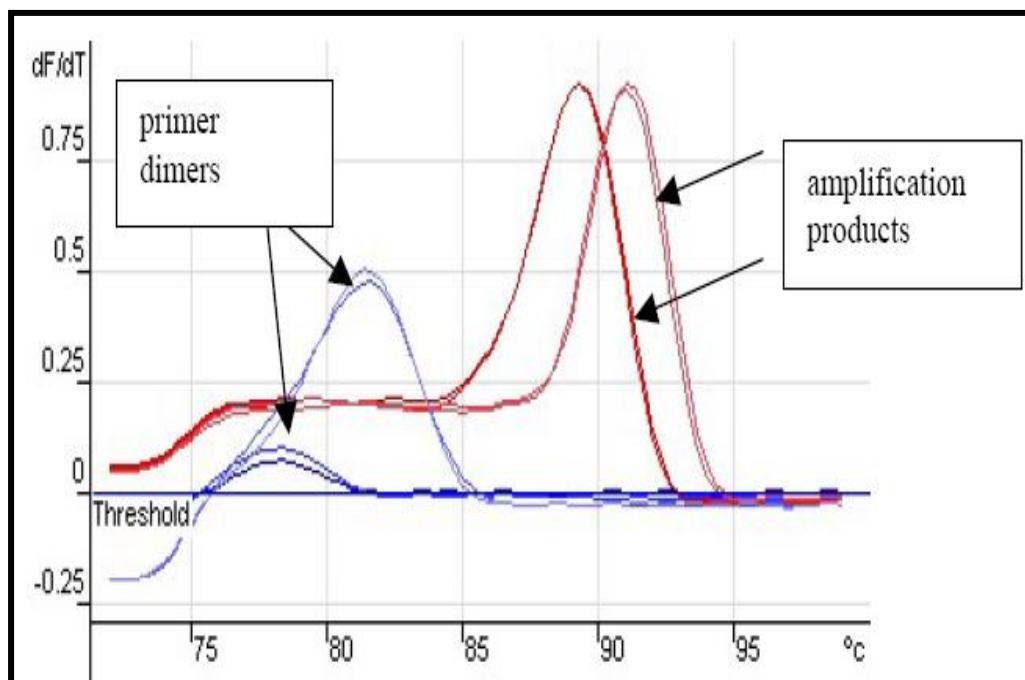
۳- SYBR® Green

۴- Eva Green

۵- Non Template Control

۶- Negative Control

۷- Cycle of threshold (Ct)



نمودار ۳-۱- ایجاد پرایمر-دایمر

یکی از روش های محاسبه میزان کارایی^۱ پرایمرها و یا میزان E استفاده از رقت های متوالی در واکنش ریل تایم و ترسیم منحنی استاندارد و محاسبه شیب خط می باشد .

۳-۱۴-۳- منحنی استاندارد^۲

برای رسم منحنی استاندارد یک سری رقت از نمونه ها تهیه می شود از روی نمودار تکثیر Ct نمونه ها مشخص می شود. سپس منحنی استاندارد بر اساس Ct در محور Y و log تعداد کپی در محور X رسم می شود. این منحنی خطی است با شیب منفی با داشتن Ct نمونه مجهول و قرار دادن آن در معادله منحنی استاندارد تعداد کپی مشخص می شود.

$$Y = mx + b$$

Y = سیکل آستانه ، m = شیب خط ، x = لگاریتم مقدار نمونه الگو ، b = عرض از مبدأ بازدهی واکنش با فرمول زیر محاسبه می شود:

$$\text{کارایی واکنش زنجیره پلیمرز} = \left[10^{\left(\frac{-1}{\text{شیب}}\right)} \right] - 1$$

عرض از مبدأ (b) نشانگر حساسیت آزمایش است.

۱- Efficiency
۲- standard curve

۳-۱۴-۴- منحنی تکثیر^۱

قبل از هر نوع آنالیزی منحنی‌های تکثیر به صورت منحنی‌های رنگی ممتد ترسیم می‌شود. اگر منحنی میزان تکثیر محصول در Real time PCR بر حسب سیکل‌های PCR ترسیم گردد، می‌توان دریافت که این منحنی شامل چهار فاز می‌باشد که عبارتند از: (نمودار ۳-۲)

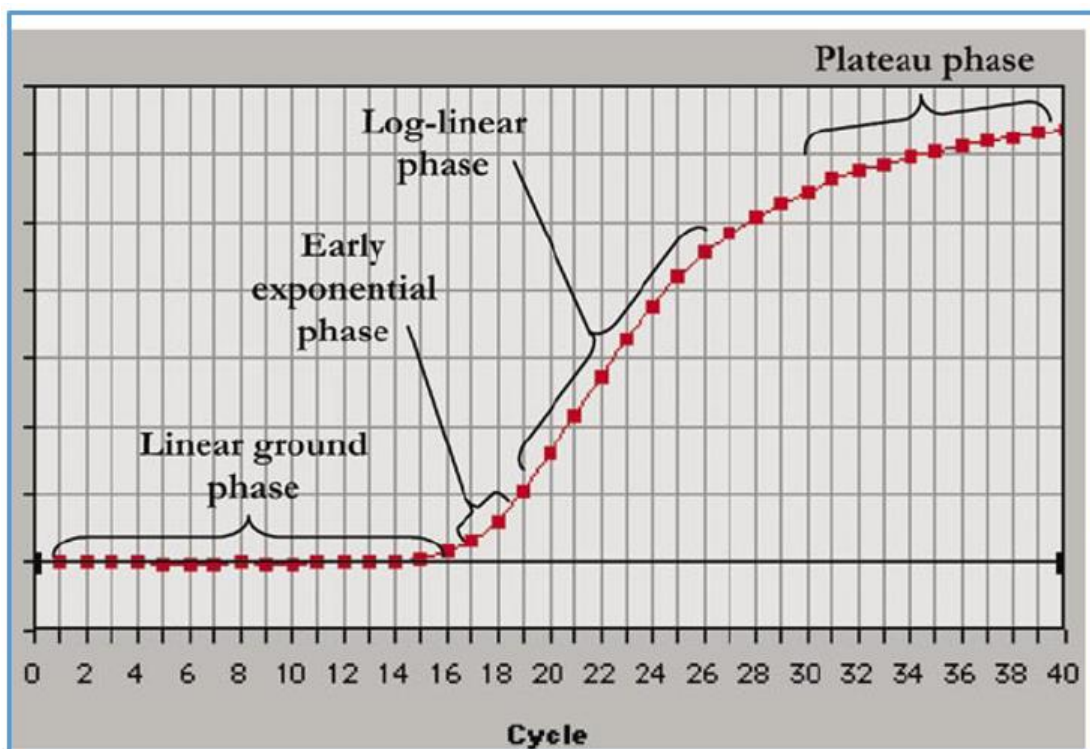
۳-۱۴-۴-۱- فاز خط پایه^۲: خط پایه شامل تمامی واکنش‌های تکثیری است که زیر سطح تشخیص دستگاه Real-time PCR قرار دارد اگرچه هیچ سیگنالی وجود ندارد اما تکثیر تصاعدی نمونه‌ها در این سیکل رخ می‌دهد. بعبارت دیگر در این فاز میزان تکثیر محصولات به قدری نیست که سبب افزایش نور فلورسنت گردد و نور فلورسنت مشاهده در این فاز از cDNA، پرایمرها و رنگ‌های فلورسنت آزاد در محیط واکنش نشر می‌یابد بنابراین در این فاز میزان نور ساطع شده به صورت خطی می‌باشد.

۳-۱۴-۴-۲- فاز خط نمایی (تصاعدی) اولیه^۳: فاز نمایی شامل اولین سیگنال قابل تشخیص است که تکثیر تصاعدی نمونه‌ها در آن رخ می‌دهد. در این فاز میزان محصول دو رشته‌ای در هر چرخه دو برابر می‌شود بنابراین میزان محصولات به صورت نمایی افزایش می‌یابد. طول مدت این فاز به غلظت نمونه الگو و حساسیت آزمایش انجام شده بستگی دارد. در شرایطی که در این فاز از هر مولکول، دو مولکول در شرایط ایده آل ساخته شود، راندمان صد در صد است.

۳-۱۴-۴-۳- فاز خطی^۴: در این فاز به علت مصرف واکنش‌دهنده‌ها مثل پرایمر، dNTP و ... راندمان تکثیر کاهش می‌یابد و در آخر به صفر می‌رسد.

۳-۱۴-۴-۴- فاز مسطح یا پلاتو^۵: در این فاز، ترکیبات واکنش از بین می‌روند و دیگر محصولی تکثیر نمی‌شود بنابراین افزایشی در میزان فلورسنت مشاهده نمی‌شود. به اصطلاح ریل تایم در این مرحله اشباع شده است.

۱- amplification plot
۲- Baseline region or Linear ground phase
۳- early Exponential phase
۴- Log- liner phase
۵- plateau phase

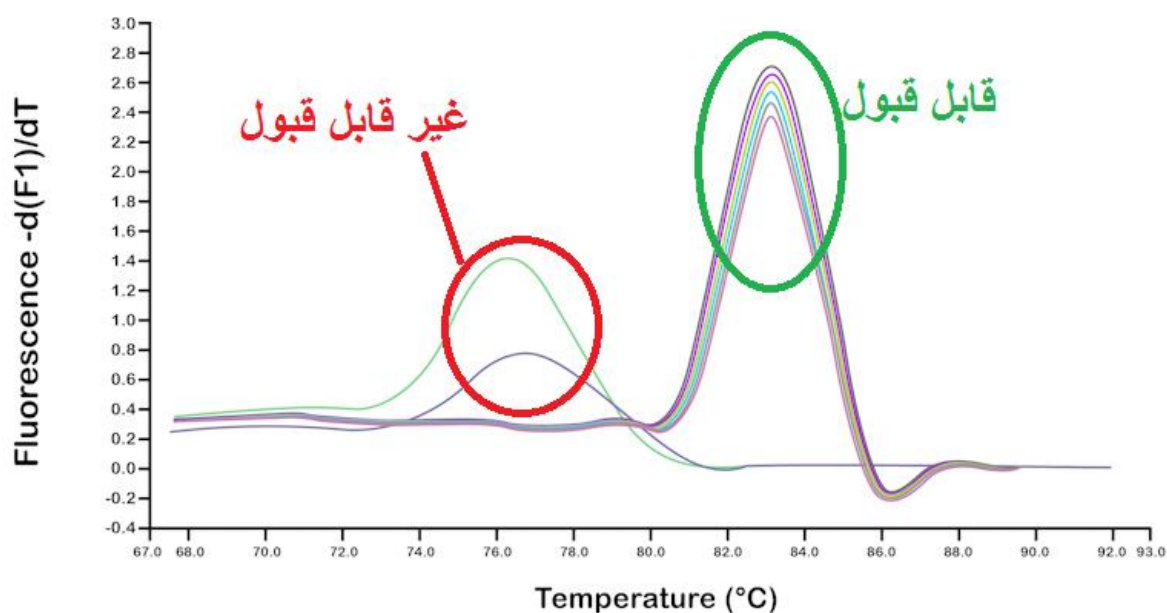


نمودار ۳-۲- نمودار تکثیر محصولات در ریل تایم بر حسب سیکل: همان گونه که مشاهده می گردد تا ۱۵ سیکل اول در میزان محصولات تکثیر شده تغییر محسوسی دیده نمی شود اما از سیکل ۱۶، واکنش وارد یک فاز افزایشی می گردد که به آن فاز Exponential می گویند. سیکلی که در آن واکنش وارد فاز Exponential می گردد به میزان الگوی اولیه بستگی دارد. یعنی هر چه میزان الگوی اولیه برای تکثیر بیشتر باشد واکنش در Real time در سیکل پایین تری وارد فاز Exponential می گردد.

۳-۱۴-۵- منحنی ذوب^۱

از جمله مزایای Real-Time PCR ترسیم منحنی ذوب است که پس از اتمام فرآیند PCR رسم می شود. دمای ذوب DNA به ساختمان، طول، غلظت شناساگر، میزان نمک محیط و درصد CG بستگی دارد. دستگاه نمونه ها را در فاصله های زمانی مشخص به مقدار معینی تغییر می دهد و در این مدت نور ساطع شده از نمونه ها توسط دستگاه اندازه گیری می شود، همزمان با این عمل منحنی تغییرات فلورسانس بر حسب دما که همان منحنی ذوب است ترسیم می گردد. در دمای 94°C ، DNA واسرشته شده و میزان فلورسانس کاهش می یابد، نقطه میانی این کاهش مطابق با دمای ذوب DNA می باشد. در نقطه ذوب ۵۰٪ پیوندهای هیدروژنی در مولکول DNA دو رشته ای از هم جدا می شوند و میزان فلورسانس به طور ناگهانی تغییر می یابد. پیک های تشکیل شده در دمای پائین ارتباط مستقیمی با مقدار محصولات غیر اختصاصی در انتهای فرآیند PCR دارند. از آن جایی که هر ژن دارای منحنی ذوب خاص خود می باشد بنابراین منحنی های یک ژن در تمام نمونه ها باید با هم منطبق باشند و همچنین باید تمام منحنی ها تک قله باشند (نمودار ۳-۳).

^۱-Melting curve



نمودار ۳-۳- نمونه هایی از منحنی ذوب قابل قبول و غیر قابل قبول: می بایست همه قله های یک ژن روی یک دما باشند ولی نیازی نیست ارتفاع قله ها یکسان باشد.

۳-۱۴-۶- خط آستانه^۱

به صورت توافقی سیکلی که در آن محصولات ، وارد فاز Exponential شده و از یک حد آستانه (threshold) فراتر رفته است، به عنوان سیکل مرجع در نظر گرفته می شود . در تکنیک ریل تایم به این سیکل مرجع اصطلاحاً سیکل آستانه یا Ct (نمودار ۳-۴) اطلاق می شود که مفهوم آن برای همه دستگاه ها یکسان بوده و تعیین دقیق محل خط آستانه ، مرحله اساسی در آنالیز داده هاست.

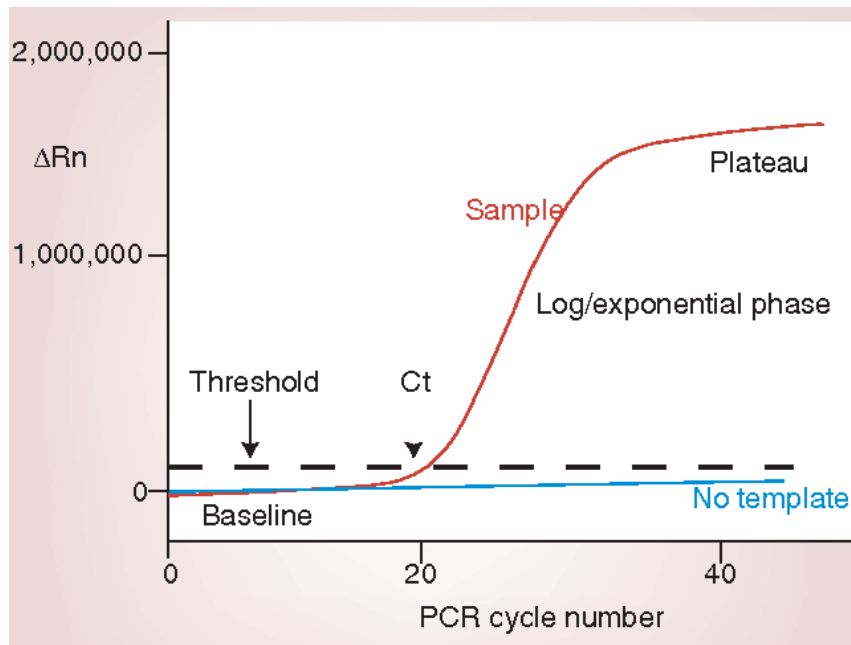
Ct کمتر به این معنی است که نمونه زودتر به فاز Exponential رسیده و دارای الگوی بیشتری است و می توان گفت که بیان ژن مورد نظر در آن نمونه بیشتر بوده است ؛ لذا معمولاً « Ct کمتر به منزله بیان بیشتر » است. اما باید توجه شود که درست بودن این فرض به شرایط بسیاری بستگی دارد. همواره وجود احتمال بروز انواع خطاهای آزمایشگاهی مانند خطای سمپلینگ سبب می شود که نتوان به Ct به عنوان یک پارامتر جهت مقایسه دو نمونه اعتماد نمود. لذا برای حل این مشکل ما در ریل تایم از یک کنترل درونی یا مثبت بصورت ژن های مرجع یا House keeping مانند GAPDH^۲ ، β -actin و یا RPLP0^۳ استفاده کنیم که بیان یکسان آن ها در تمام نمونه ها به اثبات رسیده است و به دلیل اینکه برای حیات سلول ها ضروری اند معمولاً دارای بیان بیشتری نسبت به سایر ژن ها هستند (Ct کمتری دارند). از آنجایی که بیان بین این ژن ها در تمام نمونه ها باید یکسان باشد در صورتی که بین Ct این ژن ها در نمونه های مختلف اختلافی مشاهده

^۱ - threshold line

^۲ - GlycerAldehyde-۳-Phosphate DeHydrogenase

^۳ - Ribosomal Protein Lateral stalk subunit P0

گردد، به این معنی است که شرایط آزمایش برای همه نمونه ها یکسان نبوده و با توجه به Ct این ژن ها می توان Ct مربوط به ژن مورد بررسی را اصلاح نمود .



نمودار ۳-۴- خط آستانه (Threshold) و سیکل آستانه (Ct) در ریل تایم

(ΔRn : میزان انتشار فلورسنت محصول در هر نقطه زمانی)

۳-۱۴-۷- مراحل عملی انجام تکنیک QRT-PCR (Quantitative Real Time-PCR) یا

SYBR green qRT-PCR

قبل از انجام واکنش Real-timePCR باید عملکرد و اختصاصی بودن پرایمرها چک شود. در این حالت واکنش به صورت دوتایی (Duplicate) به همراه یک واکنش بدون DNA الگو (NTC) یعنی کنترل منفی برای هر ژن انجام می شود. در این مرحله واکنش Real-Time PCR برای ژن های هدف انجام می شود. قبل از انجام واکنش همه نمونه ها باید رقیق شود. سپس Master mix، پرایمرهای مستقیم (FW) و معکوس (RV) هر ژن پس از خروج از فریزر تکان داده شود و بر اساس مقادیر محاسبه شده رقیق شوند یعنی پرایمرها از غلظت ۱۰۰ pM/ml به ۱۰ pM/ml رسانده شود که پرایمر آماده برای استفاده شود.

در مرحله بعد کل مخلوط total mix به روش زیر آماده می شود (جدول ۳-۱۲)؛ تمامی مقادیر مورد استفاده، برای انجام یک واکنش می باشد.

Component	Volume
SG qPCR Master Mix (2X) or Maxima SYBER Green	10 µl
Forward primer	1 µl
Reverse primer	1 µl
cDNA	3 µl
Nuclease Free Water	5 µl
Total Volume	20 µl

جدول ۳-۱۲- مراحل انجام واکنش Real-time PCR برای ژن های هدف

نمونه ها را در دستگاه لایت سایکلر گذاشته و تنظیمات ذیل را انجام می دهیم (جدول ۳-۱۳):

Steps	Temperature ^{oc}	Time (sec)	Cycle
Perincubation	95	600	1
2 Step Amplification	95	60	40
	60	60	
	72	60	
Melting	95	10	40
	65	60	
	97	1	
Cooling	37	30	40

جدول ۳-۱۳- پروتوکل دمایی سه مرحله ای کیت Real-time PCR

در دستگاه Real Time PCR سه دمای اصلی وجود دارد:

۱- دمای واسرشت شدن (Denaturation)

۲- دمای اتصال پرایمر (Primer Annealing)

۳- دمای بسط پرایمر (Temperature & Set Up)

برنامه دما و زمان واکنش Real-Time PCR متغیر بوده و بستگی به کیت مورد استفاده، قابلیت دستگاه،

طول قطعه تکثیری و ویژگی پرایمرها دارد.

۳-۱۴-۸- تعیین دمای باز سرشتی پرایمرها

دمای باز سرشتی دمای ویژه هر قطعه از پرایمر DNA می باشد که در آن دما با قطعه مکمل خودش در مولکول DNA تک رشته پیوند هیدروژنی تشکیل می دهد. به منظور تعیین دمای باز سرشتی پرایمر های اشاره شده بدین صورت عمل گردید:

$$T_m: 4(G+C) + 2(A+T)$$

سپس برای به دست آوردن دمای باز سرشتی، لوله های PCR در گرادینت دمایی که از دمای مینیم تا ماکزیمم است قرار می گیرد. در مرحله آخر با توجه به باند های مشاهده شده حاصل بارگیری روی ژن و رنگ آمیزی، بهترین باند مشاهده شده که بیانگر بهترین دمای باز سرشتی برای پرایمر مورد نظر است، انتخاب شد.

۳-۱۴-۹- آنالیز اولیه داده ها

پس از انجام آزمایش نوبت به آنالیز اولیه داده ها می رسد، که با بررسی منحنی تکثیر امکان پذیر است و با تنظیم خط آستانه و تعیین میزان سیکل آستانه (Ct) فراهم می شود. بیشتر نرم افزارها تعداد سیکل ها را روی محور X و لگاریتم میزان فلورسانس ΔRn را روی محور Y نشان می دهند.

۳-۱۴-۹-۱- آنالیز کمی داده ها

آنالیز داده ها به دو صورت امکان پذیر است:

۱- روش سنجش مطلق

۲- روش سنجش نسبی

در این تحقیق از روش سنجش نسبی استفاده شد.

در این روش چند ژن به صورت تناسبی با هم مقایسه می شوند در این روش تعداد دقیق ژن ها تعیین نمی شود بلکه با ژن مرجع (اندوژن یا House Keeping) مقایسه می شود و شامل چندین روش است :

۱- ارزیابی نسبی با استفاده از دو منحنی استاندارد

۲- روش $\Delta\Delta CT$

۳- روش پافل

۴- روش بین وسنت

در این تحقیق از روش $\Delta\Delta CT$ استفاده شد و برای همین به توضیح این روش می پردازیم.

۳-۱۴-۹-۲- روش مقایسه‌ای $\Delta\Delta Ct$

این روش ظرفیت‌پذیری نمونه‌ها را بدون نیاز به منحنی استاندارد در زمان مشاهده سطوح بیان نسبت به کنترل مرجع افزایش می‌دهد. برای موثر بودن این روش باید دامنه دینامیکی ژن‌های رفرنس و هدف تعیین شود. سپس واکنش Real-Time PCR برای دو ژن هدف و مرجع در نمونه‌ها انجام می‌شود. در انتها به ترتیب زیر آنالیز کمی داده‌ها با روش مقایسه‌ای $\Delta\Delta Ct$ انجام می‌شود:

پس از پایان واکنش، میانگین Ct ژن‌های مرجع و هدف در هر نمونه محاسبه می‌شود.

در گام اول تفاوت بین سیکل آستانه ی ژن‌های هدف و مرجع در نمونه کنترل به صورت ΔCt محاسبه می‌شود:

$$\Delta Ct (\text{نمونه کنترل}) = Ct (\text{ژن هدف}) - Ct (\text{ژن مرجع})$$

در گام دوم تفاوت بین سیکل آستانه ژن هدف و مرجع در نمونه مورد مطالعه به صورت ΔCt محاسبه می‌شود:

$$\Delta Ct (\text{نمونه مورد آزمایش}) = Ct (\text{ژن هدف}) - Ct (\text{ژن مرجع})$$

در گام سوم تفاوت سیکل آستانه ژن هدف و ژن مرجع در نمونه کنترل و نمونه مورد آزمایش به صورت $\Delta\Delta Ct$ محاسبه می‌شود:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{نمونه مورد آزمایش}) - \Delta Ct (\text{نمونه نرمال})$$

$$\Delta Ct \text{ و } \Delta\Delta Ct \text{ کمتر} = \text{بیان بیشتر}$$

در واکنش ریل تایم هنگامی که میزان بیان یک ژن را در چند گروه مقایسه می‌نماییم بهترین راه بیان میزان تغییرات آن ژن در یک نمونه نسبت به نمونه دیگر بصورت fold change همان چند برابر می‌باشد. لذا پس از محاسبه $\Delta\Delta Ct$ ، برای محاسبه fold change در ریل تایم یعنی نسبت بیان ژن هدف به ژن مرجع در نمونه مورد نظر نسبت به نمونه کنترل نرمال، از فرمول زیر استفاده می‌شود:

$$(\text{Ratio}) = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{-(\Delta Ct_{\text{sample}} - \Delta Ct_{\text{control}})} = \frac{2^{-(\Delta Ct)_{\text{sample}}}}{2^{-(\Delta Ct)_{\text{control}}}}$$

$$\text{fold change بیشتر} = \text{بیان بیشتر}$$

نکته: همیشه fold change برای گروه کنترل برابر ۱ خواهد شد.

همه ی آزمایش ها حداقل با سه بار تکرار مجزای بیولوژیک (three separate biological replication) انجام پذیرفتند. آنالیز داده ها با نرم افزار SPSS ویراست ۲۳ (SPSS Inc., USA) انجام شد. اختلافات معنی دار با استفاده از student's *t-test* و روش آنالیز واریانس یک طرفه One-way ANOVA متعاقب آزمون مقایسه ای Tukey post hoc (آزمون اختلاف حقیقی که به طور مخفف HSD نامیده می شود) تعیین شد و تمامی نتایج به صورت انحراف معیار \pm میانگین (Mean \pm SE) گزارش گردیدند. P-value یا ارزش احتمالی به میزان کمتر از ۰/۰۵ درصد به عنوان داده های معنی دار در نظر گرفته شد. برای رسم نمودار ها نیز از نرم افزار Excel و Sigma Plot^{۱۲} استفاده گردید.

۳-۱۵- بررسی پروفایل بیان miRNA های هدف

پس از استخراج RNA ی تام (بعنوان الگو) از نمونه های سلولی گروه های کنترل و القای نوروژی توسط ترايزول ، غلظت آن بوسیله ی اسپکتروفتومتر نانودراپ سنجیده شد. واکنش سنتز cDNA ، طبق پروتکل ارائه شده در کیت سنتز موسوم به BON-miR miRNA 1st-Strand cDNA Synthesis Kit (Cat# BON۲۰۹۰۰۱) انجام شد .

۳-۱۵-۱- واکنش پلی آدنیلایسیون^۱

طول کوتاه miRNA ها ، شناسائی و تکثیر آنها با متدهای معمول QRT-PCR دشوار ساخته است لذا برای غلبه بر مشکل مذکور ابتدا می بایست miRNA ها طی واکنش پلی آدنیلایسیون (یعنی اضافه شدن ردیف poly A یا پلی آدنین به انتهای ۳' مولکول RNA) طویل تر شوند تا قابلیت انجام رونویسی معکوس را در روند سنتز cDNA داشته باشند؛ از اینرو مواد مورد نیاز برای این واکنش به شرح زیر با یکدیگر مخلوط شدند:

^۱ - Poly Adenylation

Component	Volume
Total RNA	۵ µg
rATP (۱۰mM)	۱ µl
۱۰×poly A polymerase buffer	۲ µl
poly A polymerase	۰/۲ µl
RNase Free Water	رساندن به حجم ۲۰µl

جدول ۳-۱۴- مقادیر و مواد مورد استفاده برای واکنش پلی آدنیلایسیون

تمامی مواد فوق بواسطه پی پتاژ آرام با یکدیگر مخلوط شده و در نهایت اسپین شدند. مواد فوق در دمای ۳۷°C بمدت ۳۰ دقیقه انکوبه شدند و سپس بمدت ۲۰ دقیقه در دمای ۶۵°C غیرفعال شدند. بهتر است برای دستیابی به نتایج بهتر بر روی RNA ی تازه استخراج شده کار کرد در غیر اینصورت، RNA ی استخراج شده را می توان تا زمان واکنش پلی آدنیلایسیون در یخچال ۸۰°C- نگهداری نمود.

