بسم الله الرحمن الرحيم

پایان‌نامه کارشناسی ارشد زیست‌شناسی تکوینی

تمایز جهت‌دار سلول‌های بنیادی انسانی به نورون‌های حرکتی با استفاده از کوچک مولکول‌ها

نگارش:

زهرا ولی‌زاده ارشد

استاد راهنما:

دکتر سحر کیانی

استاد مشاور:

دکتر حسین بهاروند

شهریور ۱۳۹۲

خدایا تو را سپاس به خاطر صبر و تلاشی که به من عطا کردی و رحمت بی‌دریغی که بر من روا داشتی، بی‌شک بی‌لمس حضورت نمی‌توانستم به هدفم برسم، سر بر آستان بزرگی و بخشش می گذارم و شاکر ابدی درگاه ایزدیت خواهم ماند.

از استاد گرامیم، سرکار **خانم دکتر سحر کیانی** بسیار سپاسگزارم که بدون راهنمایی‌های ایشان انجام این طرح بسیار مشکل می‌نمود.

تقدیر و تشکر شایسته از استاد فرهیخته **جناب آقای دکتر حسین بهاروند** که از مشاوره و راهنمایی‌هایشان در طول طرح بهره‌مند بودم.

سپاس بیکران از **آقای ابراهیم شهبازی** که استادانه در آموزش و پیشبرد طرح مرا یاری کردند.

از همکاران خوبم در آزمایشگاه تمایز بویژه **آقایان پورنصر و انصاری** برای تمام حمایت‌ها و همکاری هایشان سپاسگزارم.

از همکاران و دوستان خوبم در آزمایشگاه الکترو فیزولوژی بویژه **خانم شیوا هاشمی‌زاده** برای کمک‌های بی‌دریغش بسیار سپاسگزارم.

از آزمایشگاه‌های فلوسایتومتری و مولکولی، **آقای سامانی، خانم‌ها صمدیان و مرادمند** بسیار سپاسگزارم که قدم به قدم در این آزمایشگاه‌ها مرا همراهی کردند.

از دوستان و همکلاسی‌های عزیزم سپاسگزارم.

و خانواده‌ی عزیز و گرامیم بویژه مادر عزیزم که همواره مایه‌ی آرامش و پیشرفت من بودند.

هرچند کلمات و جملات در بیان سپاس و قدردانی من از همه‌ی شما عزیزان قاصرند.

تقدیم به

روح پاک پدر که عالمانه به من آموخت تا چگونه در عرصه زندگی ایستادگی را تجربه نمایم،

و مادرم، دریای بی‌کران فداکاری و عشق، که وجودم برایش همه رنج و وجودش برایم همه مهر است،

و خانواده عزیزم، که وجودشان شادی‌بخش و صفایشان مایه‌ی آرامش من است،

و تمام آزاد مردانی که نیک می‌اندیشند و عقل و منطق را پیشه خود کرده و جز رضای الهی و پیشرفت جامعه هدفی ندارند،

و **روح برادر شهیدم** و همه‌ی جوانمردانی که جان و مال خود را در حفظ و اعتلای این مرز و بوم فدا نموده و می‌نمایند.

چکیده

مقدمه: تمایز جهت‌دار سلول‌های بنیادی جنینی به سلول‌های مختلف بدن هنوز به‌عنوان یک چالش مورد مطالعه در زیست‌شناسی تکوینی مطرح می‌باشد. کوچک مولکول‌ها می‌توانند به عنوان یک ایده ی جدید برای غلبه بر این چالش باشند.

روش‌ها: ما در این مطالعه با توجه به مسیرهای پیام‌رسانی موثر در تمایز عصبی از کوچک مولکول های Dorsomorphin، A8301، Xax939 و Purmorphamine استفاده کردیم. سلول‌های حاصل از هر مرحله‌ی تمایز را از نظر کیفی، کمی و عملکردی با انجام آزمایشات رنگ‌آمیزی ایمونوفلوئورسنت، فلوسایتومتری، qRT-PCR وPatch clamp مورد بررسی قرار دادیم.