۳-۱۵-۲- واکنش سنتز cDNA

واکنش سنتز cDNA بلافاصله پس از واکنش پلی آدنیلایسیون با استفاده از ترکیبات زیر برای هر نمونه RNA ی پلی آدنیله شده، انجام شد:

- ۱- مقدار ۱۰ میکرولیتر از RNA ی پلی آدنیله با ۱ میکرولیتر از پرایمر (۱۰µM) BON-RT adaptor در هر میکروتیوب ریخته و حجم هر میکروتیوب با آب RNase-DNase free به ۱۳ میکرولیتر رسانده شد.
- ۲- درب میکروتیوب ها را بسته و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۵ درجه سانتیگراد در ترموسایکلر قرار دادیم.
- ۳- سپس میکروتیوب ها سریعاً بر روی یخ گذاشته شده و مواد زیر به آن افزوده شد (جدول ۳-۱۵):

Component	Volume
RT enzyme	۰,۷ µl
dNTP mix (۱۰۰mM)	۲ µl
۵× RT buffer	۴ µl
RNase- Free Water	۰,۳ µl

جدول ۳-۱۵- مقادیر و مواد لازم برای تهیه مخلوط کلی واکنش سنتز

ترکیبات مذکور طبق برنامه دمائی زیر در دستگاه ترموسایکلر گذاشته شد (جدول ۳-۱۶):

Temperature ^{oC}	Duration	Cycles
۵۵	۵ min	۱
۲۵	۱۰ min	۱
۴۲	۶۰ min	۱
۷۰	۱۰ min	۱

جدول ۳-۱۶- پروتوکل دمائی ترمال سایکلر جهت سنتز cDNA

۳-۱۵-۳ واکنش Real-time PCR برای بررسی بیان miRNA ها

cDNA های سنتز شده در مرحله قبل، با استفاده از ترکیبات و طبق برنامه ذیل تحت واکنش QRT-PCR قرار گرفتند. کلیه مراحل آماده سازی تا قرار دادن درون دستگاه تا حد امکان دور از نور انجام گرفت. مراحل انجام واکنش به شرح زیر است (جدول ۳-۱۷):

Component	Volume
cDNA	۱ µl
miRNA-specific Forward primer	۰/۵ µl
Universal Reverse primer	۰/۵ µl
۲×miRNA QPCR master mix	۶/۵ µl
Nuclease-free, PCR-grade H ₂ O	رساندن تا حجم ۱۳µl

جدول ۳-۱۷- مقادیر و مواد مورد استفاده برای واکنش QPCR

miRNA	Primer sequences
<i>miR-124-3p-F</i>	UAA GGC ACG CGG UGA AUG CC
<i>miR-9-3p-F</i>	AUA AAG CUA GAU AAC CGA AAG U
<i>let-7b-3p-F</i>	UGA GGU AGU AGG UUG UGU GGU U
Universal Reverse	GAG CAG GGT CCG AGG T

جدول ۳-۱۸- توالی پرایمر miRNA های مورد نظر

ترکیبات مذکور پس از مخلوط شدن با یکدیگر ، طبق برنامه زیر در دستگاه قرار داده شدند (جدول ۳-۱۹) :

Temperature ^{oC}	Duration	Cycles
۹۵	۲ min=۱۲۰sec	۱
۹۵	۵ sec	۴۰
۶۰	۳۰ sec	۴۰

جدول ۳-۱۹- چرخه دمائی واکنش QPCR برای miRNA ها

نکات مهمی که در کیت اندازه گیری کمی miRNA ها وجود داشت :

-پرایمرهای BON-miR kit

پرایمر معکوس universal به دنباله ای که در حین سنتز cDNA بوسیله پرایمر BON-miR RT به miRNA ها اضافه شده است ، متصل می گردد. اختصاصیت واکنش QPCR توسط پرایمر Forward تعیین می شود.

- کنترل داخلی یا مثبت

در انجام یک واکنش استفاده از کنترل داخلی بمنظور یکسان سازی تغییرات در مقدار cDNA در نمونه های مختلف ضروری است . در کیت حاضر از پرایمرهای SNORD بعنوان کنترل داخلی استفاده می شود.

۳-۱۶- تکنیک Transfection

در مطالعات عملکرد و تنظیم ژن یا پروتئین ، دستکاری سطح بیان درون سلولی یک روش اساسی است لذا انتقال اسیدهای نوکلئیک یا انتقال ژن به درون سلول های یوکاریوتی از تکنیک های اصلی بیولوژی مولکولی بوده و در عین حال یک فرآیند بسیار مهم و ضروری قابل اجرا در محیط های *in vitro* برای اهداف پژوهشی متعدد از جمله ژن درمانی ، واکسیناسیون و توسعه داروئی می باشد. در واقع ترانسفکشن سلول ها با اسیدهای نوکلئیک رویکردی برای انجام آزمایش های Gain-and-Loss of Function در راستای تعیین عملکرد یک ژن می باشد.

۳-۱۶-۱- روش های انجام تکنیک Transfection

در طی ۴۰ سال گذشته روش های متعددی برای انتقال اسیدهای نوکلئیک به درون سلول ها موسوم به ترانسفکشن از طریق غشاها به کار می رود زیرا غشاهای سلولی بطور خود بخودی ، نوکلئیک اسیدهای آگروژن را جذب نمی کنند زیرا ماهیت قطبی دو لایه ی فسفولیپیدی غشاها بعنوان سدّی طبیعی عمل می کند که از ورود اکثر مولکول های قطبی و محلول در آب از جمله اسیدهای نوکلئیک ممانعت بعمل می آورد. روش های ترانسفکشن شامل دو دسته اند :

۳-۱۶-۱-۱- روش های انتقال ویروسی

شامل دو دسته ی مختلف اند که عبارتند از :

- ویروس های نوترکیب^۱

- ذرات شبه- ویروسی^۲

۳-۱۶-۱-۲- روش های انتقال غیر- ویروسی

شامل سه دسته ی مختلف اند که عبارتند از :

- متدهای مکانیکی : شامل ریزتزریق^۳ ، بمباران ذره^۴ و نانولوله های کربن تک-لایه ای^۵

- متدهای فیزیکی : شامل تکنیک الکتروپوریشن^۶ و انتقال DNA با واسطه -پرتوی-لیزری^۷

- متدهای شیمیائی : شامل فرمولاسیون لیپید ، پلیمرها و دندریمرهای PAMAM^۸

- فرمولاسیون های لیپیدی: یکی از متدهای شیمیائی انجام تکنیک Transfection

در این روش ها سلول ها با محلولی انکوبه می شوند که باعث ورود قطعه آگروژن مورد نظر به درون سلول می شود. فرمولاسیون های لیپیدی شامل لیپیدهای کاتیونی ، لیپیدهای آنیونی و سیستم های انتقال اختصاصی براساس-لیپید^۹ موسوم به لیپوزوم ها می باشد.

۱ -Recombinant Viruses

۲ -Virus-Like Particles

۳ -Microinjection

۴ -Particle Bombardment

۵ -Single-Walled Carbon Nanotubes

۶ -Electroporation Techniques

۷ -Laser-Beam-Mediated DNA Delivery

۸ -PAMAM Dendrimers

۹ -Specialized Lipid-Based Delivery Platforms

-لیپیدهای کاتیونی

بمنظور انتقال سازه های DNA ی پلازمید و همچنین DNA های کوتاه دورشته ای مانند siRNA ها و یا miRNA های سنتتیک به درون طیف گسترده ای از رده های سلولی و سلول های اولیه در محیط های *in vitro* مورد استفاده قرار می گیرند. به دلیل ماهیت غیر-ایمونولوژیک و قابلیت تولید مقادیر زیادی از این لیپیدها ، چنین سیستم هائی برای انتقال ژن در محیط های *in vivo* بسیار ایده آل هستند ؛ هرچند راندمان انتقال در اغلب موارد کمتر از روش های انتقال ویروسی است اما خطرات کمتری از لحاظ اثرات جانبی ناخواسته اعم از اینتگرسیون ژنومی DNA ی اکتوپیک دارد.

فرمولاسیون اختصاصی لیپیدهای کاتیونی مانند (Invitrogen,Carlsbad,CA) Lipofectamine بعنوان معرف مؤثر ترانسفکشن و معرف ترانسفکشن (Qiagen,Hilden,Germany) Attractance برای ترانسفکشن DNA ی پلازمید یا (Invitrogen,Carlsbad,CA) Lipofectamine RNAiMax و معرف ترانسفکشن (Qiagen,Hilden,Germany) HiPerFect برای ترانسفکشن siRNA و miRNA بطور تجاری در دسترس است. این معرف ها تقریباً برای تمام آزمایش های *in vitro* قابل استفاده اند (Hahn and Schanlan , ۲۰۱۰).

۳-۱۶-۲- ترانسفکشن miRNA ها

ترانسفکشن میرناها نیز بطور گسترده ای برای بررسی تأثیرات بیولوژیکی miRNA های اختصاصی در عملکرد سلول مورد استفاده قرار می گیرند که در آنها از دونوع میکروآرنا استفاده می شود :

۱) miRNA Mimic : miRNA های سنتتیک شیمیایی هستند که تقلید کننده ی miRNA های طبیعی واقع در سلول پس از ترانسفکشن به سلول هستند. این میکروآرناها، میکروآرناهای اگزوژن بصورت sense هستند که با رویکرد خاموش شدن ژن و کپی کردن عملکردی میکروآرناهای اندوژن (درون زا) بالغ در طول ترانسفکشن طراحی شده اند و شامل قطعات RNA ی دو رشته ای - استاندارد شبه- میکروآرنا هستند. استفاده از میمیک، امکان ارزیابی عملکردی miRNA را فراهم می آورد و در واقع به عنوان یک ابزار اگزوژن سودمند در مطالعات gain of function می باشند.

۲) miRNA Inhibitor : miRNA های تغییر یافته ی تک رشته ای هستند که پس از ترانسفکشن، به طور اختصاصی عملکرد miRNA را مهار می کنند. این میکروآرناهای بالغ اگزوژن بصورت آلیگونوکلوئوتیدهای anti-sense استاندارد-تک رشته ای طراحی شده اند که مکمل جایگاه هدف میکروآرناهای اندوژن هستند و به طور موثری از اتصال miRNA هدف به جایگاه های اتصال طبیعی سلولی جلوگیری می کنند و لذا در واقع به عنوان یک ابزار اگزوژن سودمند در مطالعات loss of function می باشند.

ترانسفکشن Mimic یا Inhibitor یک miRNA روشی است که برای شناسایی اهداف و نقش های miRNA های خاص استفاده می شود. کاهش بیان ژن پس از ترانسفکشن یک miRNA ی میمیک یا افزایش بیان پس از ترانسفکشن یک miRNA های اینهیبیتور نشانگر شرکت و مداخله miRNA ی موردنظر در تنظیم آن ژن هستند. البته ، نقش miRNA ها در مسیرهای مختلف نیز می تواند با بررسی فنوتیپ های اختصاصی متعاقب ترانسفکشن میمیک یا اینهیبیتور miRNA مورد ارزیابی قرار گیرد.

۳-۱۶-۳- روش عملی ترانسفکشن miRNA ی مورد نظر

طبق پروتوکل ارائه شده توسط QIAGEN برای ترانسفکشن سلول های چسبنده^۱ در پلیت های کشت ۲۴-خانه ای ، رقیق سازی Mimin و Inhibitor میکروآرنای موردنظر بمنظور ترانسفکشن سلول های کشت شده در پلیت ۱۲-خانه ای به شرح ذیل (در شرایط بدون نور و تاریکی) انجام شد :

۳-۱۶-۳-۱- روش رقیق سازی miRNA Mimic برای ترانسفکشن

ابتدا مقدار ۱۲۰۰ میکرولیتر از محیط پایه DMEM فاقد سرم به درون میکروتیوب استریل ۱/۵ میلی لیتری ریخته و سپس مقدار ۱/۸ میکرولیتر از miRNA Mimic را به درون همان میکروتیوب اضافه می کنیم ؛ البته مقدار مجاز برای هر خانه طبق پروتوکل ۰/۳ میکرولیتر است که با احتساب ترانسفکشن سلول های ۶ خانه ، آن را ۶ برابر می کنیم یعنی : $۱/۸ \mu\text{l} = ۰/۳ \times ۶$

۳-۱۶-۳-۲- روش رقیق سازی miRNA Inhibitor برای ترانسفکشن

ابتدا مقدار ۱۲۰۰ میکرولیتر از محیط پایه DMEM فاقد سرم به درون میکروتیوب ۱/۵ میلی لیتری استریلی ریخته و سپس مقدار ۱۸ میکرولیتر از miRNA Inhibitor را به درون همان میکروتیوب اضافه می کنیم ؛ البته مقدار مجاز برای هر خانه طبق پروتوکل ۳ میکرولیتر است که با احتساب ترانسفکشن سلول های ۶ خانه ، آن را ۶ برابر می کنیم یعنی : $۱۸ \mu\text{l} = ۳ \times ۶$

تذکر:

- ۱- تمامی مراحل رقیق سازی میمیک و اینهیبیتور می بایست در شرایط بدون نور و تاریکی انجام گیرد.
- ۲- لیپیدهای کاتیونی ترانسفکت کننده در محیط های *in vitro* در حضور سرم (FBS) بطور سریع غیرفعال می شوند. از آنجائی که طبق مطالعات انجام شده ، بطور مشابهی ترانسفکشن با لیپوفکتامین و هاپیرفکت نیز توسط سرم غیرفعال می شود لذا بهنگام رقیق سازی Mimic و Inhibitor می بایست از محیط پایه DMEM بدون سرم استفاده گردد.

۳-۱۶-۳-۳- پروتوکول اجرایی ترانسفکشن برای HFSC ها

مراحل ترانسفکشن miRNA های موردنظر به درون HFSC های تحت کشت طبق پروتکل ارائه شده شرکت QIAGEN به ترتیب عبارتند از :

- ۱-افزودن مقدار $24 \mu\text{l}$ از HiPerFect به درون میکروتیوب های حاوی Mimic و Inhibitor رقیق شده
- ۲- ضربه زدن با دست به بدنه میکروتیوب ها و سپس سر و ته کردن میکروتیوب ها به آرامی جهت اسپین ملایم مواد درون میکروتیوب ها
- ۳-انکوباسیون میکروتیوب ها در دمای اتاق در زیر هود به مدت ۱۰ دقیقه
- ۴-آماده سازی سلول های کشت شده در پلیت ۱۲-خانه ای در طول انکوباسیون به شرح زیر:
 - ۴-۱- کشیدن محیط روئی سلول های کشت شده موجود در ول های پلیت
 - ۴-۲- سه مرتبه شستشوی سلول ها با بافر PBS به ترتیب با مقادیر $500 \mu\text{l}$ ، $600 \mu\text{l}$ و $700 \mu\text{l}$ ($\lambda = \mu\text{l}$)
 - ۵-اضافه شدن بسیار آرام و قطره قطره ای مقدار $200 \mu\text{l}$ از محتویات میکروتیوب های Mimic و Inhibitor هر یک به درون ۶ ول از پلیت ۱۲-خانه ای پس از اتمام زمان انکوباسیون
 - ۶-انکوباسیون پلیت بصورت فویل پیچ درون انکوباتور به مدت ۶ ساعت
 - ۷-کشیدن محلول روئی هر یک از ول های ترانسفکت شده پلیت پس از اتمام زمان شش ساعته انکوباسیون
 - ۸-افزودن محیط های کشت به درون ول ها طبق گروه بندی انجام شده و تیمار آنها به مدت ۷۲ ساعت

۳-۱۶-۳-۴- گروه بندی انجام شده پس از ترانسفکشن میکروآرنا به درون HFSC ها

پس از گذشت مدت زمان ۶ ساعته ی ترانسفکشن ، بمنظور انجام مرحله ای دیگر از مطالعات ، سلول های موردنظر به شرح ذیل گروه بندی شدند و بمدت ۷۲ ساعت (۳ روز) طبق گروه بندی خود تحت تیمار قرار گرفتند .

- ۱. ontrol (non-transfection) + DMEM
- ۲. Neural Differentiation (non-transfection)
- ۳. Mimic + DMEM
- ۴. Mimic + Neural Differentiation
- ۵. Inhibitor + DMEM

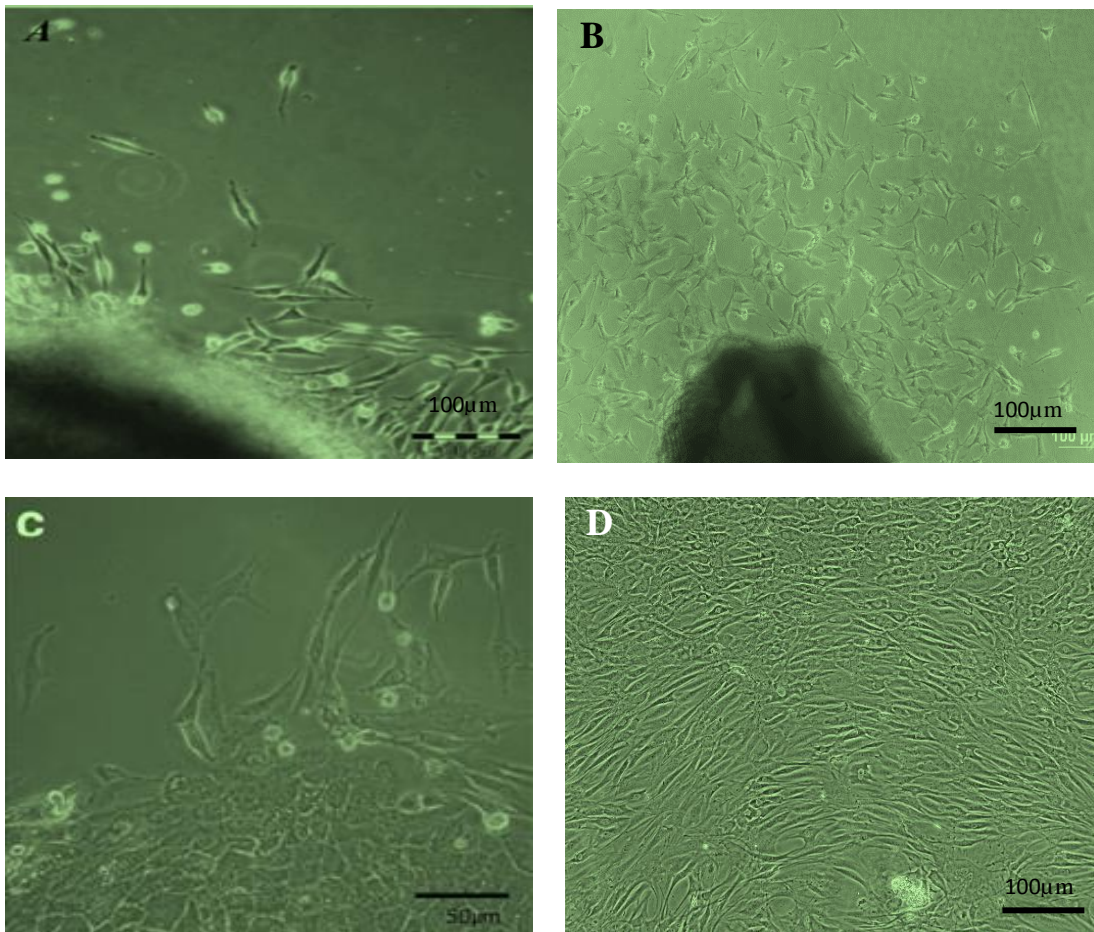
پس از گذشت مدت زمان ۷۲ ساعت از تیمار سلول ها طبق گروه بندی مذکور ، سلول ها پس از جمع آوری توسط تریزول و فیکساسیون توسط پارافرمالدئید جهت بررسی بیان ژن ها و پروتئین های هدف موردنظر به ترتیب توسط Real-time PCR و ایمونوسیتوشیمی آماده شدند .

بعلاوه پروفایل بیان *miR-124-3p* نیز در سلول های هر ۵ گروه موردنظر پس از ترانسفکشن توسط Real-time PCR بمنظور اطمینان از نقش این میکروآرنا در روند القای تمایز نورونی سلول های بنیادی فولیکول موی موش ، مورد ارزیابی و بررسی قرار گرفت .

فصل چهارم: نتایج

۴-۱- نتایج حاصل از کشت سلولی و بافت

به منظور دسترسی به سلول های بنیادی ناحیه ی بالچ فولیکول موی موش، از فولیکول موی سیبیل^۱ موش سوری استفاده شد. پس از گذشت ۵ روز از کاشت ناحیه بالچ فولیکول های موی آنژن در فلاسک های T25 پوشیده شده با کلاژن در حضور محیط کشت و FBS، سلول های موجود در این ناحیه که سلول های بنیادی فولیکول مو نام دارند به صورت سلول های چسبنده و دوکی شکل شروع به مهاجرت از بافت نمودند؛ ابتدا رشد سلولی کند بود ولی به تدریج مهاجرت سلول ها از اطراف تجمعات سلولی گنبدی شروع شد و بعد از ۱۲-۱۴ روز کشت و تکثیر، سلول ها تشکیل کلنی داده و به تلاقی^۲ ۱۰۰٪ رسیدند (شکل ۴-۱).

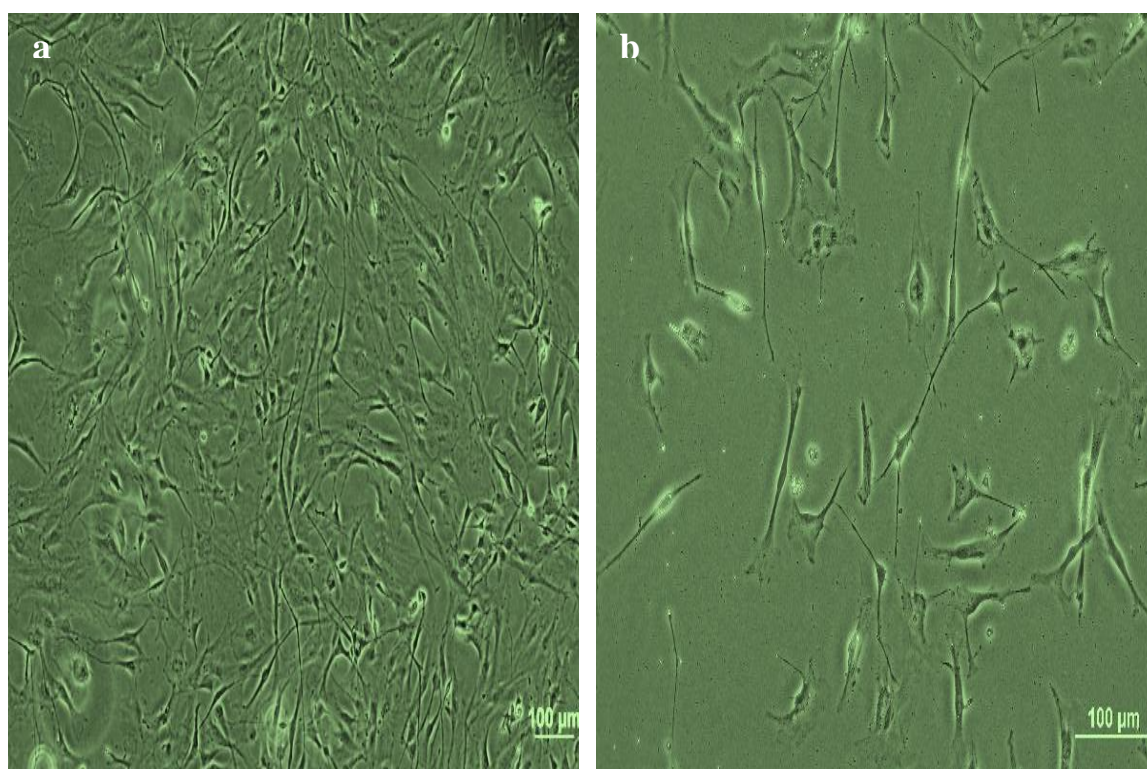


شکل ۴-۱- فتومیکروگراف از کشت اولیه سلول های بنیادی ناحیه بالچ فولیکول موی سیبیل موش در بزرگنمایی ۱۰۰X: (A) سلول ها ۴-۵ روز پس از کشت در حال خروج از ناحیه بالچ و چسبیدن به کف فلاسک کشت سلول، (B) افزایش رشد سلول های بنیادی ناحیه بالچ (C) تکثیر سلول های بنیادی منجر به تشکیل کلنی هائی در اطراف ناحیه بالچ می شود (D) سلول ها با مهاجرت از کلنی ها و ادامه روند تکثیر خود، به تلاقی ۱۰۰ درصدی در ۱۴ روز پس از کشت می رسند. (برای تصاویر A، B و D: Scale Bar = ۱۰۰ µm و برای تصویر C: Scale Bar = ۵۰ µm)

۱- vibrissae
۲- Confluence

۴-۲- نتایج تمایز HFSC ها به نورون ها

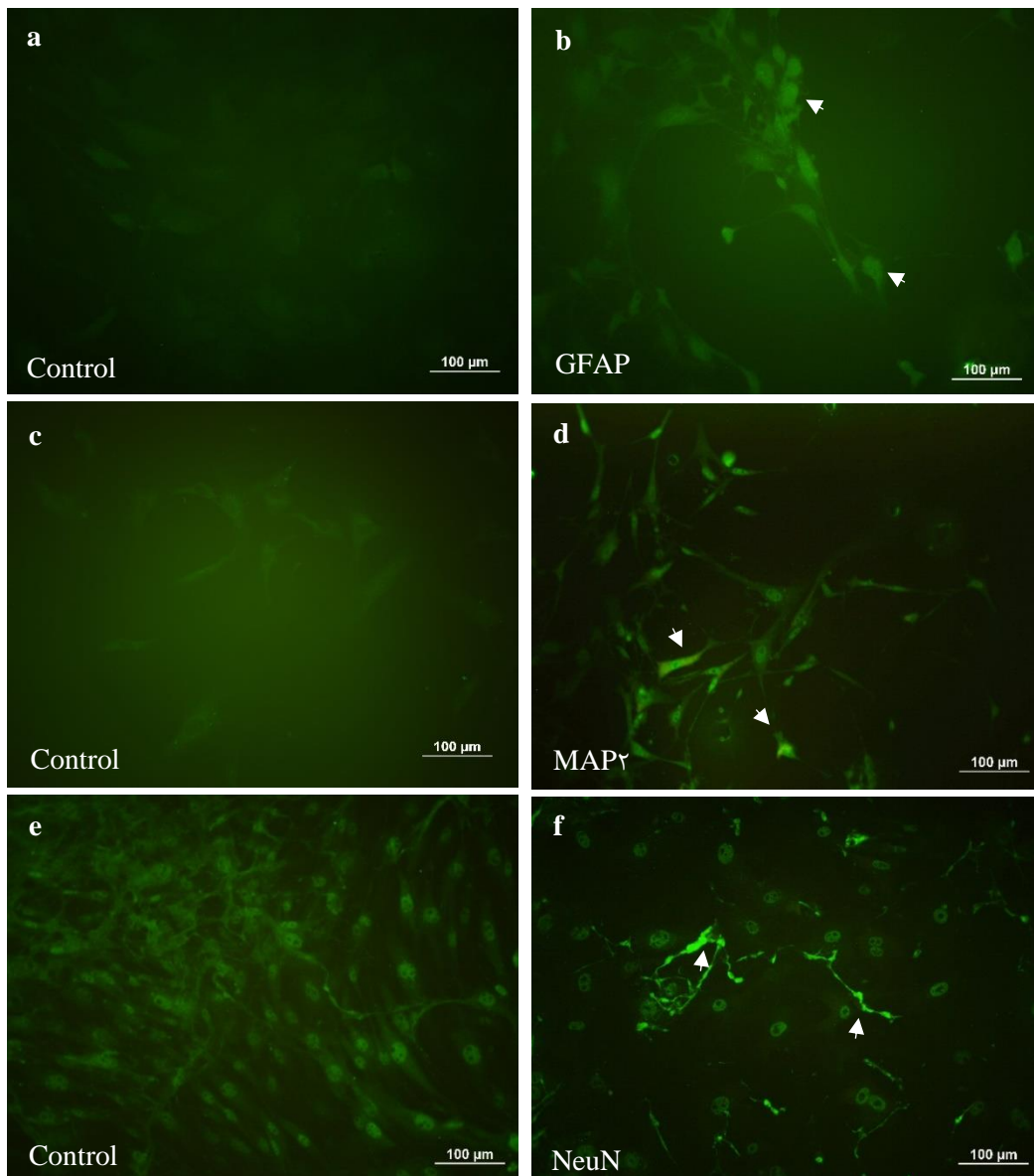
در این پژوهش، سلول های بنیادی فولیکول موی مشتق از سبیل موش در پاساژ دوم (P2) طی دو مرحله مورد بررسی قرار گرفتند. در ابتدا سلول ها با استفاده از محیط مغذی حاوی فاکتور رشد EGF به همراه اسید آمینه های غیر ضروری ، انسولین ، هیدروکورتیزون و کلراتوکسین ب مدت ۱۴ روز پیش تیمار شدند. سپس بمنظور تمایز عصبی ، سلول ها تحت کشت با محیط القای نورونی متشکل از DMEM و FBS همراه فاکتورهای رشد b-FGF و BDNF و ATRA به مدت ۱۰ روز دیگر تیمار شدند ؛ پس از تیمار با این فاکتورها، سلول ها دارای زوائد طولی مشابه سلول های نورونی شده و مورفولوژی شبه-نورونی را نشان دادند (شکل ۴-۲). HFSC ها ، قادر به تولید جمعیت سرشاری از دودمان های گلیال و نورونی متعاقب انکوباسیون با فاکتورهای رشد اگزوزن هستند (El Seady et al. ۲۰۰۸b) همچنین EGF و b-FGF مولکول های تغذیه کننده ای هستند که نقش بسیار مهمی را در حفظ و تکثیر HFSC ها ایفا می کنند (Yang et al. ۱۹۹۳ ; Mignone et al. ۲۰۰۷).



شکل ۴-۲- فتومیکروگراف از سلول های بنیادی فولیکول موی سبیل موش : (a) در گروه کنترل تحت کشت با محیط مغذی ؛ بیشتر سلول ها ، وضعیت بنیادی و تمایز نیافتگی خود را حفظ کرده بودند و تغییری نشان ندادند ؛ (b) گروه آزمایشی هدف در حضور محیط القای نورونی: سلول های بیشتری با مورفولوژی نورونی پس از القای نورونی مشاهده شدند. (بزرگنمایی ۱۰۰x و Scale Bar = ۱۰۰µm)

۳-۴- اثبات تمایز HFSC ها به سمت دودمان عصبی (نورونی و گلیالی)

۳-۴-۱- بررسی بیان مارکرهای عصبی پس از القای تمایز نورونی با ایمونوسیتوشیمی
نتایج نشان داد که HFSC ها بعد از ۱۰ روز تیمار با محیط القای تمایز نورونی ، مارکر سلول های عصبی MAP۲ و NeuN و نیز مارکر سلول های گلیالی GFAP را بیان کردند (شکل ۳-۴).

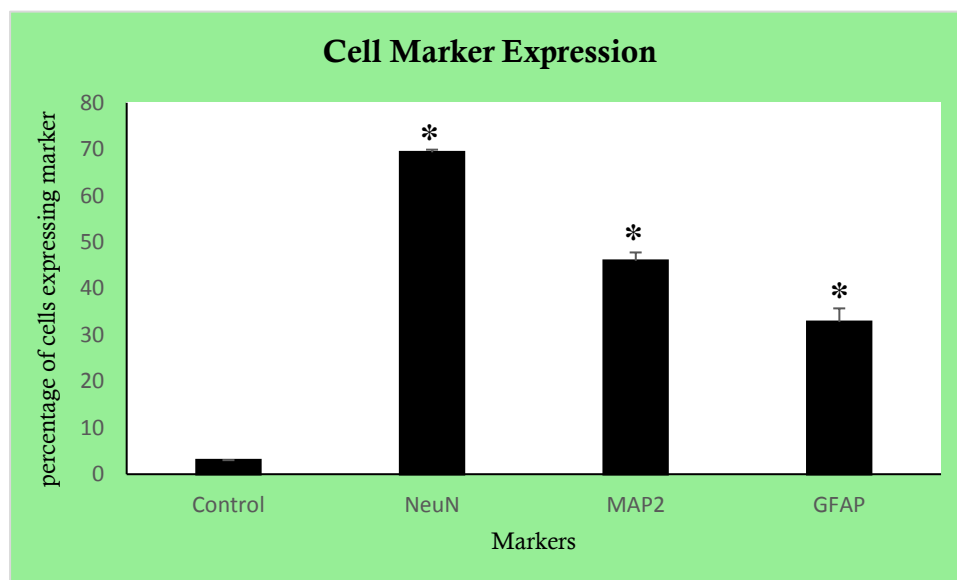


شکل ۳-۴- نتایج مربوط به بررسی های ایمونوسیتوشیمی برای مارکر سلول های نورونی (MAP۲ و NeuN) و مارکر سلول های گلیالی (GFAP). متعاقب بروز مورفولوژی شبه-نورونی در HFSC ها در روز ۱۰ ام پس از القای تمایز نورونی بیان MAP۲ ، NeuN ، GFAP بطور قابل ملاحظه ای افزایش یافت (b,d,f) و نتایج نمونه های کنترل یعنی HFSC های تحت کشت بدون محیط القای تمایزی (a,c,e) . (بزرگنمایی 100x و Scale Bar = 100μm)

نتایج ما نشان داد که بعد از ۱۰ روز تیمار با محیط تمایزی، مارکر GFAP در گروه القای نوروئی بیان بالاتری در مقایسه با سلول های گروه کنترل داشته است. البته بطور جالب توجهی، همانطور که در شکل ۳-۴ (d,f) نشان داده شده است، آنالیز ایمنوسیتوشیمی، حاکی از بیان قابل توجه MAP2 و NeuN نیز در سلول های تمایز یافته بود. بمنظور کمی سازی نتایج ایمنوسیتوشیمی بعد از سپری شدن ده روز القای تمایز نوروئی، سلول های عصبی را توسط نرم افزار *ImageJ* شمارش کردیم. ترتیب سلول ها بر اساس درصد بیان مارکرهای عصبی بصورت GFAP⁺، MAP2⁺ و نهایتاً NeuN⁺ در مقایسه با گروه های کنترل بودند (جدول و نمودار ۴-۱).

Marker	% Marker Expression in Differentiated HFSCs	% Control group
GFAP	۳۲,۸۰۲,۳	۳,۰۳۰,۵۷٪
MAP2	۴۵,۹۰۲,۹٪	
NeuN	۶۹,۳۰۱,۸٪	

جدول ۴-۱- درصد بیان مارکرهای عصبی در سلول های تمایز یافته فولیکول موی موش بعد از ده روز القای تمایز نوروئی
 اعداد داخل جدول به صورت $\text{percentage} \pm \text{STD}$ گزارش شده است.



نمودار ۴-۱- درصد سلول های بیان کننده مارکرهای عصبی در سلول های تمایز یافته فولیکول موی موش بعد از ده روز القای تمایز نوروئی: در مقایسه با سلول های گروه کنترل (داده ها به صورت $\text{mean} \pm \text{stdv}$ بیان شده اند $p < 0,05$)*

۴-۳-۲- بررسی بیان ژن های هدف پس از القای تمایز نورونی به روش Real-time PCR

سلول ها در دو گروه مجزا به صورت زیر برای بیان ژن های هدف در روند تمایز نورونی سلول های بنیادی مشتق از ناحیه بالچ فولیکول موی موش سوری ، به روش Real time PCR بعد از استخراج RNA و سنتز cDNA متعاقب آن مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفتند :

(i) گروه کنترل (Control group) : شامل HFSC های تحت کشت با ۱۰٪ FBS + DMEM

. در این گروه سلول ها تحت تاثیر هیچ ماده تمایزی قرار نگرفتند و به عنوان گروه کنترل در مراحل مختلف برای آنالیز داده ها مورد استفاده قرار گرفت.

(ii) گروه آزمایشی القای تمایز نورونی (Experimental group) : شامل HFSC های تیمار شده

با محیط تمایزی حاوی ۱۰٪ FBS + DMEM + ۵٪ Retinoic Acid + ۱ μM + ۱ μg/ml EGF + ۱۰ ng/ml bFGF + ۱۰ ng/ml BDNF

در این گروه ها بیان ژن های هدف یعنی *Map2* و *Rbfox3* (هر دو بعنوان مارکرهای نورونی)، *Sox9* (نوعی فاکتور رونویسی بعنوان یکی از اهداف میکروآرنا ی عصبی *miR-124* و در عین حال بعنوان یکی از افکتورهای پائین دستی مسیر سیگنالینگ Notch مستلزم حفظ وضعیت پُر توانی NSC هاست) ، *Ptbp1* (یکی دیگر از اهداف *miR-124* با سرکوب تمایز عصبی در سلول های غیرنورونی بعنوان کنترل کننده ی بیان ژن های نورونی است)، *CCND1* (بعنوان یکی از اهداف میکروآرنا ی دیگر عصبی یعنی *let-7b* با نقش تنظیم کنندگی چرخه سلولی ، حفظ وضعیت بنیادی در سلول های بنیادی و در عین حال سرکوب تمایز نورونی) ، *NR2E1* (هدف مشترک دو میکروآرنا ی *miR-9* و *let-7b* که مستلزم حفظ وضعیت تمایز نیافتگی سلول های بنیادی و مهار کننده نورونزیز می باشد) ، *RCOR2* (یکی از کوفاکتورهای کمپلکس ضدعصبی REST بعنوان یکی از اهداف *miR-9* که باعث مهار بیان ژن های نورونی در سلول های بنیادی می شد) و *DLK1* (بعنوان یکی از لیگاندهای مسیر سیگنالینگ Notch با نقش تنظیم کنندگی در روند نورونزیز و تمایز عصبی) بعد از ۱۰ روز القای تمایز نورونی^۱ به روش Real time PCR در حضور ژن کنترل داخلی یا ژن مرجع *GAPDH* مورد بررسی قرار گرفتند.

آنالیز داده های Real-time PCR به روش مقایسه ای $\Delta\Delta CT$ در رابطه با بیان ژن های هدف تمایزی بصورت مارکرهای نورونی در HFSC های گروه آزمایشی تیمار شده با محیط تمایز نورونی نشان داد که Fold change برای mRNA ژن *Map2* و *Rbfox3* و *DLK1* به ترتیب افزایش ۷/۴ ، ۵/۵ و ۳,۲۷ برابری در HFSC های تمایز یافته در مقایسه با سلول های تحت کشت در گروه کنترل داشته است ($P < 0,05$).

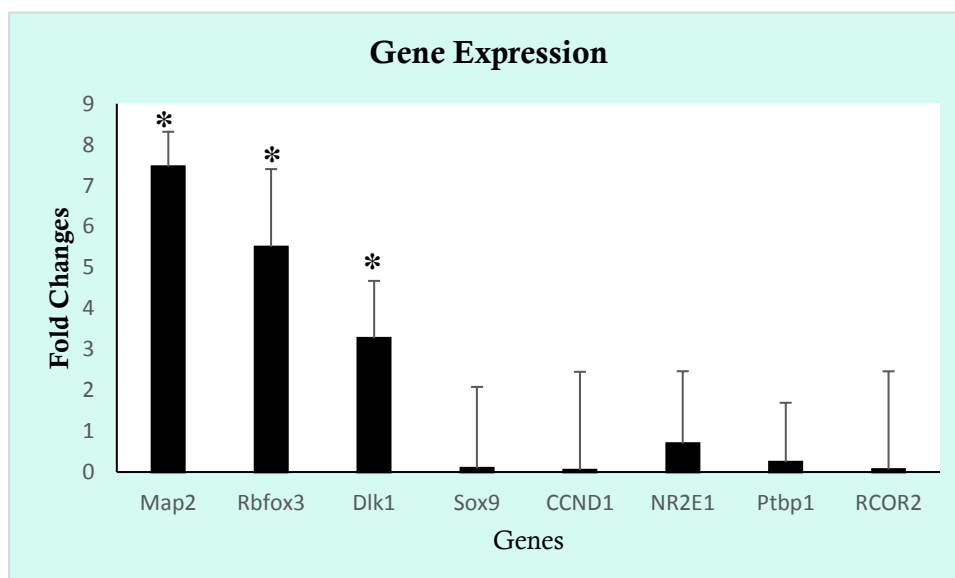
^۱-Neurogenic transdifferentiation

این در حالی است که افزایش بیان معناداری برای mRNA ژن های غیرنورونی *Sox9*، *Ptbp1*، *CCND1*، *NR2E1* و *RCOR2* در HFSC های تیمار شده با محیط تمایز نورونی دیده نشد (جدول ۴-۱)

Name of Gene	Fold Changes or $2^{-\Delta\Delta CT}$
<i>Map2</i>	۷,۴۶۴۲۶*
<i>Rbfox3</i>	۵,۵۰۲۷*
<i>DLK1</i>	۳,۲۷*
<i>Sox9</i>	۰,۰۹۰۲۵
<i>CCND1</i>	۰,۰۴۸۸۷
<i>NR2E1</i>	۰,۶۹۲۵۵
<i>Ptbp1</i>	۰,۲۴۳۱۶
<i>RCOR2</i>	۰,۰۶۱۲۱

جدول ۴-۲ - foldchange ژن های هدف در HFSC های تیمار شده با محیط تمایزی نسبت به گروه کنترل

در مجموع می توان گفت ژن های غیرعصبی *Sox9*، *Ptbp1*، *CCND1*، *NR2E1*، *RCOR2* در HFSC های تمایزیافته کاهش بیان غیرمعناداری نشان دادند ولی در مقابل ژن های تمایز نورونی (*Map2*، *Rbfox3* و *DLK1*) افزایش بیان قابل توجه و معناداری نسبت به گروه کنترل داشتند (نمودار ۴-۲).



نمودار ۴-۲ - سطح بیان ژن های هدف در HFSC ها بعد از القای تمایز نورونی: سطح بیان ژن ها توسط Real-time PCR سنجیده شد. بیان بسیار بالا و معنی دار *Map2*، *Rbfox3* و *DLK1* و در عین حال بیان بسیار اندک و غیرمعنادار مابقی ژن های هدف بعد از القای تمایز نورونی مشاهده شد. $p < 0,005$ * اختلاف معنی دار از گروه کنترل در نظر گرفته شد.

۴-۳-۳- بررسی پروفایل بیان miRNA های هدف پس از القای تمایز نورونی در HFSC های

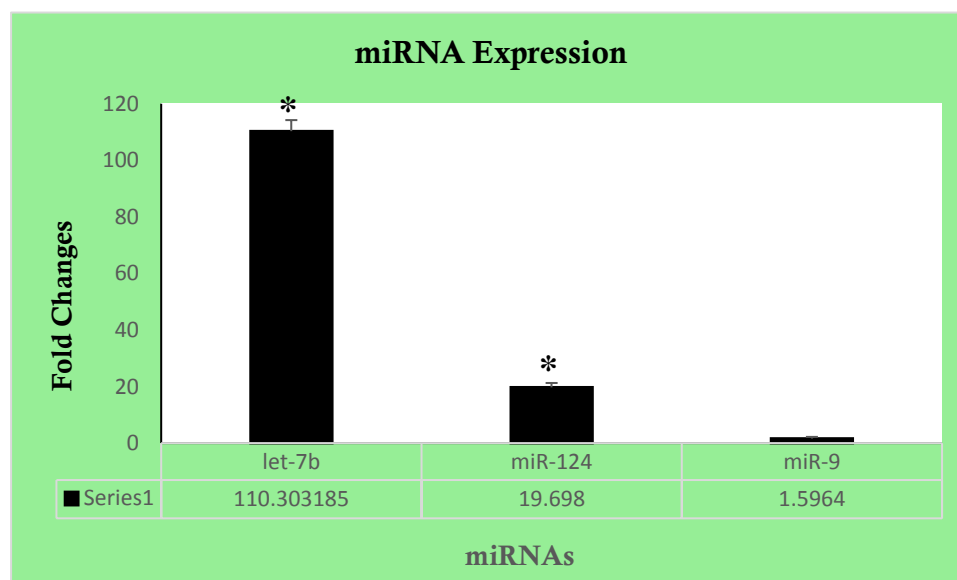
تمایز یافته به روش Real-time PCR

برای تعیین تغییرات miRNA های مربوط به تمایز نورونی در HFSCs، پس از استخراج RNA و سنتز cDNA از نمونه HFSC های تمایز یافته، سطح mRNA ی مربوط به *miR-9-3p*، *miR-124-3p* و *let-7b-5p* را توسط واکنش Real-time PCR با استفاده از پرایمرهای میکروآرناهای مربوطه اندازه گیری کردیم. نمایش پروفایل بیان miRNA های هدف و آنالیز کمی داده های حاصل به کمک Fold Change های مربوطه (جدول ۳-۴)، نشان داد سطوح بیان دو میکروآرنا *miR-124-3p* و *let-7b-5p* بطور قابل ملاحظه ای پس از القای تمایز نورونی در HFSC های تمایز یافته بطور معناداری افزایش یافته بود در حالی که بیان *miR-9-3p* در سلول های تمایز یافته افزایش معناداری نشان نداده بود.

miRNA های با تنظیم مثبت (افزاینده) و تنظیم منفی (کاهنده) مؤثر در روند نوروزنزیس سلول های بنیادی مورد مطالعه، در نمودار ۳-۴ نشان داده شده است.

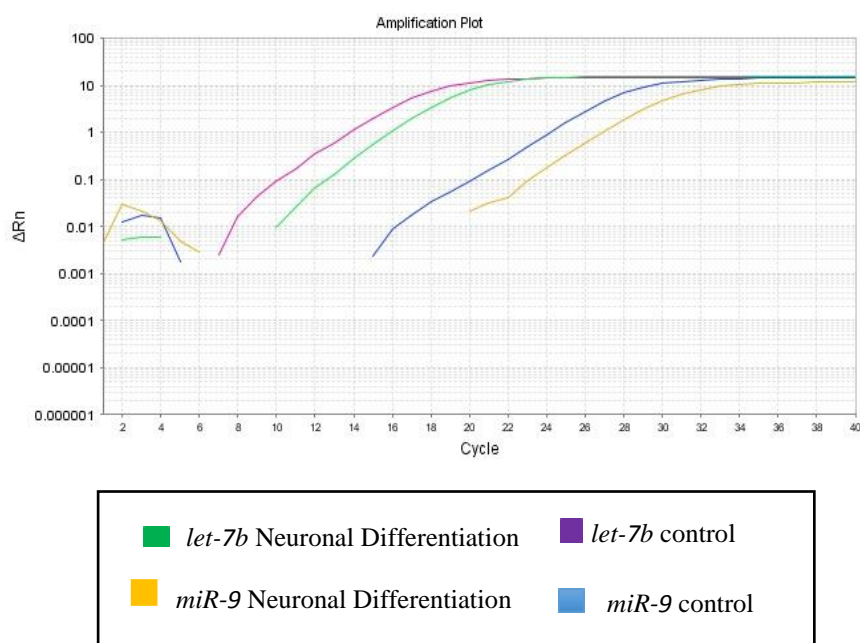
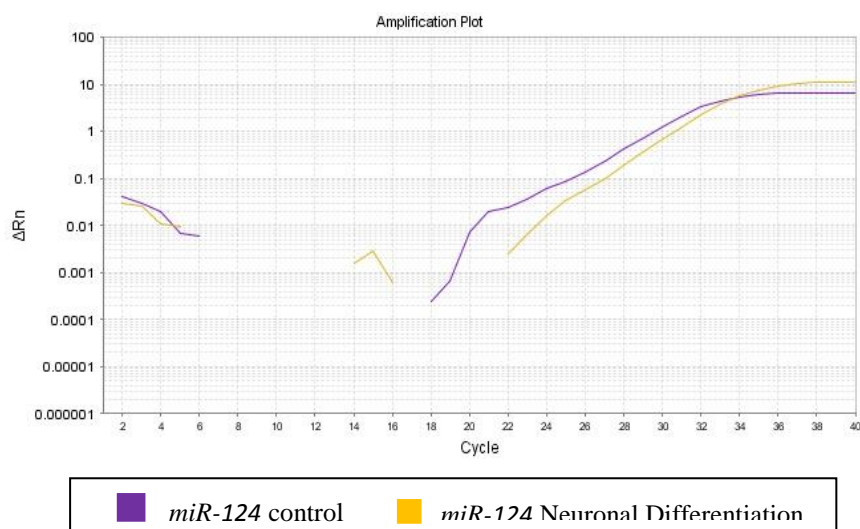
miRNAs	<i>miR-124</i>	<i>miR-9</i>	<i>let-7b</i>
Differentiated HFSCs	۱۹,۶۹۸±۱,۵۶٪	۱,۵۹۶۴±۰,۶٪	۱۱۰,۳۰۳۲±۳,۹٪

جدول ۳-۴ foldchange مربوط به miRNA های هدف در HFSC های تمایز یافته نسبت به گروه کنترل اعداد داخل جدول به صورت Fold change±STD گزارش شده است.



نمودار ۳-۴- سطح بیان miRNA های هدف در HFSC ها بدنبال القای تمایز نورونی: سنجش سطح بیان miRNA ها توسط Real-time PCR حاکی از بیان بسیار بالای *miR-124-3p* و *let-7b-5p* پس از تمایز عصبی بود. $p < 0,05$ * بعنوان اختلاف معنی دار از گروه کنترل

تصاویر منحنی های تکثیر (Amplification plot) محصولات ریل تایم برای سه میکروآرناي مورد مطالعه نیز در نمودار ۴-۴ آورده شده است :



نمودار ۴-۴- منحنی های تکثیر مربوط به بیان miRNA های هدف طی واکنش Real-time PCR در HFSC های دو گروه کنترل و تمایز نورونی (توجه : این نمودارها توسط دستگاه ABI LightCycler ثبت شده است).

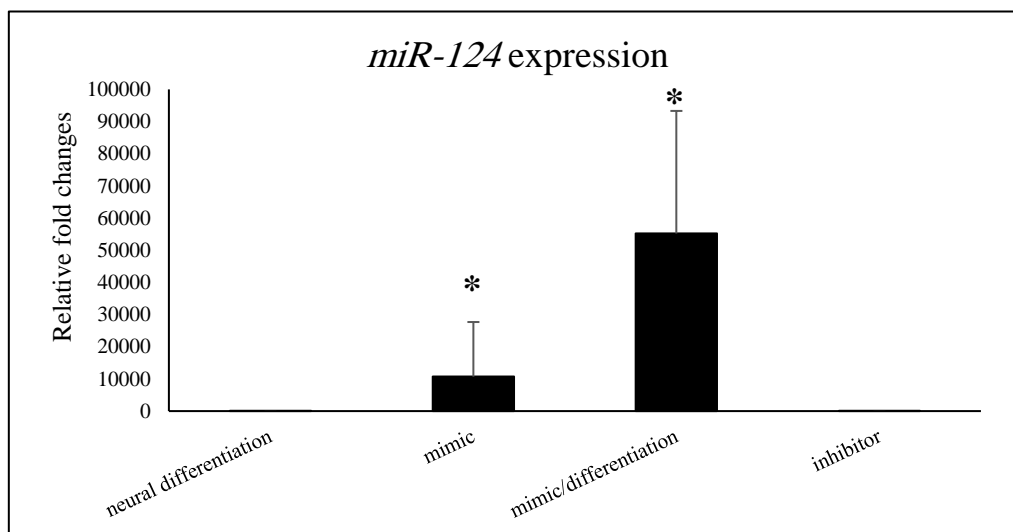
با مقایسه سطوح بیان ژن های هدف *let-7b* و *miR-124* و نیز با توجه به مطالعات متعدد انجام شده در رابطه با نقش *miR-124* در تمایز نورونی سلول های بنیادی و رده های سلولی مختلف، بر آن شدیم تا در ادامه روند مطالعات خود بر روی *miR-124-3p* متمرکز شویم .

۴-۴- نتایج ترانسفکشن $miR-124-3p$ در HFSC ها

برای بررسی بیشتر نقش $miR-124$ بر روند تمایز نورونی HFSC ها ، ابتدا ترانسفکشن سلول های کشت شده در پلیت ۱۲- خانه ای طبق پروتوکل ارائه شده ی کیازن برای ترانسفکشن سلول های چسبنده با استفاده از miScript miRNA Mimic و miScript miRNA Inhibitor انجام شد و بدنبال آن سلول های مورد مطالعه گروه بندی شدند .

۴-۴-۱- پروفایل بیان $miR-124-3p$ در HFSC ها پس از ترانسفکشن

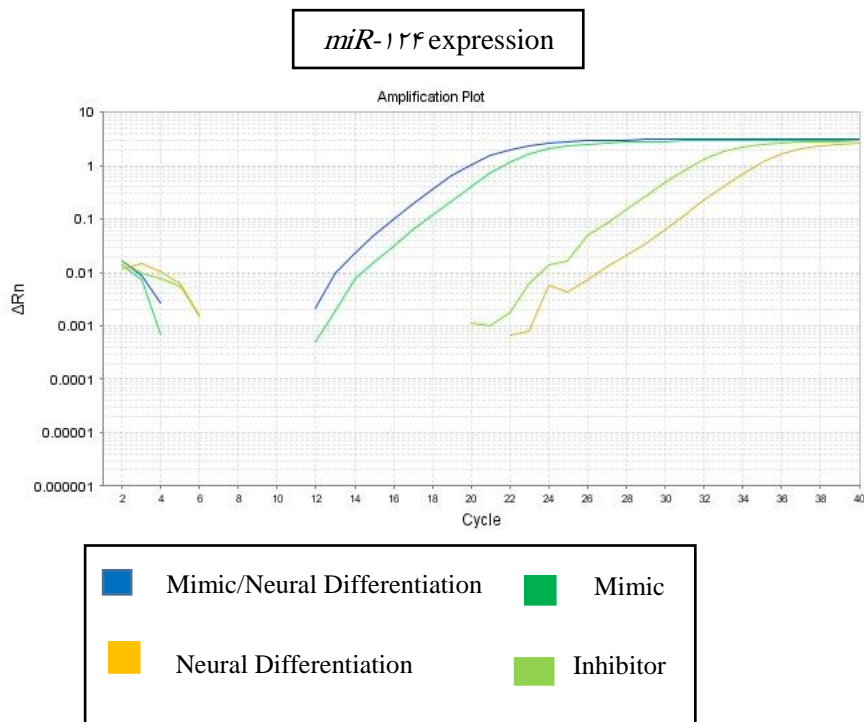
بمنظور بررسی سطح رونویسی و بیان $miR-124$ در HFSC های گروه های موردنظر ، پس از انجام تمامی مراحل استخراج RNA ی تام از نمونه ها ، واکنش پلی آدنیلایسیون و سنتز cDNA با استفاده از پرایمر Forward اختصاصی $miR-124$ واکنش Real-time PCR صورت گرفت . آنالیز Fold change نسبی داده های ریل تایم حاکی از افزایش بیان $miR-124$ و $miR-124$ به ترتیب در دو گروه Mimic و Mimic/Neural Differentiation و همچنین کاهش ۷,۸۱۹ برابری سطح بیان این miRNA در گروه Inhibitor در روز ۳ ام پس از ترانسفکشن در مقایسه با گروه کنترل (بدون ترانسفکشن) یعنی Neural Differentiation با افزایش بیان ۱۹,۶۹۸ برابری می باشد (نمودار ۴-۵) .



نمودار ۴-۵- تغییرات بیان $miR-124-3p$ بعد از القای نورونی ، ترانسفکشن Mimic و Inhibitor :

سنجش سطح بیان این میکروآرنا توسط Real-time PCR بیان بسیار بالای $miR-124$ را در دو گروه Mimic و Mimic/Neural Differentiation و هم چنین کاهش بیان قابل ملاحظه ای را در گروه Inhibitor در روز ۳ ام پس از ترانسفکشن نسبت به گروه کنترل نشان داد . نمودار میله ای نشان دهنده ی Fold Change های نسبی مربوط به سطح بیان گروه های Mimic ، Neural Differentiation و Inhibitor با اختلاف معنی دار $p < 0.05$ * نسبت به گروه کنترل

نمودار ۴-۶ نیز نشان دهنده ی منحنی تکثیر محصولات ریل تایم در این مرحله می باشد :



نمودار ۴-۶- منحنی های تکثیر مربوط به بیان *miR-124* طی واکنش Real-time PCR در HFSC های گروه های مورد نظر پس از ترانسفکشن

۴-۴-۲- بررسی بیان ژن های هدف در HFSC ها پس از ترانسفکشن

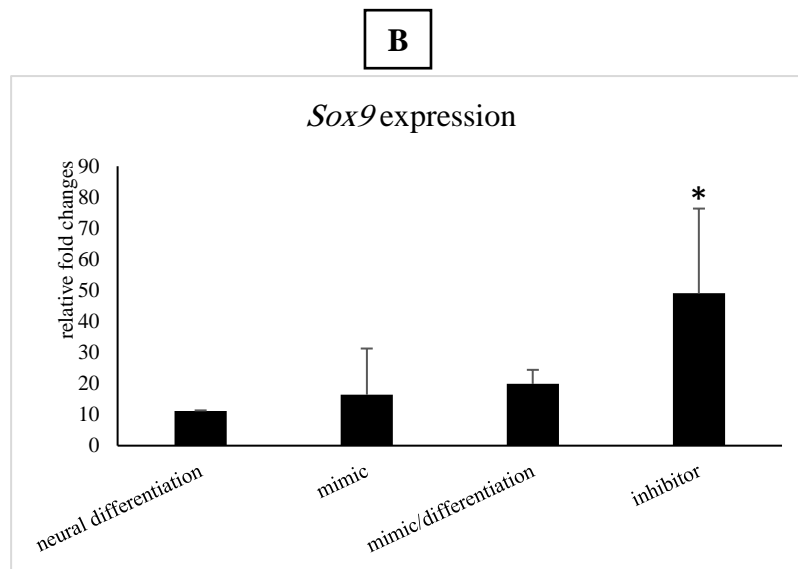
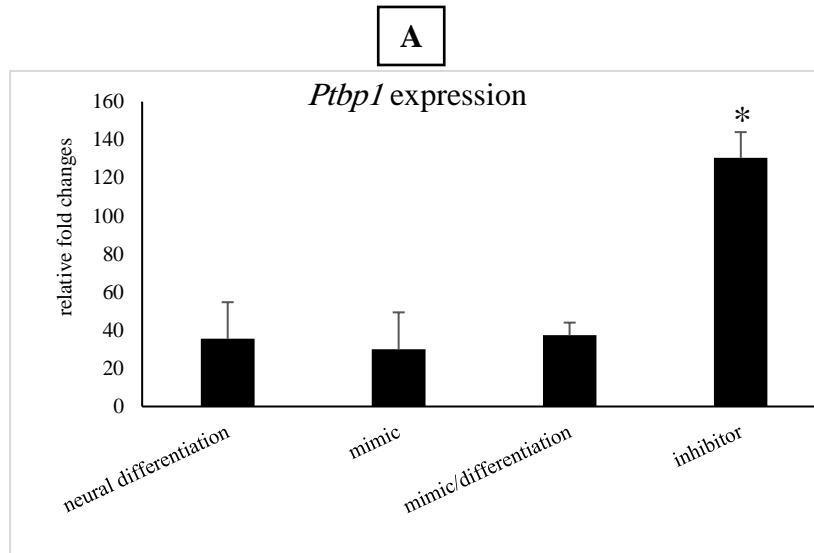
۴-۴-۲-۱- ژن های *Ptbp1* و *Sox9*: اهداف مستقیم *miR-124* در HFSC ها

پروتئین متصل شونده به RNA ی *PTBP1* با اتصال به توالی های غنی از پیریمیدین در pre-mRNA ها ، روند پیرایش متناوب اگزون های اختصاصی - نرونی را مهار می کند (Black, ۲۰۰۳; Sharma et al. ۲۰۰۵) ؛ لذا در طول تمایز نرونی بیان این ژن کاهش می یابد.