یافته‌ها: رنگ‌آمیزی ایمونوفلوئورسنت و آنالیز فلوسایتومتری در ساختارهای شبه لوله‌ی عصبی مشتق از سلول‌های بنیادی جنینی نشان می‌دهد که این سلول‌ها با درصد بالایی $NESTIN^+$، $SOX1^+$ و $PAX6^+$ بودند. بعد از برش وکشت مجدد ساختارهای شبه لوله‌ی عصبی، سلول‌های تمایز یافته حاصل برای پروتئین‌های شاخص عصبی و نورون حرکتی شامل TUJ1، MAP2 و HB9/ISL1 مثبت بودند. تغییرات بیان ژن‌های اختصاصی در مرحله‌ی آخر تمایز با کمک تکنیک qRT-PCR مشاهده شد. همچنین با کمک تکنیک کلمپ ولتاژی در نورون‌های حرکتی حاصل از تمایز جریان‌های یونی وابسته به ولتاژ، خروج K^+ و ورود Ca^{2+}/Na^+ ثبت شد.

نتیجه‌گیری: نتایج بدست‌آمده نشان می‌دهد که نورون‌های مشتق از سلول‌های بنیادی جینی پروتئین‌های شاخص نورون‌های حرکتی بالغ را بیان می‌کنند و مورفولوژی نورون‌های بالغ را دارا هستند اما ویژگی‌های الکتروفیزولوژیکی آن‌ها نشان می‌دهد که از لحاظ عملکرد فیزیولوژیک هنوز در مرحله‌ی پیش از بلوغ قرار دارند و جریانات ورودی Ca^{2+}/Na^+ برای شلیک پتانسیل عمل هنوز کافی

نیستند. به‌نظر می‌رسد که این سلول‌ها باید مدت زمان بیشتری در شرایط آزمایشگاه تکوین پیدا کنند.

واژگان کلیدی: سلول‌های بنیادی پرتوان، نورون حرکتی، کوچک مولکول، تمایز عصبی.

فهرست مطالب

عنوان صفحه

فصل اول- مقدمه و مروری بر مطالعات ۱

۱-۱ تکوین دستگاه عصبی در دوران جنینی ۲

۱-۲ مسیرهای پیامرسانی درگیر در تمایز عصبی ۵

۱-۲-۱ مسیر پیامرسانی ابرخانواده TGFß ۵

۱-۲-۲ مسیر پیام‌رسانی رتینوئیک اسید (Retinoic Acid)..... ۷

۱-۲-۳ مسیر پیام‌رسانی Sonic hedgehog ۸

۱-۲-۴ مسیر پیام‌رسانیWnt ۱۰

۱-۲-۵ مسیر پیام‌رسانیFibroblast Growth Factor (FGF) ۱۱

۱-۳ کاربرد تمایز سلول‌های عصبی در شرایط آزمایشگاهی ۱۲

۱-۴ سلول‌های بنیادی ۱۳

۱-۴-۱ سلول‌های بنیادی بالغ ۱۳

۱-۴-۲ سلول‌های بنیادی خون بند ناف ۱۳

۱-۴-۳ سلول‌های بنیادی جنینی ۱۳

۱-۴-۴ سلول‌های بنیادی پرتوان القاشده..... ۱۵

۱-۵ فاکتورهای رشد ۱۶

۱-۶ کوچک مولکول‌ها ۱۷

۱-۶-۱ مزایای کوچک مولکول‌ها ۱۷

۱-۶-۲ فرآیند تمایز با کمک کوچک مولکول‌ها ۱۸

۱-۷ مروری بر مطالعات انجام شده در زمینه تمایز سلول‌های بنیادی به سلول های عصبی حرکتی ۲۰

۱-۸ ویژگی‌های فیزیولوژیک نورون حرکتی ۲۶

۱-۹ اهداف و نوآوریها ۲۸

فصل دوم-مواد و روش‌ها..... ۲۹

۲-۱ کشت سلولی ۳۱

۲-۱-۱ کشت و پاساژ سلول‌های بنیادی جنینی انسانی ۳۱
۲-۱-۱-۱ تهیه محیط کشت سلول‌های بنیادی ۳۱
۲-۱-۱-۲ تهیه‌ی آنزیم کلاژناز/دیسپاز ۳۲
۲-۱-۱-۳ آماده‌سازی ظروف کشت سلول ۳۲
۲-۱-۱-۴ مراحل پاساژ سلول‌های بنیادی جنینی انسانی ۳۲
۲-۱-۲ تمایز سلول‌های بنیادی پرتوان به سلول‌های عصبی حرکتی ۳۳
۲-۱-۲-۱ مرحله‌ی القای عصبی اولیه..... ۳۳
۲-۱-۲-۲ مرحله‌ی تمایز ساختارهای شبه لوله ی عصبی ۳۵
۲-۱-۲-۳ مرحله‌ی کشت سوسپانسیون ۳۶
۲-۱-۲-۴ مرحله‌ی تمایز نورون‌های حرکتی..... ۳۶
۲-۱-۲-۵ مرحله‌ی بلوغ نورون‌های حرکتی ۳۷

۲-۲ بررسی کیفیت و کمیت سلول‌های حاصل از تمایز ۴۰

۲-۲-۱ ارزیابی کیفی بیان مارکرهای پروتئینی اختصاصی با کمک IMMUNOCYTOSTAINING..... ۴۰
۲-۲-۲ ارزیابی کمی بیان پروتئین‌ها با کمک تکنیک فلوسایتومتری..... ۴۲
۲-۲-۳ ارزیابی های مولکولی با کمک qRT-PCR ۴۴
۲-۲-۳ -۱ استخراج RNA به روش استخراج با ترایزول ۴۴
۲-۲-۳-۲ انجام فرایند RT (reverse transcriptase): ساخت cDNA از روی RNA استخراج شده ۴۶
۲-۲-۳-۳ انجام Real time RT-PCR (qRT-PCR) ۴۷
۲-۲-۴ بررسی تمایز عصبی در سح عملکردی با استفاده از تکنیک PATCH CLAMP ۵۰
۲-۲-۴-۱ مراحل انجام Whole cell patch clamp..... ۵۳
۲-۲-۵ آنالیز آماری..... ۵۵

فصل سوم-نتایج..... ۵۸

۳-۱ نتایج حاصل از کشت و پاساژ سلول‌های بنیادی جنینی ۵۹

۳-۲ نتایج القای کلنی های HESC به اکتودرم عصبی ۶۰
۳-۲-۱ مشاهدات میکروسکوپ نوری ۶۰
۳-۲-۲ یافته‌های رنگ‌آمیزی ایمونوفلوئورسنت در مرحله‌ی اکتودرم عصبی ۶۲
۳-۲-۳ بررسی میزان بیان شاخص‌های اکتودرم عصبی با تکنیک فلوسایتومتری ۶۴
۳-۳ نتایج القای ساختارهای اکتودرم عصبی به نورون حرکتی ۶۶
۳-۳-۱ یافته‌های رنگ‌آمیزی ایمونوفلوئورسنت در مرحله‌ی تمایز نورون حرکتی ۶۸
۳-۳-۲ نتایج REAL TIME RT-PCR (QRT-PCR) ۷۲
۳-۳-۳ نتایج مطالعات الکتروفیزیولوژی ۷۳
۳-۳-۳-۱ نتایج مربوط به تکنیک کلمپ جریانی ۷۳
۳-۳-۳-۱-۱ خصوصیات غیرفعال غشا ۷۳
۳-۳-۳-۱-۲ خصوصیات فعال غشا ۷۴
۳-۳-۳-۲ نتایج مربوط به کلمپ ولتاژی ۷۷
فصل چهارم ۸۴
۴-۱ بحث ۸۵
۴-۲ نتیجه‌گیری ۹۲
۴-۳ پیشنهادات ۹۴
منابع و مآخذ (REFERENCES) ۹۵