Sox9 هم بعنوان یک فاکتور رونویسی و در عین حال یکی از افکتورهای پائین دستی مهم مسیر سیگنالینگ Notch بوده و نقشی مهم در کنترل روند تمایز عصبی با واسطه ی -این مسیر دارد و در واقع *Sox9* بعنوان تعدیل کننده ی اختصاصی و بسیار مهم مسیر سیگنالینگ Notch ، کنترل کننده ی تعهد دودمان عصبی است (Martine et al. ۲۰۱۳) .

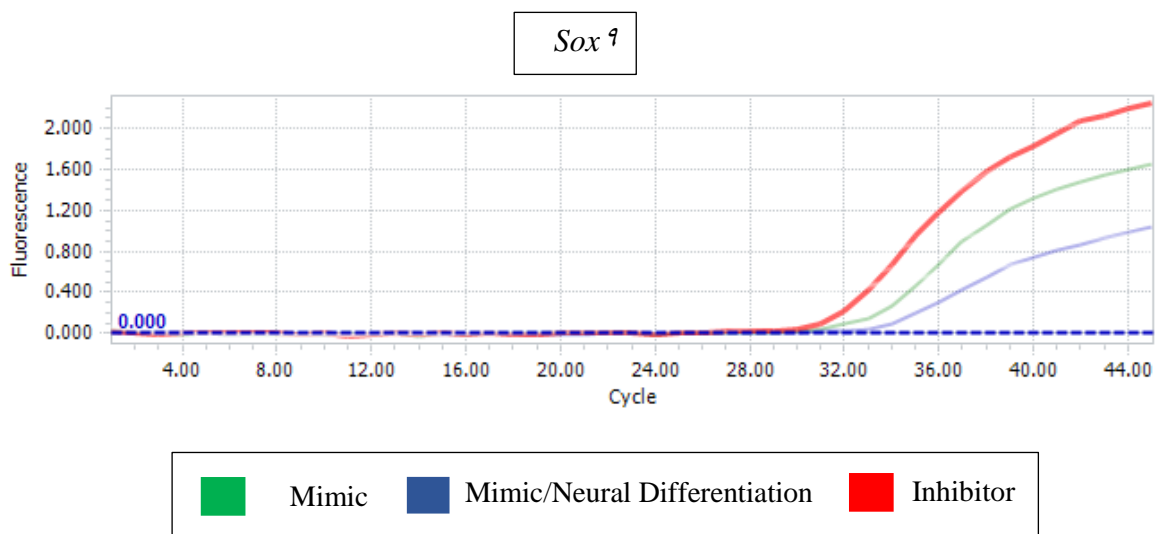
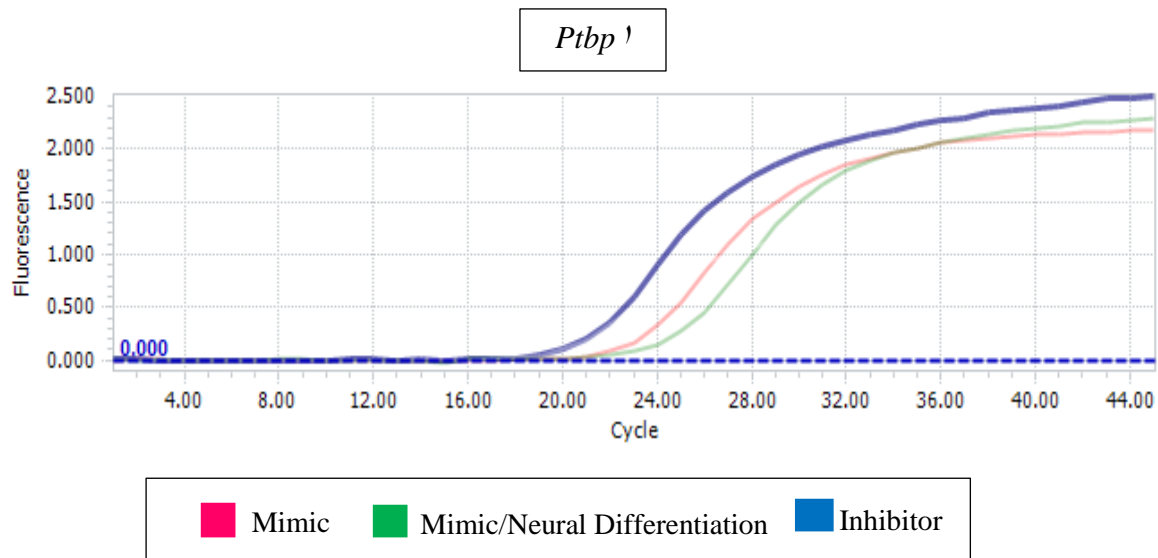
لذا با توجه به مطالب فوق ، فرض ما در این تحقیق بر این بود که *Ptbp1* و *Sox9* می توانند توسط *miR-124* بمنظور تنظیم بیان آن مورد هدف قرار گیرند . چنین پیش بینی شده بود که *miR-124* دارای جایگاه

هدفی در ناحیه 3'UTR هر دو ژن *Ptbp1* و *Sox9* باشد. ترانسفکشن HFSC ها با miScript miR-124 Mimic ۱۲۴ و Mimic/Neural Differentiation منجر به کاهش معنی داری در سطوح بیان *Ptbp1* و *Sox9* شد اما ترانسفکشن با miScript miR-124 Inhibitor سطوح mRNA ی ژن های *Ptbp1* و *Sox9* را به ترتیب افزایش ۱۶۷,۷۳ (نمودار ۴-۷) و ۶۰,۴ برابری داد (نمودار ۴-۸).



نمودار ۴-۷- تغییرات بیان *Ptbp1* و *Sox9* بعد از ترانسفکشن ۳p-۱۲۴-miR: سنجش سطح بیان *Ptbp1* و *Sox9* توسط Real-time PCR بیان بسیار پائین *Ptbp1* (A) و *Sox9* (B) را در گروه Mimic/Neural Differentiation و Mimic و هم چنین افزایش بیان قابل ملاحظه ای را در گروه Inhibitor پس از ترانسفکشن نسبت به گروه کنترل نشان داد. نمودار میله ای نشان دهنده Fold Change های نسبی مربوط به سطح بیان گروه های Mimic، Mimic/Neural Differentiation و Inhibitor با اختلاف معنی دار $p < 0,05$ * نسبت به گروه کنترل

نمودار ۴-۸ نشان دهنده ی منحنی های تکثیر محصولات ریل تایم برای دو ژن *Ptbp 1* و *Sox 9* می باشد :



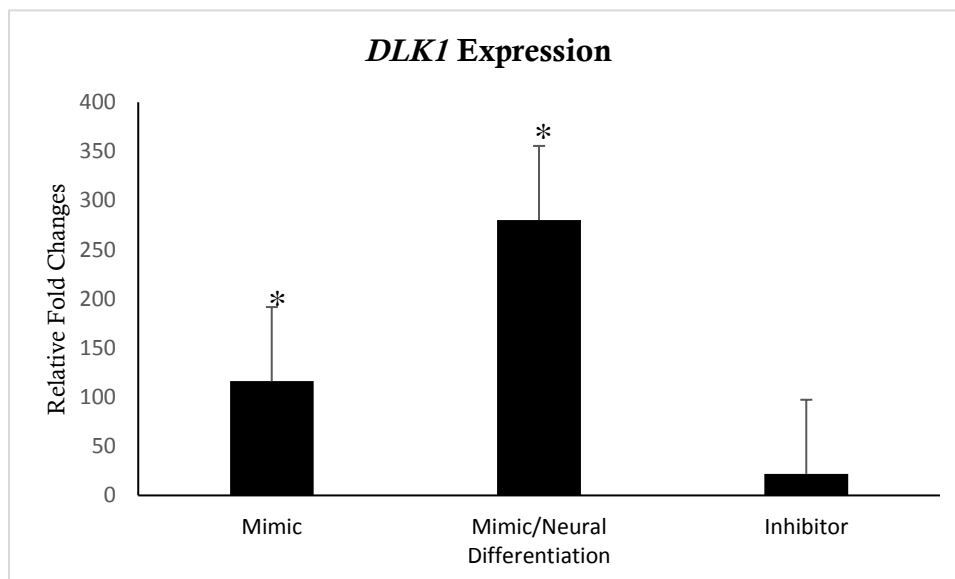
نمودار ۴-۸- منحنی های تکثیر مربوط به *Ptbp 1* و *Sox 9* بعد از ترانسفکشن *miR-124-3p* : طی واکنش Real-time PCR در HFSC های سه گروه Mimic ، Mimic/Induction ، و Inhibitor : در منحنی های تکثیر هر دو ژن هدف بیشترین میزان بیان و عبارت دیگر کمترین مقدار *Ct* مربوط به گروه Inhibitor و پس از آن به ترتیب مربوط به گروه های Mimic/Neural Differentiation و Mimic می باشد.

* توجه : این نمودارها توسط دستگاه Roche LightCycler ثبت شده است.

۴-۲-۲-۴-۴ نقش آن در تمایز نورونی HFSC ها پس از ترانسفکشن

فعال سازی مسیر سیگنالینگ Notch با القای Hes¹، بعنوان تعدیل کننده ی اصلی این مسیر، به نوبه خود باعث مهار روند نوروزنزیس می گردد (Ishibashi et al. ۱۹۹۴; Nakamura et al. ۲۰۰۰). در حالیکه غیرفعال سازی این مسیر سیگنالینگ باعث پیشبرد روند تمایز نورونی NSC ها می شود (Roos et al. ۲۰۰۳). طبق مطالعات انجام شده، DLK¹ که از جمله لیگاندهای غیرمتعارف^۱ سیگنالینگ Notch می باشد به عنوان مهارکننده ی سیگنالینگ Notch با واسطه-Hes¹ در محیط های *in vitro* عمل می کند (Baladron et al. ۲۰۰۵; Falix et al. ۲۰۱۲).

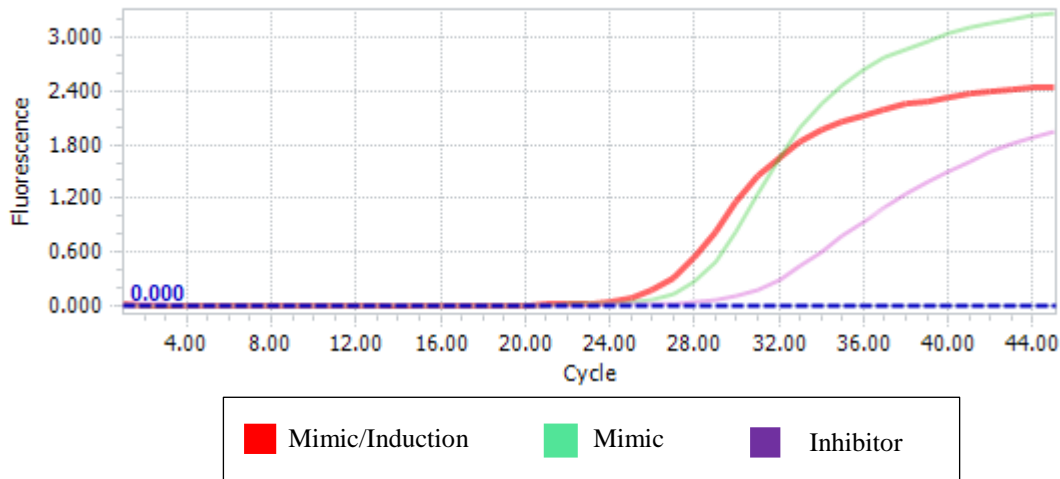
لذا با توجه به مطالب فوق، فرض ما در این تحقیق بر این بود که DLK¹ متعاقب ترانسفکشن با میکروآرنا ی عصبی miR-۱۲۴ می تواند بعنوان یکی از ژن های عصبی، منجر به افزایش میزان تمایز نورونی گردد. در همین راستا نتایج ما نشان داد ترانسفکشن HFSC ها با miScript miR-۱۲۴ Inhibitor باعث کاهش معناداری در سطح mRNA ی این ژن شد اما ترانسفکشن همین سلول ها با miScript miR-۱۲۴ Mimic و Mimic/Neural Differentiation به ترتیب منجر به افزایش معنی دار ۱۱۶,۱۶۲ و ۲۸۰,۱۳۹ برابری در سطوح بیان DLK¹ شد.



نمودار ۴-۹- تغییرات بیان DLK¹ بعد از ترانسفکشن: سنجش سطح بیان DLK¹ توسط Real-time PCR بیان بسیار پائین DLK¹ در گروه Inhibitor و در عین حال افزایش بیان قابل ملاحظه ای را در دو گروه Mimic و Mimic/Neural Differentiation پس از ترانسفکشن نسبت به گروه کنترل نشان داد. نمودار میله ای نشان دهنده Fold Change های نسبی مربوط به سطح بیان گروه های Mimic، Mimic/Neural Differentiation، و Inhibitor با اختلاف معنی دار $p < 0.05$ * نسبت به گروه کنترل

^۱- noncanonical Notch ligand

منحنی تکثیر محصولات ریل تایم برای ژن عصبی *DLK1* بصورت زیر می باشد (نمودار ۴-۱۰):



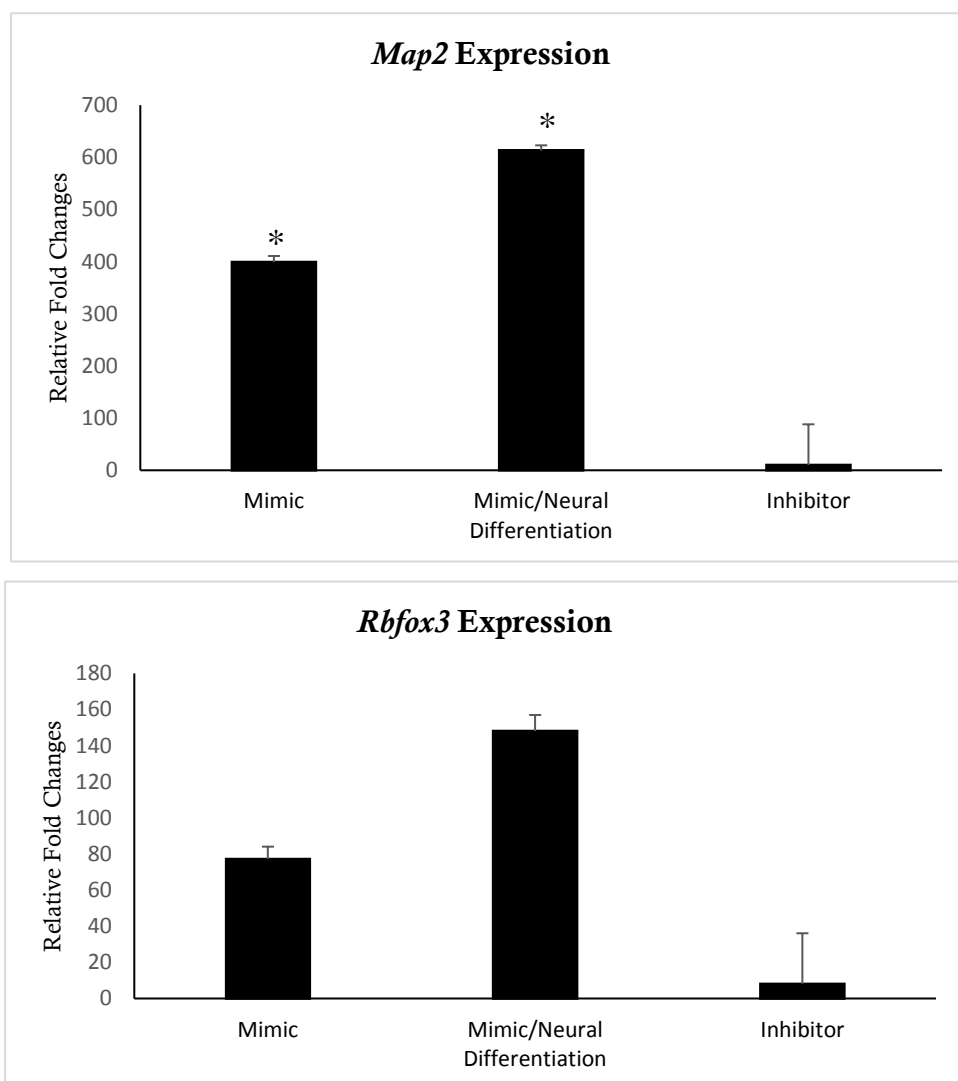
نمودار ۴-۱۰- منحنی تکثیر مربوط به *DLK1* بعد از ترانسفکشن *miR-124-3p*: طی واکنش Real-time PCR در HFSC های سه گروه Mimic، Mimic/Neural Differentiation، و Inhibitor: در منحنی تکثیر هر دو ژن هدف بیشترین میزان بیان با کمترین مقدار *Ct* مربوط به ترتیب مربوط به گروه های Mimic/Neural Differentiation و Mimic و کمترین نیز مربوط به گروه Inhibitor می باشد.

۴-۲-۳-۴- ژن های *Map2* و *Rbfox3*: بعنوان مارکرهای نورونی در تمایز HFSC ها

MAP2 بعنوان یکی از پروتئین های اسکلت سلولی اختصاصی-نورونی است که عمدتاً در نورون ها و به طور عمده در زوائد دندریتی نورون ها بیان شده و با تثبیت میکروتوبول ها، طول دندریت ها را تحت تأثیر قرار می دهد (Harada et al. ۲۰۰۲; Cassimeris and Spittle. ۲۰۰۱). مطالعات حاکی از آنست که MAP2 در فرآیندهای مهم بلوغ نورون ها اعم از گسترش و انشعاب نوریت ها و همچنین برای متوقف کردن تقسیم سلولی از اهمیت بالایی برخوردار است (Johnson and Jope. ۱۹۹۲). از اینرو MAP2 بعنوان مارکر فنوتیپ نورونی مورد استفاده قرار می گیرد (Izant and McIntosh, ۱۹۸۰).

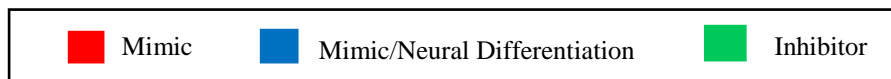
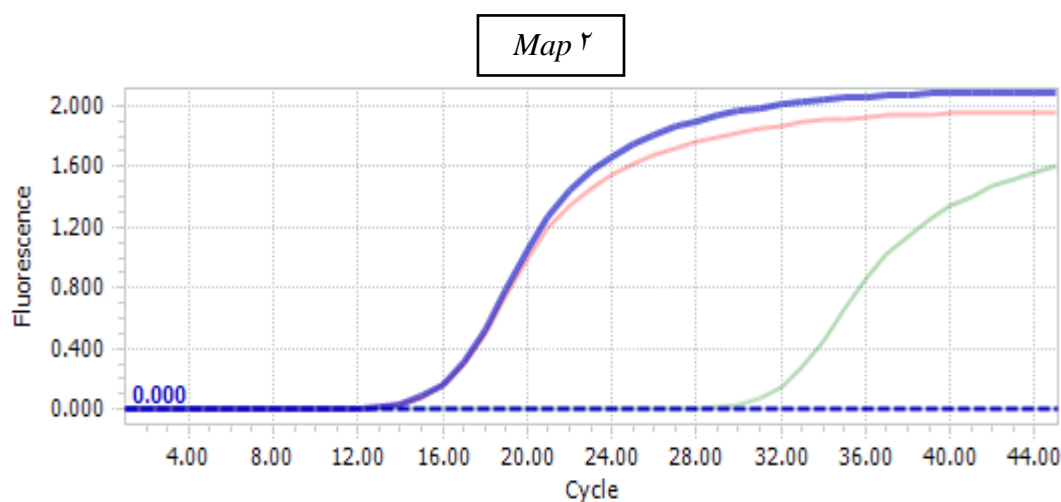
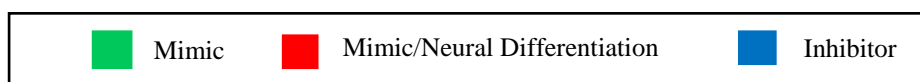
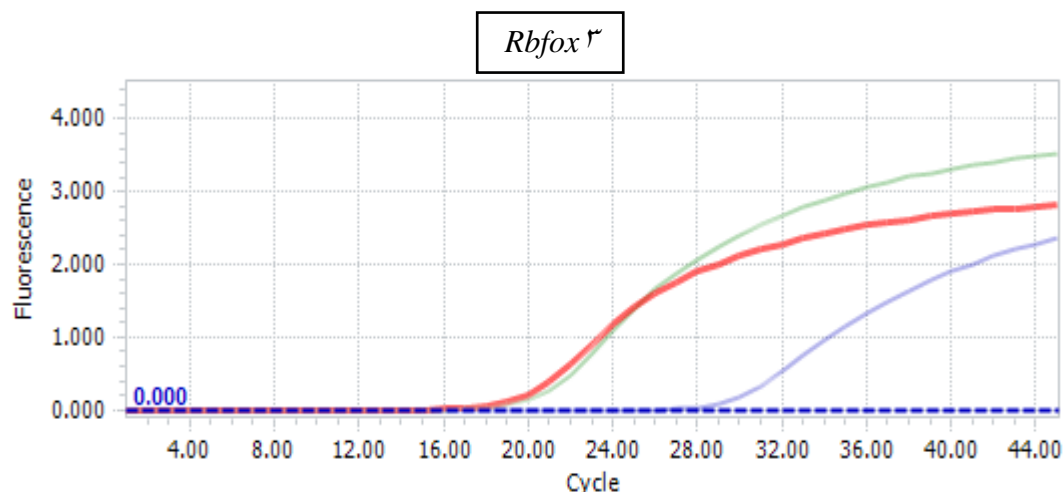
پروتئین NeuN (و یا *Rbfox3*)، در هسته و سیتوپلاسم دورهسته ای اغلب نورون های سیستم عصبی مرکزی پستانداران یافت شده (Korzhevsky, ۲۰۱۳) و بعنوان مارکر نورون های پُست - میتوتیک در مطالعات مربوط به تمایز نورونی مورد استفاده قرار می گیرد (Verdiev et al. ۲۰۰۹). این پروتئین هیچگاه در سلول های گلیال یافت نشده است، که خود دال بر اینست که NeuN یک مارکر اختصاصی نورونی می باشد.

لذا در این تحقیق مفروض بود که ژن های *Map2* و *Rbfox3* متعاقب ترانسفکشن با *miR-124* و افزایش تعداد نوروها در پروسه تمایز عصبی HFSC ها می بایست بعنوان مارکرهای اختصاصی نرونی سطح بیان بالاتری داشته باشند. نتایج ما نشان داد ترانسفکشن HFSC ها با *miScript miR-124 Inhibitor* منجر به کاهش معنی داری در سطوح بیان هر دو مارکر نرونی شد؛ اما ترانسفکشن با *miScript miR-124 Mimic* و *Mimic/Neural Differentiation* به ترتیب باعث افزایش ۳۹۸,۹۳۲ و ۶۱۳,۱۰۹ برابری در سطح mRNA ژن *Map2* و افزایش ۷۷,۱۷ و ۱۴۸,۰۵ برابری در سطح بیان ژن *Rbfox3* گردید (نمودار ۴-۸).



نمودار ۴-۱۱- تغییرات بیان *Map2* و *Rbfox3* بعد از ترانسفکشن *miR-124-3p* سنجش سطح بیان مارکرهای نرونی توسط Real-time PCR بیان بسیار پائین این مارکرها را در گروه Inhibitor و در عین حال افزایش بیان قابل ملاحظه ای را در دو گروه Mimic و Mimic/Neural Differentiation پس از ترانسفکشن نسبت به گروه کنترل نشان داد. نمودار میله ای نشان دهنده Fold Change های نسبی مربوط به سطح بیان گروه های Mimic، Mimic/Neural Differentiation و Inhibitor با اختلاف معنی دار $p < 0.05$ * نسبت به گروه کنترل

منحنی های تکثیر ریل تایم دو مارکر نورونی *Map2* و *Rbfox3* در نمودار ۴-۱۲ نشان داده شده است:



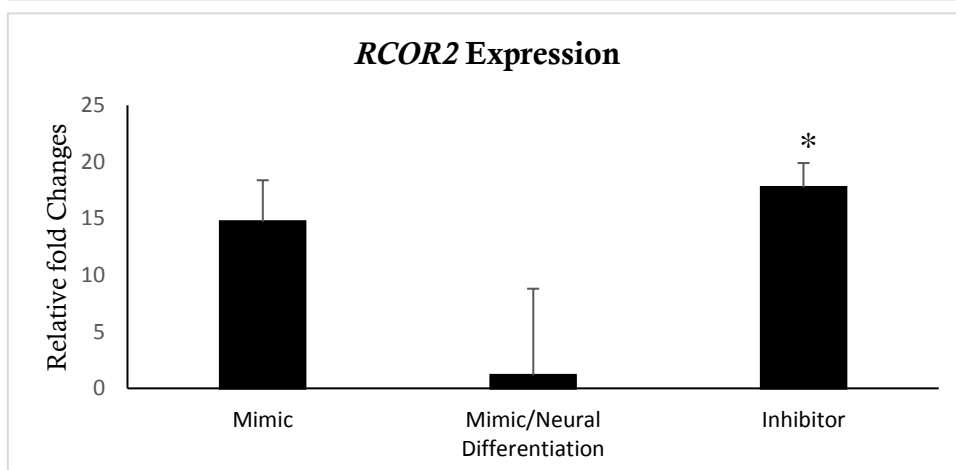
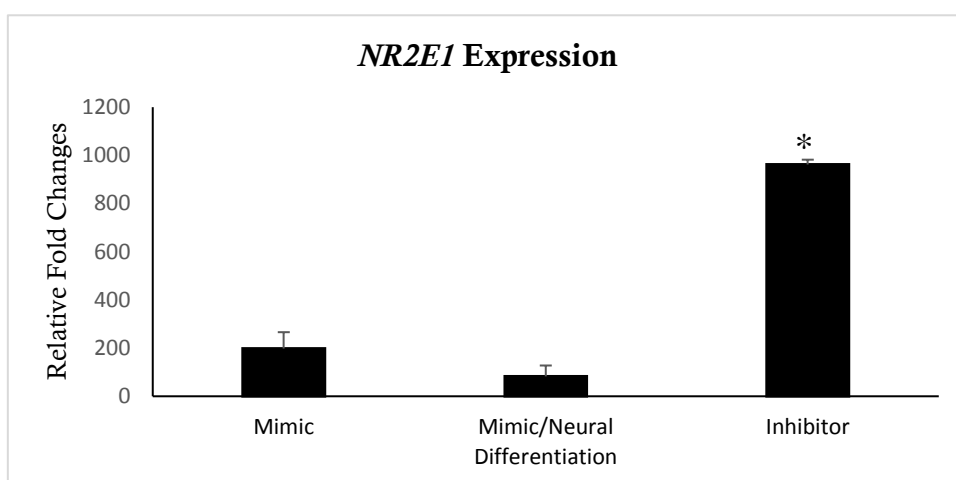
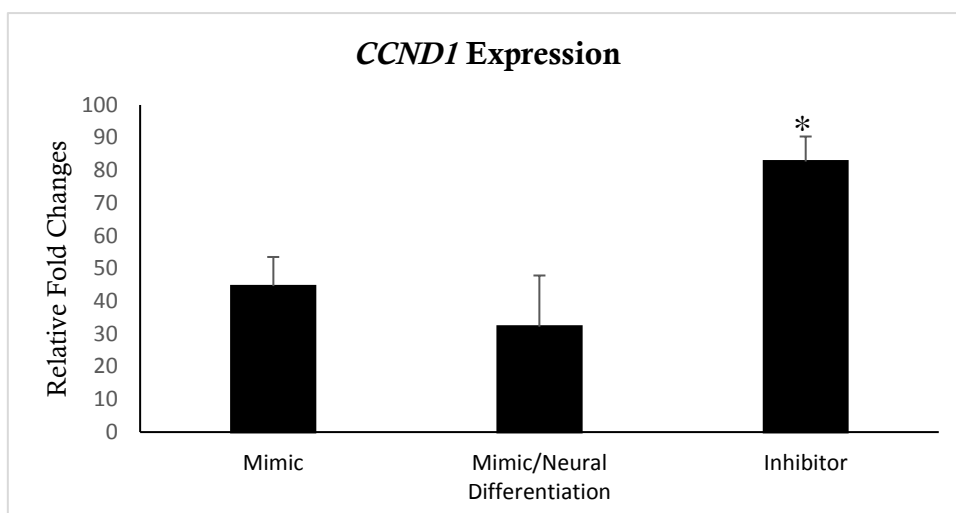
نمودار ۴-۱۲- منحنی های تکثیر مربوط به مارکرها *Map2* و *Rbfox3* بعد از ترانسفکشن *miR-124-3p*: طی واکنش Real-time PCR در HFSC ها ی سه گروه Mimic، Mimic/Neural Differentiation و Inhibitor: در منحنی های تکثیر هر دو ژن هدف نورونی بیشترین میزان بیان با کمترین مقدار *Ct* مربوط به ترتیب مربوط به گروه های Mimic/Neural Differentiation و Mimic و کمترین نیز مربوط به گروه Inhibitor می باشد.