فهرست شکل‌ها

شکل ۱-۱..... ۳
شکل ۱-۲..... ۶
شکل ۱-۳..... ۷
شکل ۱-۴..... ۹
شکل ۱-۵..... ۱۱
شکل ۱-۶..... ۱۴
شکل ۲-۱..... ۳۰
شکل ۲-۲..... ۴۶
شکل ۲-۳..... ۵۰
شکل ۲-۴..... ۵۱
شکل ۲-۵..... ۵۴
شکل ۳ -۱..... ۵۹
شکل ۳-۲..... ۶۱
شکل ۳-۳..... ۶۱
شکل ۳-۴..... ۶۳

شکل ۳-۵..... ۶۵
شکل ۳-۶..... ۶۵
شکل ۳-۷..... ۶۷
شکل ۳-۸..... ۶۷
شکل ۳-۹..... ۶۹
شکل ۳-۱۰..... ۶۹
شکل ۳-۱۱..... ۷۰
شکل ۳-۱۲..... ۷۱
شکل ۳-۱۳..... ۷۲
شکل ۳-۱۴..... ۷۵
شکل ۳-۱۵..... ۷۶
شکل ۳-۱۶..... ۷۹
شکل ۳-۱۷..... ۸۰
شکل ۳-۱۸..... ۸۱
شکل ۳-۱۹..... ۸۲
شکل ۳-۲۰..... ۸۳

فهرست جداول

جدول ۱-۱..... ۱۸

جدول ۱-۲..... ۲۷

جدول ۱-۳..... ۲۷

جدول ۲-۱..... ۳۱

جدول۲-۲..... ۳۵

جدول۲-۳..... ۳۷

جدول۲-۴..... ۳۹

جدول۲-۵..... ۴۱

جدول۲-۶..... ۴۱

جدول۲-۷..... ۴۳

جدول۲-۸..... ۴۳

جدول۲-۹..... ۴۹

جدول۲-۱۰..... ۵۲

جدول۲-۱۱..... ۵۲

جـدول۲-۱۲..... ۵۳

فصل اول:

مقدمه و

مروری بر مطالعات گذشته

۱-۱ تکوین دستگاه عصبی در دوران جنینی

در دوران جنینی اکتودرم متعهد به ایجاد دستگاه عصبی مهره داران و اپیدرم می‌شود. سلول های اکتودرم در اثر پیام‌های مزودرم پشتی و اندودرم حلقی در ناحیه سر به سلول‌های استوانه‌ای تبدیل می‌شوند. این بخش از اکتودرم پشتی تبدیل به اکتودرم عصبی می‌شود، به این ناحیه از جنین صفحه عصبی[۱] می‌گویند. فرآیندی که طی آن این صفحه تبدیل به لوله عصبی[۲] یا دستگاه عصبی مرکزی اولیه می‌شود، نورولاسیون نام دارد. در طی نورولاسیون[۳] سلول‌هایی که اطراف صفحه عصبی قرار دارند، سبب تکثیر، درون‌روی[۴] و جدا شدن سلول‌های صفحه عصبی از سلول‌های سطحی به منظور تشکیل یک لوله‌ی توخالی می‌شوند. در اثر این فرآیند اکتودرم به سه گروه سلول تقسیم می شود:

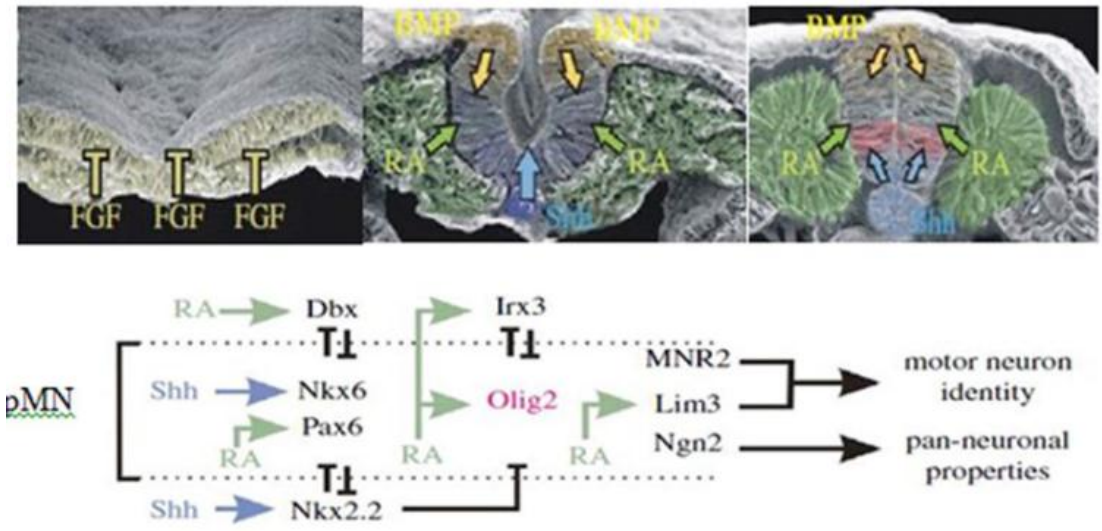
لوله عصبی که مغز و نخاع را ایجاد می‌کند، ۲- اپیدرم که پوست را ایجاد می‌کند، ۳- سلول های تاج عصبی[۵].

مدت کوتاهی پس از تشکیل صفحه عصبی، لبه‌های آن ضخیم شده و به سمت بالا حرکت می‌کنند تا چین‌های عصبی[۶] را تشکیل دهند. چین‌های عصبی نهایتاً به یکدیگر متصل شده و لوله عصبی را در زیر اکتودرم تشکیل می‌دهند. لوله عصبی ابتدایی پستانداران ساختاری راست و مستقیم دارد. در راستای محور قدامی- خلفی، پیش از شکل‌گیری ناحیه‌ی خلفی لوله‌ی عصبی، سمت قدامی آن دچار تغییرات زیادی می‌گردد. در این سمت، سه وزیکول اولیه تشکیل می‌شود: مغز قدامی[۷]، مغز

[1] Neural plate
[2] Neural tube
[3] Neurulation
[4] invagination
[5] Neural crest
[6] Neural folds
[7] Prosencephalon

میانی[8] و مغز خلفی[9]. هر کدام از این نواحی طی تقسیم‌بندی‌های بعدی، نواحی مختلف مغز نظیر نیم کره‌های مخ، وزیکول‌های بینایی، هیپوتالاموس، تالاموس و بصل‌النخاع را تشکیل می‌دهند. همچنین لوله‌ی عصبی در طول محور پشتی- شکمی به‌واسطه‌ی پیام‌های مختلف که از محیط اطراف دریافت می‌کند، قطبی می‌شود. برای مثال در نخاع، در ناحیه‌ی پشتی به‌واسطه‌ی پیام‌های ورودی نورون‌های حسی تکوین می‌یابند، حال‌آن‌که در ناحیه‌ی شکمی، نورون‌های حرکتی تکوین می‌یابند (تصویر ۱-۱). تخصصی شدن سلول‌ها در طول این محور از طریق دو عامل پاراکراین اصلی آغاز می‌شود که عامل اول Sonic hedgehog و TGF-ß که به ترتیب از نوتوکورد و اکتودرم پشتی منشا می‌گیرند. با ترکیب اطلاعات مربوط به محور قدامی- خلفی[10] با اطلاعات مربوط به محور پشتی- شکمی[11]، نورون‌ها به صورت منحصر به فردی برای مناطق ویژه تخصیص می‌یابند (۱).