۴-۲-۴-۴ ژن های *CCND1*، *NR2E1* و *CoREST* در تمایز نورونی HFSC ها :

ژن *CCND1* کد کننده ی *CyclinD1*، تنظیم کننده ی مثبت پیشرفت سیکل سلولی بوده (Zhao et al. ۲۰۱۰) و در عین حال طبق مطالعات اخیر می تواند بواسطه تنظیم فعالیت فاکتورهای رونویسی متعدد و هیستون داستیلاز ($HDAC^3$) بعنوان تعدیل کننده ی - رونویسی نیز عمل کند (Coqueret, ۲۰۰۲). *TLX* (*NR2E1*) بعنوان یک رسپتور هسته ای orphan (گروهی از رسپتورهای هسته ای که لیگاند اندوژن آن ها هنوز نامشخص است) تنظیم کننده ی بسیار مهمی در حفظ وضعیت تکثیری و مهار تمایز NSC های بالغ و جنینی می باشد (Abrahams et al. ۲۰۰۵). *TLX*، بواسطه اجتماع با هیستون داستیلازها و سرکوب رونویسی ژن های هدف پائین دستی خود ($p21$) (مهار کننده ی کیناز وابسته به - سیکلین) و *pten* (ژن سرکوب گر تومور) باعث تثبیت وضعیت تمایز نیافتگی و خود-نوزائی سلول های بنیادی عصبی می شود (Sun et al. ۲۰۰۸). از آنجائیکه *PTEN* تنظیم کننده منفی *cyclinD1* می باشد؛ لذا *TLX* تاحدودی با سرکوب *pten*، منجر به القای بیان *cyclinD1* می شود (Weng et al. ۲۰۰۱).

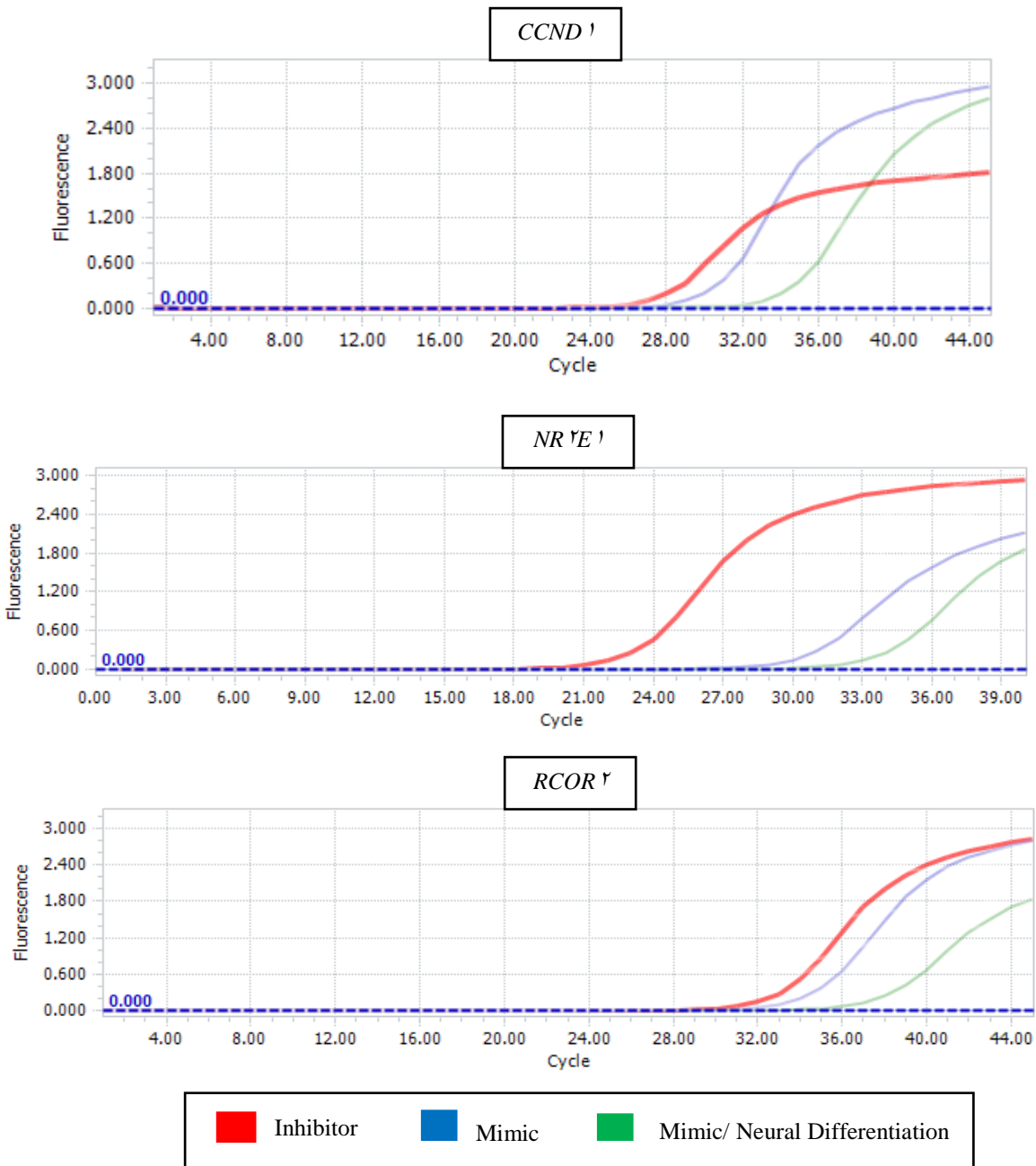
میکروآرنا *let-7b* با اتصال به ناحیه ی ۳'UTR در mRNA ی *Tlx* و *cyclinD1* باعث سرکوب بیان این دو ژن شده و بعنوان تنظیم کننده بالادستی بسیار مهم تکثیر و تمایز سلول های بنیادی ایفای نقش می کند (Zhao et al. ۲۰۱۰). علاوه بر *let-7b*، *miR-9* نیز با تشکیل لوپ فیدبکی تنظیمی با *TLX*، هدف قرار دادن و سرکوب بیان آن نهایتاً باعث تنظیم تکثیر و تمایز NSC ها می شود؛ در واقع می توان گفت *TLX* یک ژن هدف مهم و در عین حال مشترک برای *let-7b* و *miR-9* می باشد. البته در طول نورونزئیس کمپلکس *REST* و یکی از کوفاکتورهای بسیار مهم آن موسوم به *CoREST* (یا *RCOR2*) نیز از طریق یک جایگاه اتصال عملکردی برای *miR-9* در ۳'UTR خود در سطح پس از-رونویسی تحت تنظیم قرار گرفته (Packer et al. ۲۰۰۸) و یکی از اهداف این میکروآرنا بشمار می روند (Lewis et al. ۲۰۰۳).

با توجه به مطالب فوق فرض ما بر این بود که متعاقب ترانسفکشن *miRNA* ی عصبی و القای تمایز نورونی در HFSC ها به موازات افزایش تعداد نوروها می بایست ژن های مستلزم تکثیر *CCND1* و *NR2E1* و همینطور *RCOR2* بعنوان سرکوب گر رونویسی ژن های نورونی در سلول های بنیادی مورد مطالعه رو به کاهش گذارند. نتایج ما نشان داد ترانسفکشن HFSC ها با *Mimic miR-124* و *Mimic/Neural Differentiation* منجر به کاهش معنی داری در سطوح بیان هر سه ژن شد؛ اما ترانسفکشن با *Inhibitor miR-124* به ترتیب باعث افزایش ۸۲،۷۱، ۹۶۲،۰۷ و ۱۷،۷۵ برابری در سطح mRNA ژن *CCND1*، *NR2E1* و *RCOR2* گردید (نمودار ۴-۱۳).



نمودار ۴-۱۳- تغییرات بیان *CCND 1*، *NR 2E 1* و *RCOR 2* بعد از ترانسفکشن و القای تمایز نورونی: سنجش سطح بیان این ژن ها توسط Real-time PCR بیان نسبتاً پائین آنها را در دو گروه Mimic و Mimic/Neural Differentiation و در عین حال افزایش بیان قابل ملاحظه ای را در گروه Inhibitor نسبت به گروه کنترل نشان داد. نمودار میله ای نشان دهنده Fold Change های نسبی مربوط به سطح بیان گروه های Mimic، Mimic/Differentiation و Inhibitor با اختلاف معنی دار $p < 0.05$ * نسبت به گروه کنترل

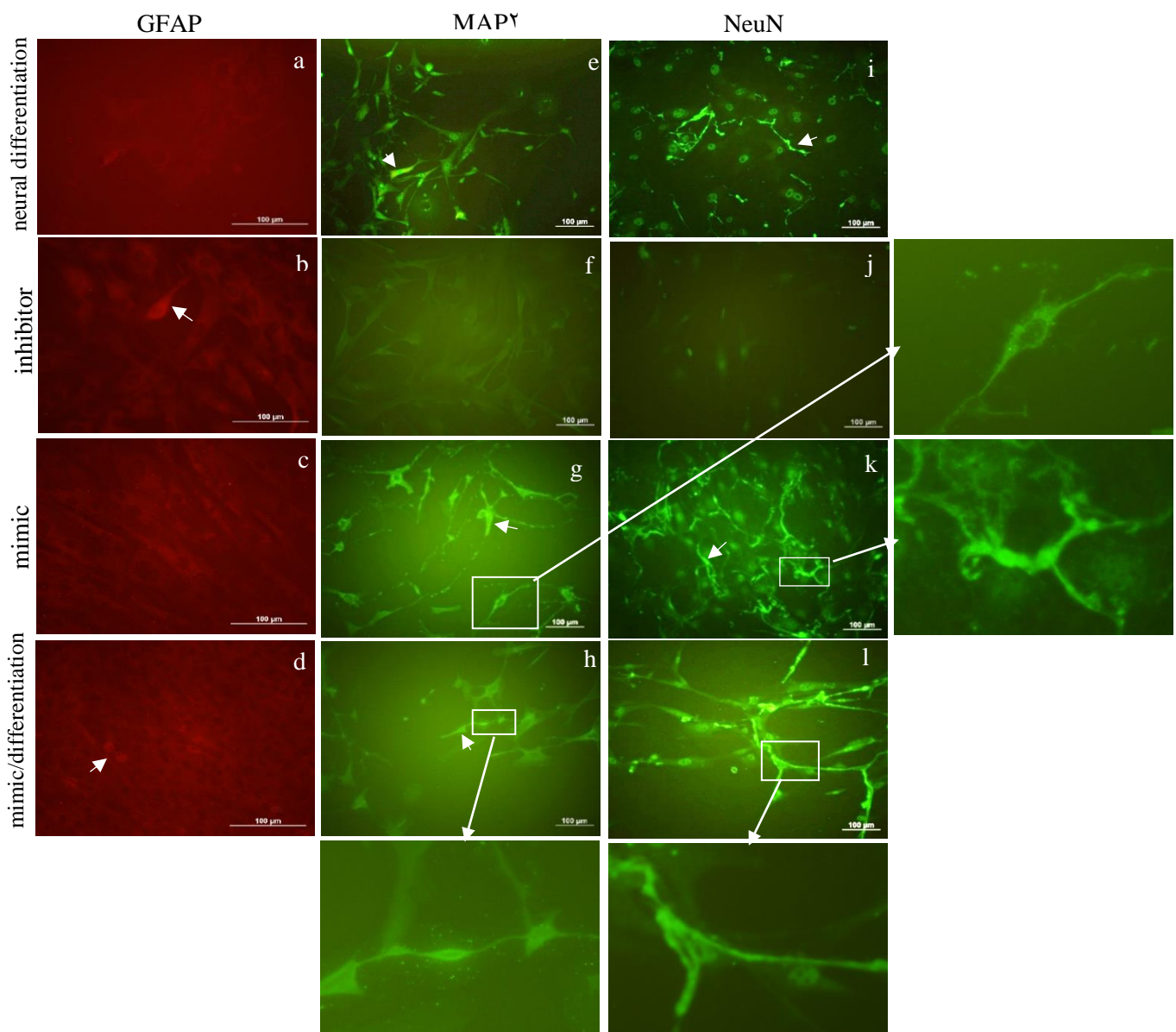
منحنی های تکثیر ریل تایم برای سه ژن مورد مطالعه در این مرحله در نمودار ۴-۱۴ نشان داده شده است:



نمودار ۴-۱۴- منحنی های تکثیر مربوط به ژن های *CyclinD1* ، *NR2E1* و *RCOR2* بعد از ترانسفکشن: طی واکنش Real-time PCR در HFSC های سه گروه Mimic ، Mimic/Neural Differentiation و Inhibitor : در منحنی های تکثیر هر سه ژن موردنظر بیشترین میزان بیان با کمترین مقدار *Ct* مربوط به ترتیب مربوط به گروه Inhibitor و کمترین میزان بیان نیز مربوط به دو گروه Mimic و Mimic/ Neural Differentiation می باشد .

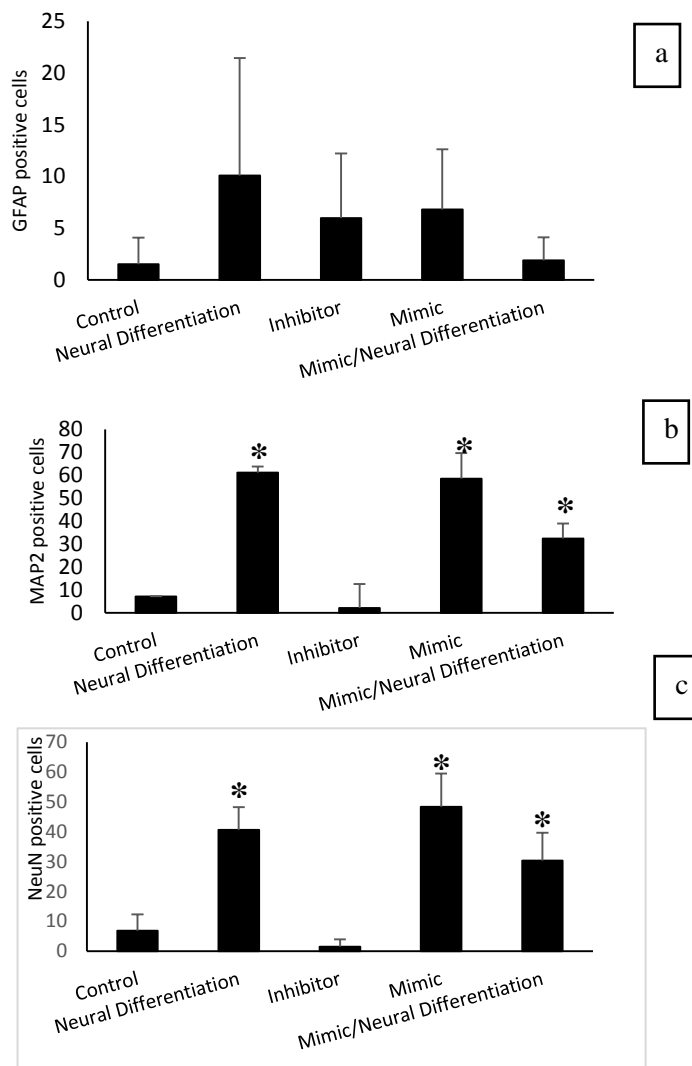
۴-۴-۳- بررسی بیان مارکرهای عصبی در HFSCs پس از ترانسفکشن با ایمونوسیتوشیمی

بمنظور حصول اطمینان از نقش *miR-1۲۴* در تمایز نورونی سلول های بنیادی فولیکول مو، در این مرحله تأثیرات بیان بالا یا تنظیم اندک این میکروآرنا را بر روند تمایز عصبی مورد بررسی قرار دادیم. در گروه های *Neural Differentiation*، *miR-1۲۴ Mimic*، *Neural Differentiation Mimic* و *Neural Differentiation Inhibitor*؛ لازم به ذکر است که تیمار سلول ها با *Inhibitor* منجر به افزایش تمایز دودمان عصبی نگردید (شکل ۴-۴b,f,j).



شکل ۴-۴- تأثیرات محیط تمایز نورونی، بیان بالا یا مهار *miR-1۲۴* روی تمایز نورونی و گلیالی : بیان *MAP2* و *NeuN* به میزان قابل توجهی در گروه های *Neural Differentiation*، *miScript miR-1۲۴ Mimic*، *Neural Differentiation Mimic* افزایش یافت (e,g,h,i,k,l). فتومیکروگراف هائی از سلول های $GFAP^+$ (a-d)، $MAP2^+$ (e-h) و $NeuN^+$ (i-l) پس از ترانسفکشن با *miScript miR-1۲۴ Inhibitor* و *miScript miR-1۲۴ Mimic* (بزرگنمایی 100x و 100 μm Scale Bar)

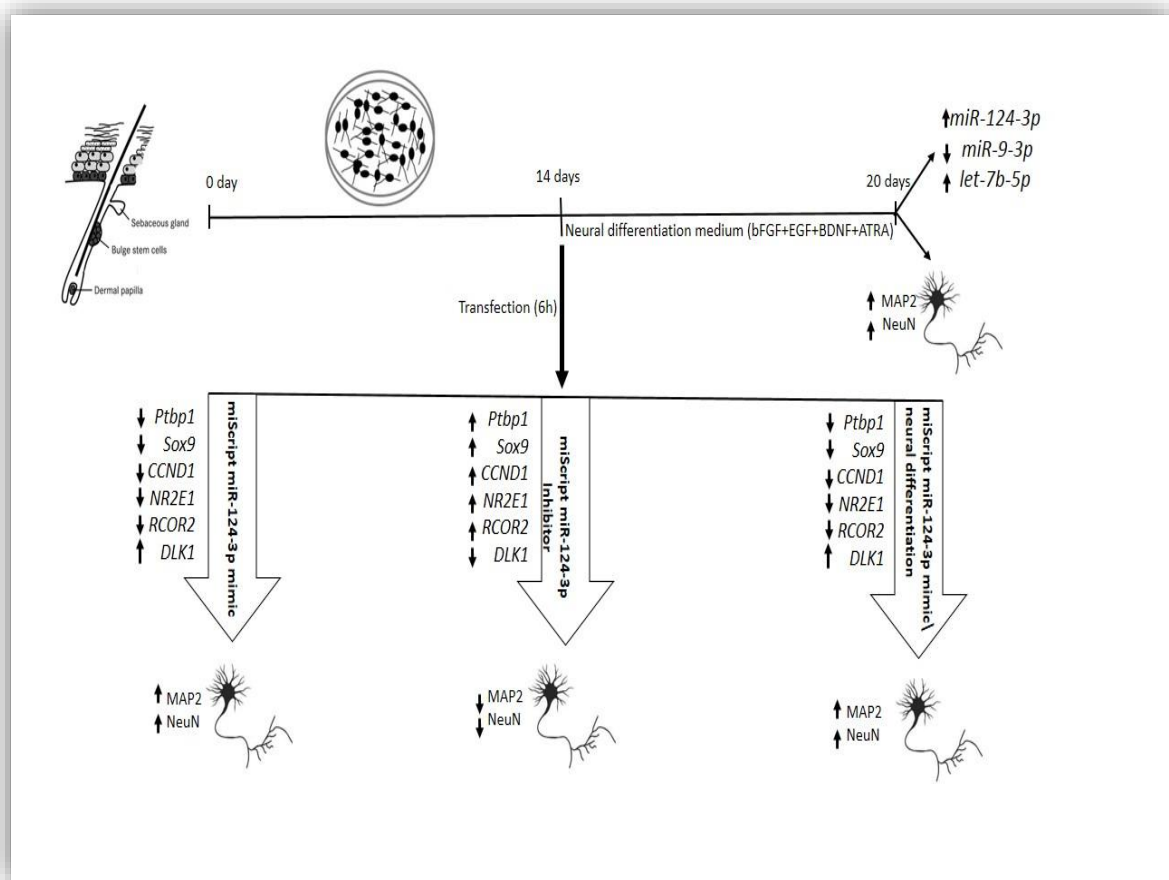
بعد از سپری شدن سه روز از تیمارهای موردنظر HFSC ها طبق گروه بندی ، شمارش سلول های عصبی حاصل با *ImageJ* حاکی از این بود *miR-124* Mimic نسبت سلول های $Map2^+$ ($58,43 \pm 11,26$) و $NeuN^+$ ($48,34 \pm 11,15$) را افزایش داد ؛ اما در مقابل باعث کاهش سلول های $GFAP^+$ شد (نمودار ۴-۱۵ a,b,c).



نمودار ۴-۱۵- تاثیرات مربوط به بیان بالا یا مهار *miR-124* روی تمایز نورونی و گلیالی : *miScript miR-124* Mimic و *Mimic/Neural Differentiation* باعث افزایش تمایز نورونی پس از گذشت سه روز از تیمار سلول ها شد. قابل توجه است که تیمار سلول ها با *miScript miR-124* Inhibitor باعث افزایش تمایز دودمان عصبی نگردد. داده ها بصورت $means \pm SEM$ اختلاف معنی دار $p < 0.01$ * نسبت به گروه کنترل

در مجموع می توان گفت میزان تولید سلول های نورونی ($Map2^+$ و $NeuN^+$) از HFSC ها پس از ترانسفکشن با *miR-124* ، بالاتر از گروه القای تمایز نورونی به تنهایی می باشد.

۴-۵- چکیده ی تصویری نتایج حاصل در فازهای مختلف تحقیق :



شکل ۴-۵- نمودار شماتیکی برای تمایز نورونی سلول های بنیادی فولیکول موی موش در محیط *in vitro* : سلول های بنیادی فولیکول موی ۱۴ روز پس از کشت اولیه و انجام پاساژ سلولی ، در محیط کشت های تمایز نورونی حاوی ATRA, BDNF, EGF و bFGF به مدت ۱۰ روز رشد یافتند. بعلاوه ، سلول های بنیادی تحت کشت با Mimic و Inhibitor مربوط به miR-124 ترانسفکت شدند. سپس سطح بیان mRNA ی ژن های هدف با استفاده از RT-PCR مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و متعاقباً رنگ آمیزی ایمونوسیتوشیمی بمنظور ارزیابی بیان پروتئین های مارکرهای عصبی MAP2، NeuN و GFAP انجام شد.

فصل پنجم : بحث و نتیجه گیری

۵-۱- بحث

سلول های بنیادی فولیکول مو (HFSCs) مشابه سلول های بنیادی جنینی بوده و دارای پتانسیل تکثیری بالا در محیط های *in vitro* بوده (Najafzadeh et al. ۲۰۱۵; Dastal et al. ۲۰۱۶; Najafzadeh et al. ۲۰۱۳) و در عین حال دارای قابلیت تمایز به دودمان های متعدد عصبی نیز هستند (Amoh et al. ۲۰۱۵; Najafzadeh et al. ۲۰۰۵).

سلول های بنیادی فولیکول مو قادر به تولید جمعیت زیادی از دودمان های گلیال و نورونی متعاقب انکوباسیون با فاکتورهای رشد اگزوزن یا خارجی می باشند (El Seady et al. ۲۰۰۸). تاکنون طیف گسترده ای از القاگرها در مطالعات مختلف جهت القای تمایز عصبی در سلول های بنیادی فولیکول مو اعم از نوروتروفین-۳ (Ghoroghi et al., ۲۰۱۳)، فاکتور نوروتروفیک مشتق از مغز (BDNF) و فاکتور نوروتروفیک مشتق از رده سلول های گلیال (GDNF)، ۱-Neuregulin و محیط کشت RPMI ۱۶۴۰ حاوی ۱۰٪ سرم مورد استفاده قرار گرفته اند (Najafzadeh et al. ۲۰۱۵; Sagha et al. ۲۰۱۶; Sieber-Blum et al. ۲۰۰۶; El-Seady et al. ۲۰۰۸b).

محیط های کشت مکمل احتمالاً قابلیت تحت تأثیر قرار دادن روند تمایز سلولی را دارند چرا که گروهی از مطالعات ثابت کرده اند پروتکل محیط های عاری از سرم منجر به تسهیل روندهای نوروتزیم و آستروژنزیس در سلول های بنیادی فولیکول مو در محیط های می شود. همچنین تیمار با رتینوئیک اسید تمام ترانس نیز تعداد نوروها را نسبت به شرایط کنترل افزایش می دهد؛ مطالعات حاکی از آن است EGF و b-FGF فاکتورهای رشدی هستند که نقش بسیار مهمی را در حفظ و تکثیر سلولهای بنیادی فولیکول مو ایفا می کنند (Najafzadeh et al. ۲۰۱۵). بعلاوه ثابت شده که پیش تیمار سلول های بنیادی مغز استخوان بالغ با EGF و bFGF تمایز عصبی را افزایش داده و باعث تمایز نورونی این سلول ها می شود همچنین قابلیت استفاده از چنین سلول های بالغ را در درمان بیماری ها و یا آسیب های سیستم عصبی می افزاید (Delcroix et al. ۲۰۱۰).

لذا ما در این تحقیق از پروتکل اندکی تغییر یافته تمایز نورونی برای HFSCs متشکل از رتینوئیک اسید تمام ترانس، فاکتور رشد اپیدرمال، فاکتور رشد فیبروبلاستی، فاکتور رشد مشتق از مغز و تیمارهای شیمیایی مانند کلراتوکسین، انسولین و هیدروکورتیزون بمنظور القای تمایز نورونی سلول های بنیادی ناحیه بالج فولیکول موی موش استفاده کردیم. پس از تیمار HFSCs با محیط تمایز نورونی، آنالیز Real-time PCR نشان داد که سلول های تیمار شده، ژن های نورونی *MAP2*، *Rbfox3* و *DLK1* را به مقدار زیادی بیان می کنند.

در سال های اخیر، miRNA ها به عنوان رده ی جدیدی از تعیین کننده های دودمان سلولی ظهور کرده اند که نقش مهمی در نمو و تمایز عصبی در طی نورونزیریس دارند. میکروآرناهایی که موجب پیشرفت نورونزیریس می شوند، اغلب درون لوپ های فیدبکی مثبت رونویسی و اپی ژنتیکی واقع شده اند.

miRNA های مختلف ممکن است تکثیر و تمایز سلول های بنیادی اپیدرمی و فولیکول مو را تحت تنظیم قرار دهند (Gangaraju VK et al. ۲۰۰۹). میکروآرنا های پوست صرفاً تمایز سلول های بنیادی پوست را به پیش می برند (Andl et al. ۲۰۰۶).