[8] Mesencephalon
[9] Rhombencephalon
[10] Anterior-posterior
[11] Dorsal-ventral



شکل ۱-۱ مسیرهای پیام‌رسانی دخیل در تولید نورون حرکتی- تصاویر منبع FGF (رنگ زرد)، RA (به رنگ سبز)، Shh (به رنگ آبی) و BMP (به رنگ نارنجی) در اطراف بافت عصبی و تاثیر آن‌ها روی بیان ژن‌ها را نشان می دهد. Shh و RA بیان پروتئین‌های Pax6 را در پیش‌سازهای نخاعی آغاز می‌کند. فعالیت مهاری NKX6 و Pax6 بیان مهارکننده‌های تشکیل نورون حرکتی مثل Dbx و NKX2.2 را جلوگیری می کند و با اتصال RA به رسپتور خود، olig2 (ناحیه‌ی قرمز رنگ) بیان می‌شود. olig2 تمایز نورون حرکتی را با بیان فاکتورهای رونویسی اختصاصی نورون حرکتی مثل Hb9 و Isl1 را تنظیم می‌کنند، هدایت می‌کند (۲).

۱-۲ مسیرهای پیام‌رسانی درگیر در تمایز عصبی

مسیرهای پیام‌رسانی مهم که در تمایز عصبی نقش دارند شامل مسیر پیام‌رسانی ابر خانواده TGFß، Retinoic Acid، Sonic hedgehog و Wnt هستند (۱, ۳). هر کدام از این عوامل نقش خاصی را در ریخت‌زایی در خلال تکوین ایفا می‌کنند.

۱-۲-۱ مسیر پیام‌رسانی ابرخانواده TGFß

اعضای این ابرخانواده نقش‌های مهمی در تنظیم فرآیندهای تکوینی از جمله در طی تکوین سیستم عصبی دارند. این ابرخانواده شامل اعضایی مانند BMP[۱۲] هستند (۳).

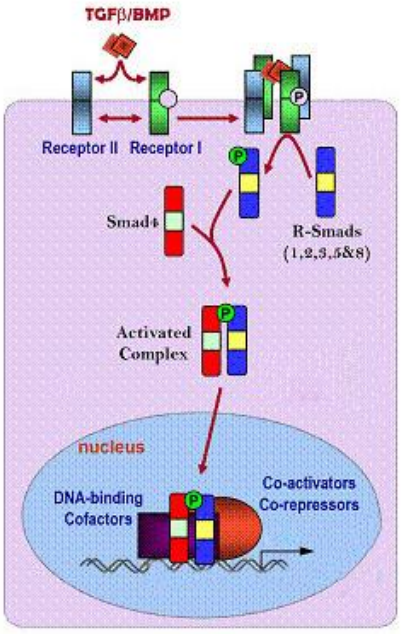
در جنین در حال تکوین به علت مهار مسیرهای پیام‌رسانی به وسیله آنتاگونیست‌های پروتئین های خانواده TGFß مثل BMP، اکتودرم عصبی در بخش پشتی اکتودرم جنینی ایجاد می‌شود. مهار پیام‌رسانیBMP4 به همراه فعالیت مسیرهای پیام‌رسانی Wnt و FGF موجب می‌شود که اکتودرم عصبی ماهیت سری- دمی[۱۳] به خود بگیرد. مهار BMP با فاکتورهایی مثل Noggin که در جهت مهار این مسیر عمل می‌کنند، برای القای نورون‌زایی کافی است (۴).