میکروآرنائی مانند *miR-125b* که به طور معمول بیان بالائی در سلول های بنیادی ناحیه بالچ فولیکول مو و سلول های قاعده ای اپیدرم دارد، باعث افزایش تکثیر و حالت بنیادی این سلول ها می گردد و در واقع بعنوان سرکوب گر تمایز HFSCs عمل می کند (Zhang et al. ۲۰۰۱). در مقابل، سطح *miR-203* در طول تمایز سلول های بنیادی پوست افزایش می یابد (Shenoy and Belloch, ۲۰۱۴a; Schneider et al. ۲۰۱۲)؛ زیرا این میکروآرنا تمایز پوست را با محدود کردن ظرفیت تکثیری سلول های بنیادی پوست به پیش برده و منجر به خروج از سیکل سلولی می شود (Yi et al. ۲۰۰۸) و یا *Tcf3*، فاکتور رونویسی عمل کننده در HFSCs و پیش سازهایشان واقع در غلاف خارجی ریشه بمنظور حفظ وضعیت تمایز نیافتگی خود بعنوان یکی از اهداف *miR-24* می باشد (DasGupta et al. ۱۹۹۹; Merrill et al. ۲۰۰۱).

با این حال، مکانیزم های اساسی کنترل کننده ی اکتساب صحیح و مناسب سرنوشت عصبی در سلول های بنیادی فولیکول مو، هنوز مشخص نیست. ما اینجا، نخستین بار شواهدی را ارائه کردیم دال بر این که *miR-124* یکی از تنظیم کننده های مهم روند نورونزیریس سلول های بنیادی فولیکول مو در محیط آزمایشگاهی است. ما دریافتیم که *miR-124* به صورت افتراقی در سلول های بنیادی فولیکول مو بیان می شود، بطوریکه سطح بیان آن در سلول های با بیان بالای مارکرهای نورونی افزایش می یابد.

سلول های بنیادی با بیان تنظیم کننده های عمده ی تمایز نورونی از قبیل فاکتورهای رونویسی پایه ای پیش عصبی موسوم به *helix-loop-helix (bHLH)*، منجر به القای بیان آبخار ژن های اختصاصی - نورونی و در نتیجه پیشبرد ایجاد هویت عصبی می گردند. بعلاوه، این فاکتور های رونویسی، سایر سرنوشت های سلولی را بمنظور افزایش تمایز نورونی، مهار می کنند. مهار بیان ژن های *bHLH* مانند *Neurogenin* توسط فعال کننده های مسیر سیگنالینگ *Notch*، ممکن است باعث القای گلیوزنریریس در سلول های بنیادی شود (Morrison et al. ۲۰۰۱).

روند اپی ژنتیک (یعنی بیان افتراقی ژن ها) و *miRNA* ها، در تنظیم تصمیم گیری سرنوشت نورونی در سلول های بنیادی عصبی جنینی و *SVZ* (ناحیه تحت بطنی) بالغ دخیل هستند (Pons-Espinal et al. ۲۰۱۷). *miRNA* ها مستلزم مراحل متعدد فرآیند نورونزیریس - تکثیر، خودنوزائی، تعهد عصبی،

مهاجرت، بلوغ و یکپارچگی سلول های بنیادی عصبی - می باشند (Shi et al. ۲۰۰۸، ۲۰۱۰) و در عین حال ، نقش آفرینان مهم اختصاصی بودن زیرمجموعه های نورونی در محیط های *in vivo* هستند که می توانند بعنوان ابزارهای فرعی جهت تغییر تصمیمات سرنوشت سلول نورونی در محیط های *in vitro* ظاهر شوند (Stappert et al. ۲۰۱۵). میکروآرناها ، احتمالاً تنظیم کننده ی تغییر سرنوشت نورونی به گلیالی هستند (He et al. ۲۰۱۵; Zheng et al. ۲۰۱۲b). مثلاً *miR-124* و *miR-128* ، میکروآرناهای اختصاصی دودمان عصبی هستند در حالی که *miR-26* ، *miR-29* و *miR-23* بطور اختصاصی در دودمان های آستروسیتی بیان می شوند (Smirnova et al. ۲۰۰۵).

مشاهدات ما حاکی از آنست که *miR-124* در اکتساب سرنوشت نورونی دخالت دارد. فقدان *miR-124* در سلول های بنیادی فولیکول مو ، منجر به کاهش تمایز نورونی این سلول ها می گردد (Pons-Espinal et al. ۲۰۱۷). ؛ در همین راستا کاهش تمایز نورونی در کشت های ترانسفکت شده با مهارکننده *miR-124* (Stappert et al. ۲۰۱۳) و نیز کاهش بیان مارکرهای اختصاصی- نورونی در صورت مهار *miR-124* با آنتی سنس یا آلیگونوکلوئوتیدهای *OME-RNA-2* (Visvanathan et al. ۲۰۰۷) گزارش شده است. طبق مطالعات ، حذف *miRNA* های وابسته به- *Dicer* در سلول های بنیادی عصبی، موجب تضعیف نوروزنزیس می شود، در صورتی که ممکن است گلیوژنزیس، وابستگی کمتری به *miRNA* ها داشته باشد. میکروآرناهایی از قبیل *miR-124* ، *miR-134* و *miR-370* ، بواسطه سرکوب گلیوژنزیس منجر به حفظ و تقویت تمایز نورونی هیپوکامپ بالغ می شوند (Pons-Espinal et al. ۲۰۱۷). همسو با این یافته ها، بیان بسیار بالای *miR-124* و *miR-128* در سلول های بنیادی عصبی، مانع از تمایز آستروسیتی شده و زمینه را برای تمایز نورونی فراهم می آورد (Krichevsky et al. ۲۰۰۶).

داده های ما اشاره بر این دارد که تنظیم اندک (down-regulation) ژن های *Sox9* و *Ptbp1* بواسطه *miR-124* مستلزم تمایز نورونی می باشد. بر این اساس، Mondanizadeh و همکاران افزایش بیان *miR-124* در طی نوروزنزیس در سلول های بنیادی مزانشیمی مشتق - از چربی را با هدف قرار دادن mRNA ی *Sp1* گزارش کردند (Mondanizadeh et al. ۲۰۱۵). همچنین *miR-124* بیان ژن سلولی از جمله سرکوب فاکتور رونویسی *Sox9* در گنوم سلول های بنیادی SVZ را هدف گیری می کند (Cheng et al. ۲۰۰۹) و میزان PTBP1 پروتئین متصل شونده به-RNA را می کاهد (Makeyev et al. ۲۰۰۷). ما نیز در اینجا شواهدی ارائه دادیم که تنظیم اندک ژن های *Sox9* و *Ptbp1* توسط *miR-124* باعث پیشرفت تمایز دودمان عصبی می شود. بر همین اساس، یکی از مطالعات اخیر نشان داد که *miR-124* ممکن است مانع از تمایز سلولهای گلیال شود (Krichevsky et al. ۲۰۰۶).

ژن *Sox9* ، هدف *miR-124* در انتقال سلول های تکثیری-گذرا^۱ (جمعیتی از سلول های تمایز نیافته در گذار بین سلول های بنیادی و سلول های تمایز نیافته) به مرحله نوروبلاست می باشد. *miR-124* تکثیر نوروبلاست را میانجی گری کرده و منجر به سرکوب سلول های گلیالی در دودمان سلول های بنیادی SVZ می شود. طبق مطالعات قبلی ، افکتور پائین دستی مسیر سیگنالینگ Notch یعنی *Sox9* ، به عنوان هدف فیزیولوژیک *miR-124* شناخته می شود (Cheng et al. ۲۰۰۹). بنابراین، ما دریافتیم که سطح بیان اهداف پائین دستی مسیر Notch از جمله *Sox9* در سلول های بنیادی فولیکول مو پس از ترانسفکشن *miR-124* رو به کاهش گذاشت. این داده ها ممکن است دال بر این باشد که بیان بالای *miR-124* موجب غیرفعال سازی مسیر Notch با هدف گیری *Sox9* می شود. البته ، سایر miRNA ها اعم از *miR-145* ، *miR-495* و *miR-101* نیز بطور سازگاری ، بیان ژن گزارشگر *Sox9* ۳'-UTR را به میزان اندکی مورد تنظیم قرار می دهند (Lee et al., ۲۰۱۴; Yang et al., ۲۰۱۱; Zhang et al., ۲۰۱۲).

فاکتور رونویسی خاموش کننده ی RE-1 موسوم به REST ، تنظیم کننده ی منفی بسیاری از ژن های نورونی در سلول های بنیادی است ؛ و در عین حال *miR-124* ، آنتاگونیست مسیر REST بوده (Kim et al. ۲۰۰۷; Visvanathan et al. ۲۰۱۵) و باعث تغییر پیرایش اختصاصی-نورونی با هدف گیری *Ptbp1* می گردد. تنظیم منفی و اندک *Ptbp1* توسط *miR-124* منجر به تنظیم زیاد و مثبت *Ptbp2* می شود که به نوبه خود مطلوب روند نوروژنیزس می باشد (Makeyev et al. ۲۰۰۷).

بطور جالب توجهی، کارهای قبلی نشان داند که *Sox9* و *Ptbp1* در سلول های در حال تکثیر به میزان زیادی مورد تنظیم واقع شده و نقش بسیار مهمی را در سرکوب پیرایش اختصاصی-نورونی ایفا می کنند (Wang et al. ۲۰۱۶; Makeyev et al. ۲۰۰۷). همسو با مشاهدات اخیر، Makeyev و همکاران نشان دادند که *miR-124* با هدف گیری *Ptbp1* موجب القای تمایز عصبی می شود (Makeyev et al. ۲۰۰۷). بعید به نظر می رسد که مطالعات قبلی ، اینگونه نتیجه گیری کرده باشند که *miR-124* به طور قابل توجهی ، سرنوشت نورونی را در طول تکوین طناب نخاعی تغییر نمی دهد (Cao et al. ۲۰۰۷).

نئو و همکاران نشان دادند که *miR-124* ممکن است تنظیم کننده اصلی بیان *Ezh2* در سلول های کارسینومای جنینی تحت تمایز نورونی باشد (Neo et al. ۲۰۱۴). در مطالعه ی دیگری، Markovtsov و همکاران نشان دادند که *PTBP1* و *PTBP2* می توانند پیرایش اگزون موسوم به جعبه *Src N1* را در محیط *in vitro* سرکوب نمایند (Markovtsov et al. ۲۰۰۰).

یکی از مطالعات اخیر نشان می دهد که *miR-124* باعث پیشرفت تکثیر و تمایز عصبی سلول های بنیادی عصبی از طریق هدف گیری *DACT1* و فعال سازی مسیر سیگنالینگ *Wnt / β-catenin* می شود؛ در

^۱ - Transient- amplifying cells (TACs)

واقع آنها DACT¹ را به عنوان هدف مستقیم *miR-124* تأیید کردند. علاوه بر این، بیان بالای *miR-124* با افزایش بیان β -III tubulin و کاهش بیان GFAP منجر به القای تمایز اختصاصی-نورونی می شود (Jiao et al. 2018). البته در مقابل مطالعه ما، Zhau و همکاران نشان دادند که *miR-124* ممکن است با هدف قرار دادن *Sox2* و *Sox9* در موش های ترانس ژنیک اسکروز جانبی آمیوتروفیک¹، تمایز آستروسیتی را مورد تنظیم قرار دهد (Zhou et al. 2018).

داده های ما همچنین حاکی از این بود که تنظیم منفی و اندک ژن های غیر عصبی *RCOR2*، *CCND1* و *NR2E1* توسط *miR-124* مستلزم تمایز نورونی سلول های بنیادی فولیکول موها می باشد. بر این اساس، موندانی زاده و همکارانش گزارش داده اند که سطح بیان *miR-124* در طی نوروزنیس سلول های بنیادی مزانشیمی مشتق از چربی با هدف قرار دادن mRNA ی *Sp1* افزایش می یابد (Mondanizadeh et al. 2015). مسیر سیگنالینگ Notch نقش تنظیمی بسیار مهمی در خود نوزائی و تمایز سلول های بنیادی / پیش ساز عصبی در جنین و مغز بالغ ایفا می کند (Liu et al. 2010). بعبارت دیگر این مسیر نقش بسیار مهمی در نمو عصبی دارد. فعال سازی مسیر سیگنالینگ Notch به حفظ جمعیت سلول های بنیادی عصبی کمک می کند در حالی که غیرفعال سازی مسیر سیگنالینگ Notch باعث پیشبرد روند تمایز نورونی سلول های بنیادی نورونی می شود (Hitoshi et al. 2002).

در طول تمایز عصبی، لیگاندها و رسپتورهای مسیر سیگنالینگ Notch در سیستم عصبی مرکزی بیان می شود. بیان *DLK1* در سیستم عصبی مرکزی در حال نمو اعم از نورونهای دوپامینرژیک مغز میانی گزارش شده است بعنوان نمونه در مطالعه ای نشان داده شد *DLK1* در تمایز نورونی پیش سازهای مشتق از سلول های بنیادی جنینی انسان و موش را با تعدیل یا تغییر سیگنالینگ Notch با واسطه فاکتور رونویسی *Hes1* و مسیرهای BMP/Smad به پیش می برد؛ بعبارت دیگر *DLK1* باعث افزایش توانائی نوروزنیک و تسریع روند تبدیل سرنوشت نورونی از سلول های نورواکتوردومی متعهد شده می گردد. مطالعه ای نشان داد که ترانسفکشن *miR-124* ی اگزوژن باعث مهار مسیر Notch در سلول های بنیادی نورونی می شود؛ یعنی *miR-124* تکثیر و تمایز سلول های بنیادی عصبی را با غیرفعال سازی مسیر Notch از طریق هدف گیری لیگاندهای این مسیر مانند *DLK1* یا *DLL4* به پیش می برد (Neo et al. 2014). همسو با این مطالعات، نتایج ما نیز حاکی از افزایش بیان ژن *DLK1*، متعاقب القای تمایز نورونی و ترانسفکشن با میمیک *miR-124* در سلول های بنیادی فولیکول مو بود.

¹ - amyotrophic lateral sclerosis transgenic mice

ژن ۱ *CCND* کد کننده ی ۱ *CyclinD* بعنوان تنظیم کننده ی مثبت پیشرفت سیکل سلولی، *NR2E1* بعنوان تنظیم کننده ی بسیار مهم حفظ وضعیت تکثیری و مهار تمایز سلول های بنیادب نرونی می باشد. در یک مطالعه ای نشان داده شد که میکروآرنا ی *let-7b* با اتصال به ناحیه ی ۳' UTR در mRNA ی *TLX* و *cyclinD* باعث سرکوب بیان این دو ژن شده و بعنوان تنظیم کننده بالادستی بسیار مهم تکثیر و تمایز سلول های بنیادی ایفای نقش می کند البته علاوه بر *let-7b* میرنا ی *miR-9* نیز با تشکیل لوپ فیدبکی تنظیمی با *TLX*، هدف گیری و سرکوب بیان آن نهایتاً باعث تنظیم تکثیر و تمایز سلول های بنیادی نرونی می شود؛ البته در طول نوروژنیزس کمپلکس REST و یکی از کوفاکتورهای بسیار مهم آن موسوم به CoREST یا *RCOR2* نیز از طریق یک جایگاه اتصال عملکردی برای *miR-9* در سطح پس از رونویسی تحت تنظیم قرار می گیرد. همسو با مطالعات مشابه انجام شده، نتایج ما نیز نشان داد ژن های *RCOR2*، *CCND1* و *NR2E1* بعنوان ژن های هدف *miR-124* در روند تمایز نرونی سلولهای بنیادی فولیکول مو ها بوده و بواسطه سرکوب آنها منجر به پیشرفت نوروژنیزس می گردد (Zhao et al. ۲۰۱۰).

MAP2 بعنوان یکی از پروتئین های اسکلت سلولی اختصاصی نرونی است که عمدتاً در نرون ها و به طور عمده در زوائد دندریتی نرون ها بیان شده و با تثبیت میکروتوبول ها، طول دندریت ها را تحت تأثیر قرار می دهند. مطالعات حاکی از آن است که *MAP2* در فرآیندهای مهم بلوغ نرون ها اعم از گسترش و انشعاب نوریت ها و همچنین برای متوقف کردن تقسیم سلولی از اهمیت بالائی برخوردار است. از این رو *MAP2* بعنوان مارکر فنوتیپ نرونی مورد استفاده قرار می گیرد (Soltani et al. ۲۰۰۵).

پروتئین NeuN و یا *Rbfox3* در هسته و سیتوپلاسم اغلب نرون های سیستم عصبی مرکزی پستانداران یافت شده و بعنوان مارکر نرونی در مطالعات مربوط به تمایز نرونی مورد استفاده قرار می گیرد. این پروتئین هیچ گاه در سلول های گلیال یافت نشده است، که خود دال بر این است که NeuN یکی از مارکر اختصاصی نرونی می باشد (Mullen et al. ۱۹۹۲). لذا در این تحقیق همانطور که انتظار می رفت ژن های *Map2* و *Rbfox3* متعاقب تمایز نرونی و سپس ترانسفکشن با *miR-124* بعد از تمایز عصبی سلول های بنیادی فولیکول مو بعنوان ژن های کد کننده ی مارکرهای اختصاصی نرونی سطح بیان بالاتری را ارائه کردند.

دو میکروآرنا ی *miR-124* و *let-7*، تنظیم کننده های مهم روند نوروژنیزس بالغ هستند (Cheng et al., ۲۰۰۹). گر چه مطالعه ی ما به وضوح اثرات سینرژیک *miR-124* و *let-7b* را در سرنوشت نرونی نشان نداد، ولی بیان بالای *miR-124* و *let-7b* را در سلول های بنیادی فولیکول مو مشاهده کردیم. ما نشان دادیم *miR-124*، تمایز عصبی سلول های بنیادی فولیکول موی تحریک شده توسط BDNF، ATRA و *miR-* ۱۲۴ mimic ۱۲۴ را می افزاید. از اینرو، ما نتیجه می گیریم *miR-124* مستلزم تمایز نرونی است، اما سایر miRNA ها از قبیل *let-7b* نیز ممکن است نقش مهمی در تمایز عصبی داشته باشند. همسو با این مطالعه،

سلول هایی که در معرض تمایز عصبی قرار می گیرند، بطور چشمگیری سطوح بالائی از *let-7b*، *miR-124* و *miR-9* را بیان می کنند (Kawahara et al., ۲۰۱۲; Stappert et al., ۲۰۱۵).

بطور معمول *miR-124* و *miR-9* روند نورونیزیس را از طریق کمپلکس تغییر کروماتین REST و CoREST مورد تنظیم قرار می دهند. (Ho and Crabtree, ۲۰۱۰). به طور مشابهی، Xue و همکاران نشان دادند که *miR-124* و *miR-9* بصورت سینرژیکی (هم افزائی) باعث پیشرفت تمایز نورونی و منشعب شدن دندریتی از طریق مسیر β AKT/GSK3 با سرکوب بیان Rap2a می شوند (Xue et al., ۲۰۱۶). بطور غیرمنتظرانه ای، ما اینجا نشان دادیم که *miR-9* در طول تمایز عصبی به میزان زیادی بیان نشد. در حالی که طی مطالعه ای ترانسفکشن *miR-9* توسط *In utero electroporation* به NSC های ناحیه بطنی در مغز جنین موش منجر به تمایز زودرس نورونی شد (Zhao et al., ۲۰۰۹) و یا مطالعه ی دیگری نیز نشان داد این میکروآرنا علاوه بر NSC ها در سلول های بنیادی جنینی موش نیز با هدف گیری *sirtuin1* باعث پیشرفت تمایز نورونی می شود (Saunders et al., ۲۰۱۱). بنابراین مطالعات بعدی مستلزم تعیین این موضوع خواهد بود که آیا ممکن است سایر miRNA ها نیز تمایز نورونی سلول های بنیادی فولیکول مو نقش داشته باشند یا نه. اثرات *miR-124* روی اهداف مشخص خود از قبیل *Sox9*، *Ptbp1*، *REST/SCP1*، *LAMC1* و *ITGβ1* ممکن است نشانگر نقش این میکروآرنا در تعیین هویت نورونی (عصبی) سلول ها باشد. (Farrell et al., ۲۰۱۱).

نه تنها *let-7* بلکه *miR-124* نیز در مورفوژنیزیس نورونی در مغز در حال نمو مشارکت می نماید (Follert et al., ۲۰۰۷; Wulczyn et al., ۲۰۱۲; Kawahara et al., ۲۰۱۴; et al., ۲۰۱۴). در طول نورونیزیس جنینی در سیستم عصبی مرکزی، نوروها سطح بالایی از *miR-124* را بیان می کنند (Makeyev et al., ۲۰۰۷). در واقع، *let-7* و *Lin28* در یک چرخه خود تنظیمی منفی در طول نورونیزیس سلول های بنیادی جنینی شرکت می کنند (Rybak et al., ۲۰۰۸). بیان بسیار بالای *let-7b* در NSC ها با کاهش روند تکثیر منجر به افزایش تمایز نورونی و آستروگلیالی می گردد (Zhao et al., ۲۰۱۰)؛ بعلاوه *In utero electroporation* این میکروآرنا به NSC های جنینی منجر به کاهش پیشرفت سیکل سلولی گردید (Zhao et al., ۲۰۰۹).

لذا میکروآرنائی از قبیل *miR-124* و *let-7* در طول تمایز عصبی به میزان بالائی بیان شده و روند خروج از سیکل سلولی را با مهار *cyclinD1*، *BAFΔ3A*، *Ptbp1* و *Sox9* افزایش می دهند (Shenoy and Billewicz, ۲۰۱۴b). این نتایج دلالت بر این دارند که *miR-124* و *let-7* تنظیم کننده ی نورونیزیس بالغ در مغز بالغ و همچنین در طول امبریونیزیس (جنین زائی) می باشند.

وجود انواع مختلفی از سلول‌های بنیادی با پتانسیل‌های تمایزی متفاوت مانند سلول‌های بنیادی سنج عصبی-اپیدرمی^۱ (Epi-NCSCs) (Hu et al., ۲۰۰۶; Yu et al., ۲۰۱۰)، نستین مثبت (Amoh et al., ۲۰۰۵b) و سلول‌های CD۳۴ مثبت (Najafzadeh et al., ۲۰۱۵c) در فولیکول‌های مو به اثبات رسیده است. از طرف دیگر، پتانسیل تمایزی سلول‌های بنیادی فولیکول مو، وابستگی زیادی به فاکتورهای رشد اگزوزن دارد. لذا این سلول‌های بنیادی می‌توانند متعاقب تیمار با *neuregulin-۱* یا بر روی پیوند به عصب سیاتیک قطع شده و آسیب طناب نخاعی می‌توانند به سلول‌های شوآن تبدیل شوند (Amoh et al., ۲۰۰۴; Sieber-Blum et al., ۲۰۱۰; Sieber-Blum, ۲۰۰۸; Amoh et al., ۲۰۰۵a). در طبق مطالعه دیگری سلول‌های بنیادی فولیکول مو، الیگودندروسیت‌ها و سلول‌های شبه-نورونی را پس از پیوند به طناب نخاعی قطع شده تولید می‌کنند (Najafzadeh et al., ۲۰۱۳). در مجموع، این مطالعات نشان دهنده ی پتانسیل سلول‌های بنیادی فولیکول مو برای بازسازی سلول‌های سیستم عصبی مرکزی و محیطی است (Najafzadeh et al., ۲۰۱۵a).

۵-۲- نتیجه گیری

ما نتیجه گرفتیم که *miR-۱۲۴-۳p* بعنوان یکی از میکروآرناهای عصبی مؤثر در روند نوروزنیس، ممکن است توانسته باشد با هدف گیری مستقیم ژن‌های *Sox ۹* و *Ptbp ۱* و غیرمستقیم ژن‌های غیرعصبی *CCND ۱*، *RCOR ۲* و *NR ۲E ۱* به نوبه خود باعث پیشرفت تمایز عصبی سلول‌های بنیادی فولیکول مو در محیط *in vitro* شود. در آینده، ارزیابی نقش سایر miRNA ها مانند *let- ۷b* و *miR- ۹* در تمایز سلول‌های بنیادی فولیکول مو به سلول‌های عصبی (نورونی و گلیالی) مستلزم مطالعات اختصاصی *in vitro gain and loss of function* خواهد بود. از نتایج به دست آمده از این تحقیق می‌توان جهت بهینه سازی پروتکل‌های تمایز عصبی HFSCs در شرایط آزمایشگاهی استفاده کرد.

۵-۳- محدودیت‌ها

- دیر رسیدن مواد آزمایشگاهی موردنیاز
- آلودگی احتمالی محیط‌های کشت سلول
- عدم وجود بودجه‌ی کافی جهت انجام تکنیک‌های مکمل دیگر از جمله فلوسایتومتری

^۱ - Epidermal-Neural Crest Stem Cells (Epi-NCSCs)

۴-۵- پیشنهادات

- بررسی نقش سایر میکروآرناهای عصبی در تمایز عصبی HFSCs در محیط های آزمایشگاهی
- بررسی اثرات هر سه میکروآرنای عصبی *miR-124*، *miR-9* و *let-7b* در تمایز عصبی HFSCs در صورت ترانسفکشن همزمان هر سه میکروآرنا به درون سلول ها
- بررسی کارآمدی پروتکل تمایزی به کار رفته و نیز تأیید هویت سلول های عصبی حاصل از القای تمایز نورونی در HFSCs با پیاده سازی و به کار بردن آنها در حیوانات آزمایشگاهی با مدلینگ آسیب های نخاعی یا بیماری های نورودژنراتیو
- ارزیابی کارائی ترانسفکشن میکروآرنا با اندازه گیری دوگانه ی *fluorescence plate reader* برای *Green Fluorescent Protein* (GFP) و *Hoechst 33342 fluorescence* بعنوان شاخص تراکم سلولی
- بررسی میزان مرگ و میر سلولی متعاقب ترانسفکشن *mimic* و *inhibitor* میکروآرنا به درون سلول های بنیادی تحت کشت بدلیل سمیت مواد ترانسفکت شده توسط فلوسایتومتری

Abrahams, B.S., Kwok, M.C., Trinh, E., Budaghzadeh, S., Hossain, S.M. & Simpson, E.M. (٢٠٠٥) Pathological aggression in 'fierce' mice corrected by human nuclear receptor γ 1. J. Neurosci., ٢٥, ٦٢٦٣-٦٢٧٠.

Åkerblom M, Jakobsson J. MicroRNAs as neuronal fate determinants. The Neuroscientist. ٢٠١٤ Jun;٢٠(٣):٢٣٥-٤٢.

Alonso L, Fuchs E. The hair cycle. Journal of cell science. ٢٠٠٦ Feb ١;١١٩(٣):٣٩١-٣.

Ambasudhan R, Talantova M, Coleman R, Yuan X, Zhu S, Lipton SA, Ding S. Direct reprogramming of adult human fibroblasts to functional neurons under defined conditions. Cell stem cell. ٢٠١١ Aug ٥;٩(٢):١١٣-٨.

Amoh Y, Li L, Campillo R, Kawahara K, Katsuoka K, Penman S, Hoffman RM. ٢٠٠٥a. Implanted hair follicle stem cells form Schwann cells that support repair of severed peripheral nerves. Proceedings of the National Academy of Sciences ١٠٢(٤٩):١٧٧٣٤-١٧٧٣٨.

Amoh Y, Li L, Katsuoka K, Penman S, Hoffman RM. ٢٠٠٥b. Multipotent nestin-positive, keratin-negative hair-follicle bulge stem cells can form neurons. Proceedings of the National Academy of Sciences ١٠٢(١٥):٥٥٣٠-٥٥٣٤.

Amoh Y, Li L, Katsuoka K, Penman S, Hoffman RM. ٢٠٠٥c. Multipotent nestin-positive, keratin-negative hair-follicle bulge stem cells can form neurons. Proceedings of the National academy

Amoh Y, Li L, Katsuoka K, Hoffman RM. ٢٠٠٨. Multipotent hair follicle stem cells promote repair of spinal cord injury and recovery of walking function. Cell cycle ٧(١٢):١٨٦٥-١٨٦٩.

Amoh Y, Li L, Yang M, Moossa AR, Katsuoka K, Penman S, Hoffman RM. Nascent blood vessels in the skin arise from nestin-expressing hair-follicle cells. Proceedings of the National Academy of Sciences. ٢٠٠٤ Sep ٧;١٠١(٣٦):١٣٢٩١-٥.

Amoh Y, Kanoh M, Niiyama S, Kawahara K, Satoh Y, Katsuoka K, Hoffman RM. Human and mouse hair follicles contain both multipotent and monopotent stem cells. Cell Cycle. ٢٠٠٩ Jan ١;٨(١):١٧٦-٧.

Andl T, Botchkareva NV. Micro RNA s (miRNAs) in the control of HF development and cycling: the next frontiers in hair research. Experimental dermatology. ٢٠١٥ Nov;٢٤(١١):٨٢١-٦.

Andl T, Murchison EP, Liu F, Zhang Y, Yunta-Gonzalez M, Tobias JW, Andl CD, Seykora JT, Hannon GJ, Millar SE. The miRNA-processing enzyme dicer is essential for the morphogenesis and maintenance of hair follicles. Current Biology. ٢٠٠٦ May ٢٣;١٦(١٠):١٠٤١-٩.

Amelio I, Lena AM, Viticchiè G, Shalom-Feuerstein R, Terrinoni A, Dinsdale D, Russo G, Fortunato C, Bonanno E, Spagnoli LG, Aberdam D. miR-٢٤ triggers epidermal differentiation by controlling actin adhesion and cell migration. J Cell Biol. ٢٠١٢ Oct ١٥;١٩٩(٢):٣٤٧-٦٣.

Ahmed MI, Alam M, Emelianov VU, Poterlowicz K, Patel A, Sharov AA, Mardaryev AN, Botchkareva NV. MicroRNA-٢١٤ controls skin and hair follicle development by modulating the activity of the Wnt pathway. J Cell Biol. ٢٠١٤ Nov ٢٤;٢٠٧(٤):٥٤٩-٦٧.

- Arvanitis DN, Jungas T, Behar A, Davy A. 2010. Ephrin-B¹ reverse signaling controls a post-transcriptional feedback mechanism via miR-125. *Mol Cell Biol* 30: 2008-2017.
- Baladrón V, Ruiz-Hidalgo MJ, Nueda ML, Díaz-Guerra MJ, García-Ramírez JJ, Bonvini E, Gubina E, Laborda J. dlk acts as a negative regulator of Notch¹ activation through interactions with specific EGF-like repeats. *Experimental cell research*. 2008 Feb 10;303(2):343-59.
- Baum CM, Weissman IL, Tsukamoto AS, Buckle AM, Peault B. Isolation of a candidate human hematopoietic stem-cell population. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1992 Apr 1;89(7):2804-8.
- Bhuvanagiri M, Schlitter AM, Hentze MW, Kulozik AE. NMD: RNA biology meets human genetic medicine. *Biochemical Journal*. 2010 Sep 10;430(3):370-77.
- Black DL. Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing. *Annual review of biochemistry*. 2003 Jul;72(1):291-336.
- Blakaj A, Lin H. Piecing together the mosaic of early mammalian development through microRNAs. *Journal of Biological Chemistry*. 2008 Apr 11;283(15):9000-8.
- Blanpain C, Lowry WE, Geoghegan A, Polak L, Fuchs E. Self-renewal, multipotency, and the existence of two cell populations within an epithelial stem cell niche. *Cell*. 2004 Sep 3;118(5):630-48.
- Blanpain C, Fuchs E. Plasticity of epithelial stem cells in tissue regeneration. *Science*. 2014 Jun 13;344(6189):1242-48.
- Bogdanović O, Veenstra GJ. DNA methylation and methyl-CpG binding proteins: developmental requirements and function. *Chromosoma*. 2009 Oct 1;118(5):549-60.
- Bolós V, Grego-Bessa J, de la Pompa JL. Notch signaling in development and cancer. *Endocrine reviews*. 2007 Apr 4;28(3):339-63.
- Botchkarev VA, Kishimoto J. Molecular control of epithelial–mesenchymal interactions during hair follicle cycling. In *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings* 2003 Jun 1 (Vol. 8, No. 1, pp. 46-50). Elsevier.
- Brizzi MF, Tarone G, Defilippi P. Extracellular matrix, integrins, and growth factors as tailors of the stem cell niche. *Current opinion in cell biology*. 2012 Oct 1;24(5):640-51.
- Bruno IG, Karam R, Huang L, Bhardwaj A, Lou CH, Shum EY, Song HW, Corbett MA, Gifford WD, Gecz J, Pfaff SL. Identification of a microRNA that activates gene expression by repressing nonsense-mediated RNA decay. *Molecular cell*. 2011 May 20;42(4):500-10.
- Cao X, Pfaff SL, Gage FH. 2007. A functional study of miR-125 in the developing neural tube. *Genes & development* 21(5):531-536.
- Cassimeris L, Spittle C. Regulation of microtubule-associated proteins. In *International review of cytology* 2001 Jan 1 (Vol. 210, pp. 163-226). Academic Press.
- Chen CZ, Li L, Lodish HF, Bartel DP. MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *science*. 2004 Jan 2;303(5604):83-6.

- Chen X, Ba Y, Ma L, Cai X, Yin Y, Wang K, Guo J, Zhang Y, Chen J, Guo X, Li Q. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell research*. 2008 Oct;18(10):997.
- Cheng L-C, Pastrana E, Tavazoie M, Doetsch F. 2009. miR-124 regulates adult neurogenesis in the subventricular zone stem cell niche. *Nature neuroscience* 12(8):399.
- Chernova OF. Skin derivatives in vertebrate ontogeny and phylogeny. *Biology Bulletin*, 2009 – Springer
- Choi YJ, Kim N, Chang H, Lee HS, Park SM, Park JH, Shin CM, Kim JM, Kim JS, Lee DH, Jung HC. Helicobacter pylori-induced epithelial-mesenchymal transition, a potential role of gastric cancer initiation and an emergence of stem cells. *Carcinogenesis*. 2010 Mar 16;31(5):602-63.
- Christophersen NS, Grønborg M, Petersen TN, Fjord-Larsen L, Jørgensen JR, Juliusson B, Blom N, Rosenblad C, Brundin P. Midbrain expression of Delta-like 1 homologue is regulated by GDNF and is associated with dopaminergic differentiation. *Experimental neurology*. 2007 Apr 1;204(2):291-801.
- Conaco C, Otto S, Han JJ, Mandel G. Reciprocal actions of REST and a microRNA promote neuronal identity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006 Feb 14;103(7):2422-7.
- Coqueret O. Linking cyclins to transcriptional control. *Gene*. 2002 Oct 16;299(1-2):30-50.
- Coolen M, Katz S, Bally-Cuif L. miR-9: a versatile regulator of neurogenesis. *Frontiers in cellular neuroscience*. 2013 Nov 20;7:220.
- Cotsarelis G, Sun TT, Lavker RM. 1990. Label-retaining cells reside in the bulge area of pilosebaceous unit: implications for follicular stem cells, hair cycle, and skin carcinogenesis. *Cell* 61(7):1329-1337
- Cotsarelis G. Epithelial stem cells: a folliculocentric view. *Journal of Investigative Dermatology*. 2006 Jul 1;126(7):1496-68.
- da Rocha ST, Tevendale M, Knowles E, Takada S, Watkins M, Ferguson-Smith AC. Restricted co-expression of Dlk1 and the reciprocally imprinted non-coding RNA, Gtl2: implications for cis-acting control. *Developmental biology*. 2007 Jun 10;306(2):810-23.
- DasGupta R, Fuchs E. Multiple roles for activated LEF/TCF transcription complexes during hair follicle development and differentiation. *Development*. 1999 Oct 10;126(20):4507-68.
- Dastan M, Najafzadeh N, Abedelahi A, Sarvi M, Niapour A. Human platelet lysate versus minoxidil stimulates hair growth by activating anagen promoting signaling pathways. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*. 2016 Dec;84:979-86. PubMed PMID: 27764761
- Davis TH, Cuellar TL, Koch SM, Barker AJ, Harfe BD, McManus MT, Ullian EM. Conditional loss of Dicer disrupts cellular and tissue morphogenesis in the cortex and hippocampus. *Journal of Neuroscience*. 2008 Apr 23;28(17):4322-30.

Delcroix GJ-R, Curtis KM, Schiller PC, Montero-Menei CN. EGF and bFGF pre-treatment enhances neural specification and the response to neuronal commitment of MIAMI cells. *Differentiation*. 2010;(4-5):213-27

Deo M, Yu JY, Chung KH, Tippens M, Turner DL. Detection of mammalian microRNA expression by in situ hybridization with RNA oligonucleotides. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists*. 2006 Sep;230(9):2038-48.

Dill H, Linder B, Fehr A, Fischer U. Intronic miR-21b controls neuronal differentiation by repressing its host transcript, ctdsp1. *Genes & development*. 2012 Jan 1;26(1):20-30.

Dlugosz A. The Hedgehog and the hair follicle: a growing relationship. *The Journal of clinical investigation*. 1999 Oct 1;104(9):1201-3.

Dong, Q., Meng, P., Wang, T., Qin, W., Qin, W., Wang, F., ... & Wang, H. (2010). MicroRNA let-7a inhibits proliferation of human prostate cancer cells in vitro and in vivo by targeting E2F1 and CCND1. *PLoS one*, 5(1), e1147.

El Seady R, Huisman MA, Lowik CW, Frijns JH. 2008a. Uncomplicated differentiation of stem cells into bipolar neurons and myelinating glia. *Biochem Biophys Res Commun* 376(2):308-362.

El Seady R, Huisman MA, Löwik CW, Frijns JH. 2008b. Uncomplicated differentiation of stem cells into bipolar neurons and myelinating glia. *Biochemical and biophysical research communications* 376(2):308-362

Esmailzade B, Nobakht M, Joghataei MT, Roshandel NR, Rasouli H, Kuchaksaraei AS, Hosseini SM, Najafzade N, Asalgoo S, Hejazian LB, Ghoroghi FM. Delivery of epidermal neural crest stem cells (EPI-NCSC) to hippocamp in Alzheimer's disease rat model. *Iranian biomedical journal*. 2012 Jan;16(1):1.

Falix, F.A., Aronson, D.C., Lamers, W.H., Gaemers, I.C., 2012. Possible roles of DLK1 in the Notch pathway during development and disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1822, 988-990

Fang M, Wang J, Zhang X, Geng Y, Hu Z, Rudd JA, Ling S, Chen W, Han S. The miR-125 regulates the expression of BACE1/ β -secretase correlated with cell death in Alzheimer's disease. *Toxicology letters*. 2012 Feb 20;209(1):94-100.

Farrell BC, Power EM, Mc Dermott KW. 2011. Developmentally regulated expression of Sox9 and microRNAs miR-125a and miR-125b in neuroepithelial stem cells in the developing spinal cord. *International journal of developmental neuroscience* 29(1):31-36.

Follert P, Cremer H, Beclin C. 2014. MicroRNAs in brain development and function: a matter of flexibility and stability. *Frontiers in molecular neuroscience* 8:0.

Friedman RC, Farh KK, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome research*. 2009 Jan 1;19(1):92-100.

Frye C, Bo E, Calamandrei G, Calza L, Dessì-Fulgheri F, Fernández M, Fusani L, Kah O, Kajta M, Le Page Y, Patisaul HB. Endocrine disruptors: a review of some sources, effects, and mechanisms of actions on behaviour and neuroendocrine systems. *Journal of neuroendocrinology*. 2012 Jan;24(1):144-59.

Fuchs E. Skin stem cells: rising to the surface. *The Journal of cell biology*. 2008 Jan 28;180(2):273-84.

Fuchs E. Epithelial skin biology: three decades of developmental biology, a hundred questions answered and a thousand new ones to address. In *Current topics in developmental biology* 2016 Jan 1 (Vol. 116, pp. 307-374). Academic Press.

Gage FH. Mammalian neural stem cells. *Science*. 2000 Feb 20;287(5457):1433-8.

Gangaraju VK, Lin H. MicroRNAs: key regulators of stem cells. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2009;10(2):116

Georgantas RW, Hildreth R, Morisot S, Alder J, Liu CG, Heimfeld S, Calin GA, Croce CM, Civin CI. CD34+ hematopoietic stem-progenitor cell microRNA expression and function: a circuit diagram of differentiation control. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2007 Feb 20;104(8):2700-5

Ghoroghi FM, Hejazian LB, Esmailzade B, Dodel M, Roudbari M, Nobakht M. 2013. Evaluation of the effect of NT-3 and biodegradable poly-L-lactic acid nanofiber scaffolds on differentiation of rat hair follicle stem cells into neural cells in vitro. *Journal of Molecular Neuroscience* 51(2):318-327

Gilbert SF, Opitz JM, Raff RA. Resynthesizing evolutionary and developmental biology. *Developmental biology*. 1996 Feb 1;173(2):307-72

Glaser T, Pollard SM, Smith A, Brüstle O. Tripotential differentiation of adherently expandable neural stem (NS) cells. *PloS one*. 2007 Mar 14;2(3):e298.

Gokey NG, Srinivasan R, Lopez-Anido C, Krueger C, Svaren J. Developmental regulation of microRNA expression in Schwann cells. *Molecular and cellular biology*. 2012 Jan 10;32(2):508-18.

Gray H. *Anatomy of the human body*. Lea & Febiger; 1978.

Hahn P, Scanlan E. Gene delivery into mammalian cells: an overview on existing approaches employed in vitro and in vivo. In *Nucleic Acid Transfection* 2010 (pp. 1-13). Springer, Berlin, Heidelberg.

Ha M, Kim VN. Regulation of microRNA biogenesis. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2014 Aug;15(8):509.

Harada T, Harada C, Mitamura Y, Akazawa C, Ohtsuka K, Ohno S, Takeuchi S, Wada K (2002) Neurotrophic factor receptors in epiretinal membranes after human diabetic retinopathy. *Diabetes Care* 25:1060-1065.

Haynesworth SE, Barer MA, Caplan AI. Cell surface antigens on human marrow-derived mesenchymal cells are detected by monoclonal antibodies. *Bone*. 1992 Jan 1;13(1):69-80.

He J, Zhang JF, Yi C, Lv Q, Xie WD, Li JN, Wan G, Cui K, Kung HF, Yang J, Yang BB. miRNA-mediated functional changes through co-regulating function related genes. *PloS one*. 2012 Oct 22;7(10):e43008.

Hendrickson JE, Hillyer CD. Noninfectious serious hazards of transfusion. *Anesthesia & Analgesia*. 2009 Mar 1;108(3):709-19.

Herranz H, Cohen SM. MicroRNAs and gene regulatory networks: managing the impact of noise in biological systems. *Genes & development*. 2010 Jul 1;24(13):1339-44.

Heyer MP, Pani AK, Smeyne RJ, Kenny PJ, Feng G. Normal midbrain dopaminergic neuron development and function in miR-133b mutant mice. *Journal of Neuroscience*. 2012 Aug 8;32(32):10887-94.

Hitoshi S, Alexson T, Tropepe V, Donoviel D, Elia AJ, Nye JS, Conlon RA, Mak TW, Bernstein A, Van Der Kooy D. Notch pathway molecules are essential for the maintenance, but not the generation, of mammalian neural stem cells. *Genes & development*. 2002 Apr 1;16(7):847-58.

Hoffman RM. The pluripotency of hair follicle stem cells. *Cell cycle*. 2006 Feb 1;5(3):232-3.

Ho L, Crabtree GR. 2010. Chromatin remodelling during development. *Nature* 463(7280):474.

Hsu YC, Li L, Fuchs E. Transit-amplifying cells orchestrate stem cell activity and tissue regeneration. *Cell*. 2012 May 4;150(4):930-41.

Huang HI, Chen SK, Wang RY, Shen CR, Cheng YC. Human foreskin fibroblast-like stromal cells can differentiate into functional hepatocytic cells. *Cell biology international*. 2013 Dec;37(12):1308-14.

Huang X, Huang M, Kong L, Li Y. miR-372 suppresses tumour proliferation and invasion by targeting IGF 2 BP 1 in renal cell carcinoma. *Cell proliferation*. 2010 Oct;43(10):933-9.

Hu YF, Zhang ZJ, Sieber-Blum M. 2006. An epidermal neural crest stem cell (EPI-NCSC) molecular signature. *Stem cells* 24(12):2692-2702.

Inoue A, Arima N, Ishiguro J, Prestwich GD, Arai H, Aoki J. LPA-producing enzyme PLA2 α regulates hair follicle development by modulating EGFR signalling. *The EMBO journal*. 2011 Oct 19;30(20):4248-60.

Ishibashi M, Moriyoshi K, Sasai Y, Shiota K, Nakanishi S, Kageyama R. Persistent expression of helix-loop-helix factor HES-1 prevents mammalian neural differentiation in the central nervous system. *The EMBO journal*. 1994 Apr;13(4):1799-800.

Ivey KN, Srivastava D. microRNAs as developmental regulators. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2010 Jul 1;2(7):a008144.

Izant JG, McIntosh JR. Microtubule-associated proteins: a monoclonal antibody to MAP2 binds to differentiated neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1980 Aug 1;77(8):4741-5.

Jiao F, Wang Q, Zhang P, Bu L, Yan J, Tian B, 2014. Expression signatures of long non-coding RNA in the substantia nigra of pre-symptomatic mouse model of Parkinson's disease. *Behav. Brain. Res.* 231, 123-130.

Jiao S, Liu Y, Yao Y, Teng J. 2014. miR-124 promotes proliferation and neural differentiation of neural stem cells through targeting DACT1 and activating Wnt/ β -catenin pathways. *Molecular and cellular biochemistry*: 1-10.

Johnson CD, Esquela-Kerscher A, Stefani G, Byrom M, Kelnar K, Ovcharenko D, Wilson M, Wang X, Shelton J, Shingara J, Chin L. The let- γ microRNA represses cell proliferation pathways in human cells. *Cancer research*. 2007 Aug 10;67(16):4713-22

JOHNSON G. V. & JOPE.R. S. (1992). The role of microtubule-associated protein γ (MAP γ) in neuronal growth, plasticity and degeneration. *Journal of Neuroscience Research* 33, 505-512.

Johnson J, Canning J, Kaneko T, Pru JK, Tilly JL. Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. *Nature*. 2004 Mar;428(7009):140-.

Jonathan A.Nowak LisaPolak H. AmaliaPasolli ElaineFuchs, Hair Follicle Stem Cells Are Specified and Function in Early Skin Morphogenesis, Volume 3, Issue 1, 3 July 2008, Pages 33-43

Junqueira LC, Carneiro J. Aparelho reprodutor masculino. JUNQUEIRA, LC; CARNEIRO, J. *Histologia Básica*. 2000

Kageyama R, Ohtsuka T, Kobayashi T. Roles of Hes genes in neural development. *Development, growth & differentiation*. 2008 Jun;50:S97-103.

Kanellopoulou C, Muljo SA, Kung AL, Ganesan S, Drapkin R, Jenuwein T, Livingston DM, Rajewsky K. Dicer-deficient mouse embryonic stem cells are defective in differentiation and centromeric silencing. *Genes & development*. 2000 Feb 10;14(2):489-501.

Kawahara H, Imai T, Okano H. MicroRNAs in neural stem cells and neurogenesis. *Frontiers in neuroscience*. 2012 Mar 12;6:30.

Kim J, Inoue K, Ishii J, Vanti WB, Voronov SV, Murchison E, Hannon G and Abeliovich A (2007) A MicroRNA feedback circuit in midbrain dopamine neurons. *Science* 317(5842):1220-1224

Kim J, Krichevsky A, Grad Y, Hayes GD, Kosik KS, Church GM, Ruvkun G. Identification of many microRNAs that copurify with polyribosomes in mammalian neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2004 Jan 6;101(1):376-80.

Kim HJ, Denli AM, Wright R, Baul TD, Clemenson GD, Morcos AS, Zhao C, Schafer ST, Gage FH, Kagalwala MN. 2010. REST Regulates Non-Cell-Autonomous Neuronal Differentiation and Maturation of Neural Progenitor Cells via Secretogranin II. *Journal of Neuroscience* 30(44):14872-14884.

Kim VN, Nam JW. Genomics of microRNA. *TRENDS in Genetics*. 2006 Mar 1;22(3):160-73.

Kobayashi K, Rochat A, Barrandon Y. 1993. Segregation of keratinocyte colony-forming cells in the bulge of the rat vibrissa. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90(10):7391-7395.

Korzhevsky, D.E., Sukhorukova, E.G., and Grigoriev, I.P., Distribution of iron in microanatomical structures of human brain black substances, *Korsakov Zh. Nevrol. Psychiat.*, 2013, vol. 113, no. 6, pp. 70-73.

- Krichevsky AM, King KS, Donahue CP, Khrapko K, Kosik KS. A microRNA array reveals extensive regulation of microRNAs during brain development. *Rna*. 2003 Oct 1;9(10):1274-81.
- Krichevsky AM, Sonntag KC, Isacson O, Kosik KS. 2006. Specific microRNAs modulate embryonic stem cell-derived neurogenesis. *Stem cells* 24(8):1807-17.
- Kumar MS, Erkeland SJ, Pester RE, Chen CY, Ebert MS, Sharp PA, Jacks T. Suppression of non-small cell lung tumor development by the let-7 microRNA family. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2008 Mar 11;105(10):3903-8.
- Lagos-Quintana M, Rauhut R, Yalcin A, Meyer J, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Current biology*. 2002 Apr 23;12(9):735-9.
- Lang MF, Yang S, Zhao C, Sun G, Murai K, Wu X, Wang J, Gao H, Brown CE, Liu X, Zhou J. Genome-wide profiling identified a set of miRNAs that are differentially expressed in glioblastoma stem cells and normal neural stem cells. *PloS one*. 2012 Apr 20;7(4):e36248.
- Lang MF, Shi Y. Dynamic roles of microRNAs in neurogenesis. *Frontiers in neuroscience*. 2012 May 21;6:71.
- Lau, P., and Hudson, L. D. (2010). MicroRNAs in neural cell differentiation. *Brain Res*. 1338, 14-19.
- Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *cell*. 1993 Dec 3;75(6):1037-42.
- Lee S, Yoon DS, Paik S, Lee K-M, Jang Y, Lee JW. 2014. microRNA-490 inhibits chondrogenic differentiation in human mesenchymal stem cells by targeting Sox9. *Stem cells and development* 23(10):1798-1808.
- Le MT, Shyh-Chang N, Khaw SL, Chin L, Teh C, Tay J, O'Day E, Korzh V, Yang H, Lal A, Lieberman J. Conserved regulation of p53 network dosage by microRNA-120b occurs through evolving miRNA-target gene pairs. *PLoS genetics*. 2011 Sep 10;7(9):e1002242.
- Lenoir MC, Bernard BA, Pautrat G, Darmon M, Shroot B. Outer root sheath cells of human hair follicle are able to regenerate a fully differentiated epidermis in vitro. *Developmental biology*. 1988 Dec 1;130(2):610-20.
- Lewis BP, Shih IH, Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Burge CB. Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell*. 2003 Dec 26;115(7):945-56.
- Lewis PA, Miall RC. Brain activation patterns during measurement of sub-and supra-second intervals. *Neuropsychologia*. 2003 Jan 1;41(12):1583-92.
- Li HS, Wang D, Shen Q, Schonemann MD, Gorski JA, Jones KR, Temple S, Jan LY, Jan YN. Inactivation of Numb and Numlike in embryonic dorsal forebrain impairs neurogenesis and disrupts cortical morphogenesis. *Neuron*. 2003 Dec 18;40(6):1105-18.
- Li L, Fukunaga-Kalabis M, Yu H, Xu X, Kong J, Lee JT, Herlyn M. Human dermal stem cells differentiate into functional epidermal melanocytes. *Journal of Cell Science*. 2010 Jan 1;123:1098.

- Li X, Jin P. Roles of small regulatory RNAs in determining neuronal identity. *Nature Reviews Neuroscience*. 2010 May;11(5):329.
- Li X, Zhang Y, Kang H, Liu W, Liu P, Zhang J, Harris SE, Wu D. Sclerostin binds to LRP6 and antagonizes canonical Wnt signaling. *Journal of Biological Chemistry*. 2005 May 20;280(20):19883-7.
- Lim LP, Lau NC, Garrett-Engele P, Grimson A, Schelter JM, Castle J, Bartel DP, Linsley PS, Johnson JM. Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature*. 2005 Feb;433(7027):769.
- Lin H. The stem-cell niche theory: lessons from flies. *Nature Reviews Genetics*. 2005 Dec;6(12):931.
- Liu C, Teng ZQ, Santistevan NJ, Szulwach KE, Guo W, Jin P, Zhao X. Epigenetic regulation of miR-145 by MBD1 governs neural stem cell proliferation and differentiation. *Cell stem cell*. 2010 May 7;6(5):433-44.
- Liu J, Sato C, Cerletti M, Wagers A. Notch signaling in the regulation of stem cell self-renewal and differentiation. *Current topics in developmental biology*. 92: Elsevier; 2010. p. 367-89.
- Liu XH, Wu Y, Yao S, Levine AC, Kirschenbaum A, Collier L, Bauman WA, Cardozo CP. 2013. Androgens up-regulate transcription of the Notch inhibitor Numb in CVC12 myoblasts via Wnt/b-catenin signaling to T cell factor elements in the Numb promoter. *J Biol Chem* 288: 17990-17998.
- Louvi A, Artavanis-Tsakonas S. Notch signalling in vertebrate neural development. *Nature Reviews Neuroscience*. 2006 Feb;9(2):93.
- Lu P, Jones LL, Snyder EY, Tuszynski MH. Neural stem cells constitutively secrete neurotrophic factors and promote extensive host axonal growth after spinal cord injury. *Experimental neurology*. 2003 Jun 1;181(2):10-29.
- Maguire G, Friedman P, McCarthy D, Friedman R, Maniatis A. Stem cell released molecules and exosomes in tissue engineering. *Procedia Engineering*. 2013 Jan 1;69:270-8.
- Makeyev EV, Zhang J, Carrasco MA, Maniatis T. The MicroRNA miR-125 promotes neuronal differentiation by triggering brain-specific alternative pre-mRNA splicing. *Molecular cell*. 2007 Aug 3;27(3):430-48.
- Makeyev EV, Maniatis T. Multilevel regulation of gene expression by microRNAs. *Science*. 2008 Mar 28;319(5871):1789-90.
- Mani SA, Guo W, Liao MJ, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY, Brooks M, Reinhard F, Zhang CC, Shipitsin M, Campbell LL. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell*. 2008 May 16;133(4):704-15.
- Mardaryev AN, Ahmed MI, Vlahov NV, Fessing MY, Gill JH, Sharov AA, Botchkareva NV. Micro-RNA-31 controls hair cycle-associated changes in gene expression programs of the skin and hair follicle. *The FASEB Journal*. 2010 Oct;24(10):3869-81.
- Markovtsov V, Nikolic JM, Goldman JA, Turck CW, Chou M-Y, Black DL. 2000. Cooperative assembly of an hnRNP complex induced by a tissue-specific homolog of polypyrimidine tract binding protein. *Molecular and cellular biology* 20(2):7473-7479.

Martini S, Bernoth K, Main H, Ortega GD, Lendahl U, Just U, Schwanbeck R. A critical role for Sox⁹ in Notch-induced astroglialogenesis and stem cell maintenance. *Stem Cells*. 2013 Apr 1;31(4):741-51.

Mignone JL, Roig-Lopez JL, Fedtsova N, Schones DE, Manganas LN, Maletic-Savatic M, Keyes WM, Mills AA, Gleiberman A, Zhang MQ, Enikolopov G (2007) Neural potential of a stem cell population in the hair follicle. *Cell Cycle* 6: 2161-70.

Millar SE. Molecular mechanisms regulating hair follicle development. *Journal of Investigative Dermatology*. 2002 Feb 1;118(2):216-25.

Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Townsend M, Yoshii A, Šestan N, Rakic P, Constantine-Paton M, Horvitz HR. Microarray analysis of microRNA expression in the developing mammalian brain. *Genome biology*. 2004 Aug;5(8):R78.

Mohyeddin Bonab M, Yazdanbakhsh S, Lotfi J, Alimoghaddom K, Talebian F, Hooshmand F, Ghavamzadeh A, Nikbin B. Does mesenchymal stem cell therapy help multiple sclerosis patients? Report of a pilot study. *Iranian Journal of Immunology*. 2007 Mar 1;4(1):5-7.

Mondanizadeh M, Arefian E, Mosayebi G, Saidijam M, Khansarinejad B, Hashemi SM. MicroRNA-125 regulates neuronal differentiation of mesenchymal stem cells by targeting Sp1 mRNA. *Journal of cellular biochemistry*. 2010;116(6):943-53

Morris RJ, Potten CS. Highly persistent label-retaining cells in the hair follicles of mice and their fate following induction of anagen. *Journal of Investigative Dermatology*. 1999 Apr 1;112(4):470-5.

Morris RJ, Liu Y, Marles L, Yang Z, Trempus C, Li S, Lin JS, Sawicki JA, Cotsarelis G. Capturing and profiling adult hair follicle stem cells. *Nature biotechnology*. 2004 Apr;22(4):411

Morrison SJ, Weissman IL. The long-term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype. *Immunity*. 1994 Nov 1;1(8):661-73.

Morrison SJ. (2001). Neuronal differentiation: proneural genes inhibit gliogenesis. *Current Biology* 11(9):R349-R351.

MuÈller-RoÈver S, Foitzik K, Paus R, Handjiski B, van der Veen C, Eichmüller S, McKay IA, Stenn KS. A comprehensive guide for the accurate classification of murine hair follicles in distinct hair cycle stages. *Journal of Investigative Dermatology*. 2001 Jul 1;117(1):3-10.