فقدان مولکول‌های آنتاگونیست BMP سبب کاهش اختصاصی شدن اکتودرم به اکتودرم عصبی می‌شود. مسیر پیام‌رسانی BMP، از طریق فعال شدن مسیر Smad فعالیت می‌کند. اتصال BMP به رسپتورهایش شامل ALK2, ALK3, ALK6 باعث فسفریلاسیون Smad1/5/8 می‌شود که با Smad4 تشکیل کمپلکس می‌دهند و وارد هسته می‌شوند و باعث کاهش بیان ژن‌های هدف می شوند. Activin یا TGFß هم با اتصال به رسپتورهایشان شامل ALK4, ALK5, ALK7 باعث فسفریلاسیون Smad2/3 می‌شوند که مشابه با مسیر Smad1/5/8 با Smad4 تشکیل کمپلکس داده و

[12] Bone Morphogenic Protein
[13] Rostral-coadal

وارد هسته می‌شوند. در شرایط آزمایشگاه هم سرکوب مسیر پیام‌رسانی BMP در اجتماعات سلولی حاصل از سلول‌های بنیادی جنینی انسانی با استفاده از فاکتور رشد Noggin و یا کوچک مولکول‌های موثر بر این مسیر، منجر به القای بافت عصبی می‌شود (۱, ۵).

پیام‌های TGFß/activin پرتوانی[۱۴] را محافظت می‌کنند و مهار این پیام‌ها باعث القای تمایز می‌شود. بنابراین مهار پیام‌های BMP یا TGFß/activin گسترش القای عصبی را سبب می‌شوند. فاکتور رشد Noggin به BMP2,4,7 با تمایل بالا اتصال پیدا می‌کند و متعاقب آن از اتصال لیگاند و رسپتور ممانعت به عمل می‌آید و کوچک مولکول‌های موثر بر این مسیر پیام‌رسانی با مهار رسپتوهای BMP و TGFß/activin عمل می‌کنند، که در نتیجه ادامه‌ی مسیر را مختل می‌کنند. بنابراین مهار مسیر Smad به عنوان یک القاگر موثر سلول‌های عصبی از سلول‌های بنیادی جنینی انسانی است (۶).

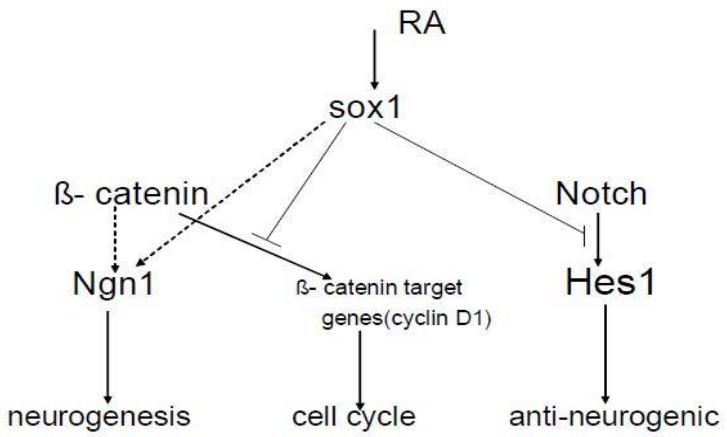


شکل ۱-۲ تصویر شماتیک از فعالیت مسیر پیام رسانی TGFβ/BMP. اتصال لیگاند- رسپتور باعث فعال شدن Smad شده که در نهایت از رونویسی ژن‌های هدف جلوگیری می‌کنند (۷).