Mullen RJ, Buck CR, Smith AM. NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development*. 1994;116(1):201-11

Murchison EP, Hannon GJ. miRNAs on the move: miRNA biogenesis and the RNAi machinery. *Current opinion in cell biology*. 2004 Jun 1;16(3):223-9.

Najafzadeh N, Esmailzade B, Dastan Imchek M. 2010a. Hair follicle stem cells: In vitro and in vivo neural differentiation. *World journal of stem cells* 2(5):866-872.

Najafzadeh N, Mazani M, Abbasi A, Farassati F, Amani M. 2010b. Low-dose all-trans retinoic acid enhances cytotoxicity of cisplatin and 5-fluorouracil on CD44(+) cancer stem cells. *Biomedicine & pharmacotherapy* , 74:243-251.

Najafzadeh N, Sagha M, Heydari Tajaddod S, Golmohammadi MG, Massahi Oskoui N, Deldadeh Moghaddam M. ۲۰۱۰c. In vitro neural differentiation of CD۳۴ (+) stem cell populations in hair follicles by three different neural induction protocols. *In vitro cellular & developmental biology Animal* ۵۱(۲):۱۹۲-۲۰۳.

Najafzadeh N, Nobakht M, Pourheydar B, Golmohammadi MG. ۲۰۱۳. Rat hair follicle stem cells differentiate and promote recovery following spinal cord injury. *Neural regeneration research* ۸(۳۶):۳۳۶۵-۳۳۷۲.

Naka-Kaneda H, Shimazaki T, Okano H. MicroRNA-mediated regulation of the neurogenic-to-gliogenic competence transition of neural stem/progenitor cells. *Neurogenesis*. ۲۰۱۴ Jan ۱; ۱(۱):۱۶۰-۹.

Nakamura, Y., Sakakibara, S., Miyata, T., Ogawa, M., Shimazaki, T., Weiss, S., Kageyama, R., and Okano, H. (۲۰۰۰) The bHLH gene *Hes1* as a repressor of the neuronal commitment of CNS stem cells. *J. Neurosci.* ۲۰, ۲۸۳-۲۹۳.

Nam Y, Chen C, Gregory RI, Chou JJ, Sliz P. Molecular basis for interaction of let-۷ microRNAs with *Lin28*. *Cell*. ۲۰۱۱ Nov ۲۳; ۱۴۷(۵):۱۰۸۰-۹۱.

Neo WH, Yap K, Lee SH, Looi LS, Khandelia P, Neo SX, et al. MicroRNA miR-۱۲۴ controls the choice between neuronal and astrocyte differentiation by fine-tuning *Ezh2* expression. *Journal of Biological Chemistry*. ۲۰۱۴; jbc. M113. ۵۲۵۴۹۳

Ni Y, Zhang K, Liu X, Yang T, Wang B, Fu L. miR-۲۱ promotes the differentiation of hair follicle-derived neural crest stem cells into Schwann cells. *Neural regeneration research*. ۲۰۱۴ Apr ۱۵; ۹(۸):۸۲۸.

Nobakht M, Najafzadeh N, Safari M, Rahbar Roshandel N, Delaviz H, Joghataie MT, Bakhtiyari M, Asalgoo S, Safar F. Bulge cells of rat hair follicles: isolation, cultivation, morphological and biological features. *Yakhteh*. ۲۰۱۰ May ۱۹:۵۱-۸.

Ohyama M, Terunuma A, Tock CL, Radonovich MF, Pise-Masison CA, Hopping SB, Brady JN, Udey MC, Vogel JC. Characterization and isolation of stem cell-enriched human hair follicle bulge cells. *The Journal of clinical investigation*. ۲۰۰۶ Jan ۴; ۱۱۶(۱):۲۴۹-۶۰.

Oro AE, Higgins K. Hair cycle regulation of Hedgehog signal reception. *Developmental biology*. ۲۰۰۳ Mar ۱۵; ۲۵۵(۲):۲۳۸-۴۸.

Osawa M, Hanada KI, Hamada H, Nakauchi H. Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD۳۴-low/negative hematopoietic stem cell. *Science*. ۱۹۹۶ Jul ۱۲; ۲۷۳(۵۲۷۲):۲۴۲-۵.

Oshima H, Rochat A, Kedzia C, Kobayashi K, Barrandon Y. Morphogenesis and renewal of hair follicles from adult multipotent stem cells. *Cell*. ۲۰۰۱ Jan ۲۶; ۱۰۴(۲):۲۳۳-۴۵.

Packer AN, Xing Y, Harper SQ, Jones L, Davidson BL. The bifunctional microRNA miR-۹/miR-۹* regulates REST and CoREST and is downregulated in Huntington's disease. *Journal of Neuroscience*. ۲۰۰۸ Dec ۳۱; ۲۸(۵۳):۱۴۳۴۱-۶.

Pajonk F, Vlashi E. Characterization of the stem cell niche and its importance in radiobiological response. *In Seminars in radiation oncology* ۲۰۱۳ Oct ۱ (Vol. ۲۳, No. ۴, pp. ۲۳۷-۲۴۱). WB Saunders.

Pasquinelli AE, Reinhart BJ, Slack F, Martindale MQ, Kuroda MI, Maller B, Hayward DC, Ball EE, Degnan B, Müller P, Spring J. Conservation of the sequence and temporal expression of let- γ heterochronic regulatory RNA. *Nature*. 2000 Nov; 403(6808):804.

Peláez N, Carthew RW. Biological robustness and the role of microRNAs: a network perspective. In *Current topics in developmental biology* 2012 Jan 1 (Vol. 99, pp. 237-250). Academic Press.

Phinney DG, Kopen G, Isaacson RL, Prockop DJ. Plastic adherent stromal cells from the bone marrow of commonly used strains of inbred mice: variations in yield, growth, and differentiation. *Journal of cellular biochemistry*. 1999 Mar 10; 72(2):270-280.

Ponomarev ED, Veremeyko T, Weiner HL. MicroRNAs are universal regulators of differentiation, activation, and polarization of microglia and macrophages in normal and diseased CNS. *Glia*. 2013 Jan; 71(1):91-103.

Pons-Espinal M, de Luca E, Marzi MJ, Beckervordersandforth R, Armirotti A, Nicassio F, et al. Synergic functions of miRNAs determine neuronal fate of adult neural stem cells. *Stem cell reports*. 2014; 3(2):146-151.

Poy MN, Eliasson L, Krutzfeldt J, Kuwajima S, Ma X, Macdonald PE, Pfeffer S, Tuschl T, Rajewsky N, Rorsman P, Stoffel M. A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion. *Nature*. 2004 Nov; 432(7043):920.

Qian X, Shen Q, Goderie SK, He W, Capela A, Davis AA, et al. Timing of CNS cell generation: a programmed sequence of neuron and glial cell production from isolated murine cortical stem cells. *NEURON-CAMBRIDGE MA*. 2000; 28(1):79-89.

Qin S, Zhu Y, Ai F, et al (2014). MicroRNA-191 correlates with poor prognosis of colorectal carcinoma and plays multiple roles by targeting tissue inhibitor of metalloprotease 3. *Neoplasma*, 61, 27-34.

Quirici N, Soligo D, Bossolasco P, Servida F, Lumini C, Delilieri GL. Isolation of bone marrow mesenchymal stem cells by anti-nerve growth factor receptor antibodies. *Experimental hematology*. 2002; 30(7):783-91.

Qu Q, Shi Y. Neural stem cells in the developing and adult brains. *Journal of cellular physiology*. 2009 Oct; 118(1):1-9.

Rajasethupathy P, Fiumara F, Sheridan R, Betel D, Puthanveetil SV, Russo JJ, Sander C, Tuschl T, Kandel E. Characterization of small RNAs in *Aplysia* reveals a role for miR-192 in constraining synaptic plasticity through CREB. *Neuron*. 2009 Sep 24; 63(6):803-17.

Reali M. Solar barometric distillation for seawater desalting Part II: Analyses of one-stage and two-stage distillation technologies. *Desalination*. 2006 Apr 10; 190(1-3):29-42.

Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, Horvitz HR, Ruvkun G. The 21-nucleotide let- γ RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *nature*. 2000 Feb; 403(6772):901.

Rippon H, Bishop A. Embryonic stem cells. *Cell Proliferation*. 2004; 37(1):23-34.

Rishikaysh P, Dev K, Diaz D, Qureshi WM, Filip S, Mokry J. Signaling involved in hair follicle morphogenesis and development. *International journal of molecular sciences*. 2011 Jan 22;12(1):1647-70.

Roos, K.L., Simmons, D.L., 2000. Cyclooxygenase variants: the role of alternative splicing. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 278, 62-69.

Roush SF, Slack FJ. Transcription of the *C. elegans* let-7 microRNA is temporally regulated by one of its targets, hbl-1. *Developmental biology*. 2009 Oct 10;334(2):223-34.

Rybak A, Fuchs H, Smirnova L, Brandt C, Pohl EE, Nitsch R, Wulczyn FG. A feedback loop comprising lin-28 and let-7 controls pre-let-7 maturation during neural stem-cell commitment. *Nature cell biology*. 2008 Aug;10(8):987.

Sagha M, Najafzadeh N. Highly efficient neural differentiation of CD34-positive hair-follicle-associated pluripotent stem cells induced by retinoic acid and serum-free medium. *Multipotent Stem Cells of the Hair Follicle*: Springer; 2016. p. 161-72

Sanai N, Tramontin AD, Quinones-Hinojosa A, Barbaro NM, Gupta N, Kunwar S, Lawton MT, McDermott MW, Parsa AT, Verdugo JM, Berger MS. Unique astrocyte ribbon in adult human brain contains neural stem cells but lacks chain migration. *Nature*. 2004 Feb;427(6976):740.

Saunders LR, Sharma AD, Tawney J, Nakagawa M, Okita K, Yamanaka S, Willenbring H, Verdin E. miRNAs regulate SIRT1 expression during mouse embryonic stem cell differentiation and in adult mouse tissues. *Aging (Albany NY)*. 2010 Jul;2(7):410.

Schneider M, Stracke F, Hansen S, Schaefer UF. Nanoparticles and their interactions with the dermal barrier. *Dermato-endocrinology*. 2009 Jul 1;1(4):197-206.

Schneider MR, Paus R. Sebocytes, multifaceted epithelial cells: lipid production and holocrine secretion. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2010 Feb 1;42(2):181-9.

Schneider M. MicroRNAs as novel players in skin development, homeostasis and disease. *British Journal of Dermatology*. 2012;166(1):22

Sempere LF, Freemantle S, Pitha-Rowe I, Moss E, Dmitrovsky E, Ambros V. Expression profiling of mammalian microRNAs uncovers a subset of brain-expressed microRNAs with possible roles in murine and human neuronal differentiation. *Genome biology*. 2004 Feb;5(3):R13.

Sharma S, Falick AM, Black DL. Polypyrimidine tract binding protein blocks the 5' splice site-dependent assembly of U2AF and the pre-spliceosomal E complex. *Molecular cell*. 2000 Aug 19;19(4):480-96.

Shenoy A, Blalock RH. 2011a. Regulation of microRNA function in somatic stem cell proliferation and differentiation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 12(9):660.

Shenoy A, Blalock RH. 2011b. Regulation of microRNA function in somatic stem cell proliferation and differentiation. *Nature reviews Molecular cell biology* 12(9):660-676.

Shi Y, Desponts C, Do JT, Hahm HS, Schöler HR, Ding S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic fibroblasts by Oct⁴ and Klf⁴ with small-molecule compounds. *Cell stem cell*. 2008 Nov 6;3(5):568-74.

Shi Y, Zhao X, Hsieh J, Wichterle H, Impey S, Banerjee S, Neveu P, Kosik KS. MicroRNA regulation of neural stem cells and neurogenesis. *Journal of Neuroscience*. 2010 Nov 10;30(45):14931-6.

Sieber-Blum M. 2010. Epidermal neural crest stem cells and their use in mouse models of spinal cord injury. *Brain research bulletin* 83(5):189-193.

Sieber-Blum M, Grim M, Hu Y, Szeder V. 2004. Pluripotent neural crest stem cells in the adult hair follicle. Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists 231(2):208-219

Sieber-Blum M, Schnell L, Grim M, Hu YF, Schneider R, Schwab ME. Characterization of epidermal neural crest stem cell (EPI-NCSC) grafts in the lesioned spinal cord. *Molecular and Cellular Neuroscience*. 2006 May 1;32(1-2):77-81.

Sieber-Blum M, Hu Y. Epidermal neural crest stem cells (EPI-NCSC) and pluripotency. *Stem cell reviews*. 2008 Dec 1;4(4):206-7.

Siegel G, Saba R, Schratt G. microRNAs in neurons: manifold regulatory roles at the synapse. *Current opinion in genetics & development*. 2011 Aug 1;21(4):491-7.

Silber, J., Lim, D., Petritsch, C., Persson, A., Maunakea, A., Yu, M., et al. (2008). miR-124 and miR-125 inhibit proliferation of glioblastoma multiforme cells and induce differentiation of brain tumor stem cells. *BMC Med*. 6:14. doi:10.1186/1745-1701-6-14

Singh AS, Mulder C, Twisk JW, Van Mechelen W, Chinapaw MJ. Tracking of childhood overweight into adulthood: a systematic review of the literature. *Obesity reviews*. 2008 Sep 1;9(9):474-88.

Smirnova L, Gräfe A, Seiler A, Schumacher S, Nitsch R, Wulczyn FG. Regulation of miRNA expression during neural cell specification. *European Journal of Neuroscience*. 2000 Mar;12(3):1479-77.

Soltani MH, Pichardo R, Song Z, Sangha N, Camacho F, Satyamoorthy K, et al. Microtubule-associated protein 7, a marker of neuronal differentiation, induces mitotic defects, inhibits growth of melanoma cells, and predicts metastatic potential of cutaneous melanoma. *The American journal of pathology*. 2000;156(6):1841-50.

Stappert L, Roese-Koerner B, Brustle O. 2010. The role of microRNAs in human neural stem cells, neuronal differentiation and subtype specification. *Cell and tissue research* 309(1):47-64.

Stefani G, Slack FJ. Small non-coding RNAs in animal development. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2008 Mar;9(3):219.

Stolt, C.C., Lommes, P., Sock, E., Chaboissier, M.C., Schedl, A., and Wegner, M. (2003). The Sox9 transcription factor determines glial fate choice in the developing spinal cord. *Genes Dev*. 17, 1677-1689.

Suh, M.R., Lee, Y., Kim, J.Y., Kim, S.K., Moon, S.H., Lee, J.Y., Cha, K.Y., Chung, H.M., Yoon, H.S., Moon, S.Y., et al. 2004. Human embryonic stem cells express a unique set of microRNAs. *Dev. Biol.* 270: 488-498.

Sun, J., Kuo, P.-H., Riley, B. P., Kendler, K. S., and Zhao, Z. (2008). Candidate genes for schizophrenia: a survey of association studies and gene ranking. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* 147B, 1173-1181.

Sun S, Guo Z, Xiao X, Liu B, Liu X, Tang pH, et al. Isolation of mouse marrow mesenchymal progenitors by a novel and reliable method. *Stem cells.* 2003;21(5):527-30.

Surmacz, B., Noisa, P., Risner-Janiczek, J.R., Hui, K., Ungless, M., Cui, W., Li, M., 2012. DLK1 promotes neurogenesis of human and mouse pluripotent stem cell-derived neural progenitors via modulating Notch and BMP signalling. *Stem Cell Rev.* 8, 409-421

Svendsen CN, Caldwell MA, Ostenfeld T. Human neural stem cells: isolation, expansion and transplantation. *Brain pathology.* 1999;9(3):499-513.

Szulwach KE, Li X, Smrt RD, Li Y, Luo Y, Lin L, Santistevan NJ, Li W, Zhao X, Jin P. Cross talk between microRNA and epigenetic regulation in adult neurogenesis. *The Journal of cell biology.* 2010 Apr 5;189(1):127-41.

Tanigaki K, Nogaki F, Takahashi J, Tashiro K, Kurooka H, Honjo T. Notch1 and Notch5 instructively restrict bFGF-responsive multipotent neural progenitor cells to an astroglial fate. *Neuron.* 2001 Jan 1;29(1):40-50.

Tay Y, Zhang J, Thomson AM, Lim B, Rigoutsos I. MicroRNAs to Nanog, Oct4 and Sox2 coding regions modulate embryonic stem cell differentiation. *Nature.* 2008 Oct;455(7216):1124.

Terskikh VV, Vasiliev AV, Vorotelyak EA. Stem cell niches. *Biology Bulletin.* 2007 Jun;33(3):211-20.

Tonelli DD, Pulvers JN, Haffner C, Murchison EP, Hannon GJ, Huttner WB. miRNAs are essential for survival and differentiation of newborn neurons but not for expansion of neural progenitors during early neurogenesis in the mouse embryonic neocortex. *Development.* 2008 Dec 1;135(23):3911-21.

Trempe CS, Morris RJ, Bortner CD, Cotsarelis G, Faircloth RS, Reece JM, Tennant RW (2003) Enrichment for living murine keratinocytes from the hair follicle bulge with the cell surface marker CD34. *J Invest Dermatol* 120:501-511

Verdiev BI, Poltavtseva RA, Podgornyi OV, Marei MV, Zinovyeva RD, Sukhikh GT, Aleksandrova MA. Molecular genetic and immunophenotypical analysis of Pax6 transcription factor and neural differentiation markers in human fetal neocortex and retina in vivo and in vitro. *Bulletin of experimental biology and medicine.* 2009 Oct 1;148(4):697-704.

Visvanathan J, Lee S, Lee B, Lee JW, Lee S-K. 2007. The microRNA miR-125 antagonizes the anti-neural REST/SCP1 pathway during embryonic CNS development. *Genes & development* 21(7):744-749.

Wagers AJ, Weissman IL. Plasticity of adult stem cells. *Cell.* 2004;116(5):639-48.

Wang F, Mullican SE, DiSpirito JR, Peed LC, Lazar MA. Lipoatrophy and severe metabolic disturbance in mice with fat-specific deletion of PPAR γ . *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2013 Oct 20;20(13):4873.

Wang X, Liu Y, Liu X, Yang J, Teng G, Zhang L, Zhou C. 2016. miR-124 inhibits cell proliferation, migration and invasion by directly targeting SOX9 in lung adenocarcinoma. *Oncology reports* 30(5):3110-3121.

Watt FM, Jensen KB. Epidermal stem cell diversity and quiescence. *EMBO Molecular Medicine*. 2009 Aug 20;1(8):260-7.

Weng LP, Smith WM, Brown JL, Eng C (2001) PTEN inhibits insulin-stimulated MEK/MAPK activation and cell growth by blocking IRS-1 phosphorylation and IRS-1/Grb-2/Sos complex formation in a breast cancer model. *Hum Mol Genet* 10:60-66

Wienholds E, Kloosterman WP, Miska E, Alvarez-Saavedra E, Berezikov E, de Bruijn E, Horvitz HR, Kauppinen S, Plasterk RH. MicroRNA expression in zebrafish embryonic development. *Science*. 2008 Jul 18;309(5732):310-1.

Wong CE, Paratore C, Dours-Zimmermann MT, Rochat A, Pietri T, Suter U, Zimmermann DR, Dufour S, Thiery JP, Meijer D, Beermann F. Neural crest-derived cells with stem cell features can be traced back to multiple lineages in the adult skin. *J Cell Biol*. 2006 Dec 18;176(6):100-10.

Wong SS, Ritner C, Ramachandran S, Aurigui J, Pitt C, Chandra P, Ling VB, Yabut O, Bernstein HS. miR-120b promotes early germ layer specification through Lin28/let-7d and preferential differentiation of mesoderm in human embryonic stem cells. *PLoS One*. 2012 Apr 24;7(4):e36121.

Wu, J. and Xie, X. 2006. Comparative sequence analysis reveals an intricate network among REST, CREB and miRNA in mediating neuronal gene expression. *Genome Biol*. 7: R80

Wulczyn FG, Smirnova L, Rybak A, Brandt C, Kwidzinski E, Ninnemann O, Strehle M, Seiler A, Schumacher S, Nitsch R. 2007. Post-transcriptional regulation of the let-7 microRNA during neural cell specification. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 21(2):410-426.

Xue, Y., Ouyang, K., Huang, J., Zhou, Y., Ouyang, H., Li, H., Wang, G., Wu, Q., Wei, C., Bi, Y., et al. (2013). Direct conversion of fibroblasts to neurons by reprogramming PTB-regulated microRNA circuits. *Cell* 152, 82-96.

Xue Q, Yu C, Wang Y, Liu L, Zhang K, Fang C, Liu F, Bian G, Song B, Yang A. 2016. miR-9 and miR-124 synergistically affect regulation of dendritic branching via the AKT/GSK3 β pathway by targeting Rap1a. *Scientific reports* 6:26781.

Yang B, Guo H, Zhang Y, Chen L, Ying D, Dong S. 2011. MicroRNA-140 regulates chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells by targeting Sox9. *PloS one* 6(7):e21679.

Yang S, Graham J, Kahn JW, Schwartz EA, Gerritsen ME. Functional Roles for PECAM-1 (CD31) and VE-Cadherin (CD143). in *Tube Assembly and Lumen Formation in Three-Dimensional Collagen Gels*. *The American journal of pathology*. 1999 Sep 1;150(3):887-90.

Yang X, Zhou Y, Peng S, Wu L, Lin H-Y, Wang S & Wang H 2012 Differentially expressed plasma microRNAs in premature ovarian failure patients and the potential regulatory function of mir-125a in granulosa cell apoptosis. *Reproduction* 144 230-244. (doi:10.1030/REP-11-0371)

Yeo et al., 2008, M. Yeo, S.K. Lee, B. Lee, E.C. Ruiz, S.L. Pfaff, G.N. Gill, *Science*, 307 (2008), pp. 096-100

Yi R, O'Carroll D, Pasolli HA, Zhang Z, Dietrich FS, Tarakhovskiy A, Fuchs E. Morphogenesis in skin is governed by discrete sets of differentially expressed microRNAs. *Nature genetics*. 2006 Mar;38(3):306.

Yoo AS, Sun AX, Li L, Shcheglovitov A, Portmann T, Li Y, Lee-Messer C, Dolmetsch RE, Tsien RW, Crabtree GR. MicroRNA-mediated conversion of human fibroblasts to neurons. *Nature*. 2011 Aug;476(7309):228.

Yoo, B.T. Staahl, L. Chen, G.R. Crabtree, *Nature*, 460 (2009), pp. 742-746

Yoon KJ, Koo BK, Im SK, Jeong HW, Ghim J, Kwon MC, Moon JS, Miyata T, Kong YY. Mind bomb 1-expressing intermediate progenitors generate notch signaling to maintain radial glial cells. *Neuron*. 2008 May 22;58(4):519-31.

Yu F, Yao H, Zhu P, Zhang X, Pan Q, Gong C, Huang Y, Hu X, Su F, Lieberman J, Song E. let-7 regulates self renewal and tumorigenicity of breast cancer cells. *Cell*. 2007 Dec 14;131(6):119-23.

Yu H, Kumar SM, Kossenkov AV, Showe L, Xu X. 2010. Stem cells with neural crest characteristics derived from the bulge region of cultured human hair follicles. *Journal of Investigative Dermatology* 130(9):1227-1236

Zhang Y, Tomann P, Andl T, Gallant NM, Huelsken J, Jerchow B, Birchmeier W, Paus R, Piccolo S, Mikkola ML, Morrisey EE. Reciprocal requirements for EDA/EDAR/NF-κB and Wnt/β-catenin signaling pathways in hair follicle induction. *Developmental cell*. 2009 Jul 21;17(1):49-61.

Zhang L, Stokes N, Polak L, Fuchs E. 2011. Specific microRNAs are preferentially expressed by skin stem cells to balance self-renewal and early lineage commitment. *Cell stem cell* 8(3):294-308.

Zhang Y, Guo X, Xiong L, Kong X, Xu Y, Liu C, Zou L, Li Z, Zhao J, Lin N. 2012. MicroRNA-101 suppresses SOX9-dependent tumorigenicity and promotes favorable prognosis of human hepatocellular carcinoma. *FEBS letters* 586(24):4372-4376.

Zhao C, Sun G, Li S, Shi Y. A feedback regulatory loop involving microRNA-9 and nuclear receptor TLX in neural stem cell fate determination. *Nature structural & molecular biology*. 2009 Apr;16(4):360.

Zhao C, Sun G, Li S, Lang MF, Yang S, Li W, Shi Y. MicroRNA let-7b regulates neural stem cell proliferation and differentiation by targeting nuclear receptor TLX signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2010 Feb 2;107(5):1876-81.

Zhao Y, Samal E, Srivastava D. Serum response factor regulates a muscle-specific microRNA that targets Hand2 during cardiogenesis. *Nature*. 2008 Jul;456(7248):214.

Zheng GX, Ravi A, Calabrese JM, Medeiros LA, Kirak O, Dennis LM, Jaenisch R, Burge CB, Sharp PA. A latent pro-survival function for the miR-290-295 cluster in mouse embryonic stem cells. *PLoS genetics*. 2011 May 27(5):e1002004.

Zhou F, Zhang C, Guan Y, Chen Y, Lu Q, Jie L, Gao H, Du H, Zhang H, Liu Y. 2011. Screening the expression characteristics of several miRNAs in G9A-SOD1 transgenic mouse: altered expression of miRNA-124 is associated with astrocyte differentiation by targeting Sox7 and Sox9. *Journal of neurochemistry* 120(1):61-71.

Effect of *miR-125b* on neuronal differentiation of stem cells isolated from bulge region of hair follicle

Abstract

Introduction: Hair follicle stem cells (HFSCs) are adult stem cells with high proliferative and developmental capacity in vitro that can be differentiated into neurons and glial cells. microRNAs (miRNAs) are critical regulators of maintaining and changing cellular state during stem cell proliferation or differentiation. Distinct miRNAs regulate the proliferation and differentiation of HFSCs. Among the neural miRNAs, the function of *miR-125b* in the neural differentiation has been studied extensively. However, its exact role in the neuronal differentiation of HFSCs has not been elucidated.

Material and Methods: HFSCs were isolated from mouse whisker follicles. *miR-125b*, *let-7b*, and *miR-125b*, *Ptbp1*, *Sox9*, *CCND1* (*cyclinD1*), *NR1E1* (*Tlx*), *RCOR2* (*CoREST*), *DLK1*, *Map2* and *Rbfox3* (*NeuN*) expression levels were detected by Real-Time PCR (RT-PCR). The influence of *miR-125b* transfection was evaluated using immunostaining.

Results: We demonstrated that *miR-125b* and *let-7b* expression levels were significantly increased after neural differentiation. *DLK1*, *Map2*, *Rbfox3*, *CCND1*, *NR1E1*, *RCOR2*, *Ptbp1* and *Sox9* were identified as targets of *miR-125b* in neuronal differentiation of the HFSCs. During neural differentiation and *miR-125b* mimicking, *Ptbp1*, *Sox9*, *CCND1*, *NR1E1*, *RCOR2* levels were decreased and increased the level of expression of *DLK1*, *Map2* and *Rbfox3* genes in HFSCs. Moreover, *miR-125b* overexpression increased MAP2 (58, 43 ± 11, 26) and NeuN (48, 34 ± 11, 10) proteins expression.

Conclusion: The results demonstrated that *miR-125b* may promote differentiation of HFSCs into neuronal cells by targeting non-neural genes *Sox9*, *Ptbp1*, *CCND1*, *NR1E1* and *RCOR2*.

Key words: Hair follicle stem cells, Neural differentiation, *miR-125b*, *Sox9*, *Ptbp1*, *CCND1*, *NR1E1*, *RCOR2*, *DLK1*, *Map2*, *Rbfox3*

پیوست ه : تأییدیه انگلیسی هیئت داوران



Islamia Azad University

Shiraz Branch

A Thesis for the Requirements of the Degree of Ph.D.

in

Animal Science, Developmental Biology

Subject:

Effect of *miR-125b* on neuronal differentiation of stem cells isolated from bulge region of hair follicle

Thesis Advisor:

Najafzadeh Ph.D.

Mohammadzadeh Ph.D.

Consulting Advisor:

Edalatmanesh Ph.D.

Golmohammadi Ph.D.

By:

Haleh Mokabber

Evaluated and approved by the thesis committee as :

.....,Ph.D.

.....,Ph.D.

.....,Ph.D.

Winter ۲۰۱۹



Islamia Azad University

Shiraz Branch

Faculty of Science - Department of Biology

A Thesis for the Requirements of the Degree of Ph.D.

in

Animal Science, Developmental Biology

Subject:

Effect of *miR-124-3p* on neuronal differentiation of stem cells isolated from bulge region of hair follicle

Thesis Advisor:

**Najafzadeh Ph.D.
Mohammadzadeh Ph.D.**

Consulting Advisor:

**Edalatmanesh Ph.D.
Golmohammadi Ph.D.**

By:

Haleh Mokabber

Winter ۲۰۱۹