[14] pluripotency

۱-۲-۲ مسیر پیام‌رسانی رتینوئیک اسید (Retinoic Acid)

این مسیر نقش‌های مهمی در بسیاری از جوانب تکوین و فعالیت عصبی ایفا می‌کند. در جنین در حال تکوین غلظت‌های بالاتر RA[15] در خلف مغز خلفی و طناب نخاعی وجود دارد و غلظت به سمت ناحیه‌ی قدامی کاهش پیدا می‌کند. این الگو یک شیب غلظتی RA در محور قدامی- خلفی صفحه عصبی ایجاد می‌کند. به علاوه در غیاب پیام‌رسانی RA قسمت خلفی مغز خلفی تشکیل نمی شود و تکوین قسمت قدامی طناب نخاعی متوقف می‌شود. بنابراین RA در سازماندهی اختصاصی قسمت خلفی مغز خلفی و قسمت قدامی طناب نخاعی دخیل است. به طور مشابه در محور پشتی _شکمی لوله عصبی RA با مولکول‌هایی نظیر Shh، FGF و BMP همکاری می‌کند. این مسیرهای پیام‌رسانی تعیین سرنوشت نورون‌های حسی، نورون‌های رابط و نورون‌های حرکتی را انجام می‌دهند (۸-۱۰).



شکل ۱-۳ تاثیر RA برمسیر پیام‌رسانی sox1. با اثراین فاکتور بر sox1 تکثیر متوقف و در نهایت تمایز عصبی صورت می‌گیرد.

[15] Retinoic Acid

Retinoic Acid برای اختصاصی شدن تمایز به عصب در جنین و سلول‌های پیش‌ساز عصب حاصل از سلول‌های بنیادی مورد نیاز است (تصویر ۱-۳). مطالعات نشان داده‌اند که RA به همراه FGFو Wnt به عنوان یک فاکتور دمی‌کننده عمل می‌کند. این عامل در جنین نقش مهمی را در جهت ایجاد سلول‌های عصبی با ماهیت سری_دمی بازی می‌کند. فقدان RA در تمایز سلول‌های بنیادی جنینی به سلول‌های پیش‌ساز عصبی منجر به بیان مارکرهای مغز قدامی می‌شود (۹).

۱-۲-۳ مسیر پیام‌رسانی Sonic hedgehog

یکی دیگر از فاکتورهای موثر در تمایز عصبی Shh[16] است. این مسیر پیام‌رسانی در فرآیندهای تکوینی متنوعی درگیر است. بسته به غلظتی از Shh که دریافت می‌شود سرنوشت‌های سلولی مختلفی توسط آن القا می‌شود (۴). Shh از اعضای خانواده مولکولهای پیام‌رسانی Hh [17] است. یک مولکول ترشحی که در سطح سلول یافت می‌شود و به عنوان یک مورفوژن عمل می‌کند و در یک رفتار وابسته به غلظت سرنوشت‌های مختلف سلولی را سبب می‌شود (۳). این فاکتور سبب القای تمایز به سلول های پیش‌ساز عصبی شده که در نهایت در ناحیه‌ی شکمی لوله‌ی عصبی نورون حرکتی را می‌سازد. Shhتوسط نوتوکورد تولید می‌شود و سپس سلول‌های صفحه کفی لوله‌ی عصبی این مسئولیت را پیدا می‌کنند(۱). این پپتید، شیب غلظتی در طول لوله‌ی عصبی ایجاد می‌کند که منجر به ایجاد سلول های پیش‌ساز ناحیه‌ی شکمی لوله‌ی عصبی می‌شود (۵). فقدان Shh یا قطع مسیر پیام‌رسانی آن تحت کنترل BMP4، در جنین سبب ایجاد سلول‌های ناحیه‌ی پشتی می‌شود. علاوه بر نقش Shh در الگوگیری محور پشتی_شکمی این فاکتور در تکوین اکتودرم عصبی همراه با RA نقش به‌سزایی دارد. نورون‌های حرکتی نیز از سلول‌های بنیادی جنینی انسان توسط RA فنوتیپ سلول‌های ناحیه‌ی دمی را بدست می‌آورند و Shh سبب شکمی شدن آن‌ها می‌شود (۱۱). مسیر پیام‌رسانی Shh به این شکل

[16] Sonic hedgehog
[17] Hedgehog