

تمایزات هیستوشیمیایی نورون‌های حرکتی نخاع

در طی امبریونز موش

دکتر علیرضا فاضل^۱، دکتر محمدرضا نیکروش^۲، دکتر مهدی جلالی^۲

چکیده

مقدمه و هدف: مطالعات مختلف نشان داده است که ترکیبات قندی در بسیاری از پدیده‌های بیولوژیکی دارای نقش کلیدی و بسیار بااهمیتی هستند. تا آنجایی که هرگونه اختلال در ظهور و یا زمان ظهور این ترکیبات می‌تواند اثرات نامطلوب بر تکامل جنین داشته باشد. لذا تکامل طبیعی در گرو ظهور به موقع آن دسته از گلیکوکانزوگیت‌هایی است که در پروسه‌های تکاملی نقش کلیدی دارند. بنابراین شاید بتوان گفت که شکل‌گیری نورون‌های حرکتی شاخ قدامی نخاع در گرو تغییرات وسیعی است که در ترکیبات قندی سطح این سلول‌ها و ماده خارج سلولی آنها به وقوع می‌پیوندد.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش که روی جنین موشهای نژاد Balb/c انجام پذیرفت، طی روزهای نهم تا چهاردهم حاملگی جنین‌ها جمع‌آوری شده و پس از عمل فیکساسیون که با نرمالین و B4G انجام گرفت و آماده‌سازی بلوک‌های پارافینی، اقدام به تهیه برش‌های ۵ میکرونی گردیده و جهت بررسی هیستوشیمیایی با لکتین WFA رنگ‌آمیزی شدند. در این نمونه‌ها برای رنگ‌آمیزی زمینه از آلسین بلو با $PH = 2/5$ نیز استفاده شد. همچنین برای بررسی و مقایسه ترکیبات قندی، بعضی از نمونه‌ها فقط در مجاورت آلسین بلو قرار گرفتند. سپس یافته‌های حاصل از این پژوهش براساس عکس‌العمل سلول‌ها، نسبت به لکتین درجه بندی شده و به وسیله آزمون کروسکال‌والیس مورد بررسی آماری قرار گرفتند. یافته‌ها: نتایج مربوط به این مطالعه نشان داد که اولین عکس‌العمل سلول‌های پیش‌ساز نورون‌های حرکتی در طی روز سیزدهم جنینی به صورت پراکنده در حاشیه شاخ قدامی نخاع ظاهر می‌شود. در طی روز چهاردهم بر تعداد این سلول‌ها افزوده شده و با قدری تاخیر، سلول‌های بخش قدامی نخاع و استپاله‌های مربوط به آنان نیز با این لکتین واکنش مثبت نشان می‌دهند تا آنجا که در اواخر روز چهاردهم حاملگی به میزان قابل توجهی بر تعداد این سلول‌ها افزوده می‌شود. در طی این فرایند بافت‌هایی که در مجاورت سلول‌های پیش‌ساز نورون‌های حرکتی واقع شده‌اند، فاقد عکس‌العمل با این لکتین هستند که احتمالاً ممکن است سلول‌های پشتیبان بافت عصبی آینده و یا نورون‌هایی باشند که در مرحله بعدی تمایزات آنها شروع خواهد شد.

نتیجه‌گیری: این نتایج نشان می‌دهد که N-acetylgalactosamine ممکن است نقش کلیدی در تمایز نورون‌های حرکتی شاخ قدامی نخاع داشته باشد.

واژه‌های کلیدی: صفحه کفی، میان‌کنش‌های سلولی، لکتین هیستوشیمی، نورون‌های حرکتی

۱- استاد گروه علوم تشریحی دانشکده پزشکی مشهد، نشانی: مشهد، خ دانشگاه، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، دانشکده پزشکی

گروه علوم تشریحی، تلفن: ۰۵۱۱-۸۵۴۴۰۸۱-۴، نمابر: ۸۵۹۱۹۲۲، E.mail: fazelalireza@hotmail.com

۱- دانشیار گروه علوم تشریحی دانشکده پزشکی مشهد

مقدمه

برای شکل‌گیری سیستم عصبی مرکزی پدیده‌های اساسی تکاملی متعددی باید به وقوع بپیوندند تا زمینه شکل‌گیری این دستگاه را فراهم آورد. یکی از این پدیده‌های کلیدی که موجبات تبدیل سلول به بافت و بافت را به اندام فراهم می‌نماید، میان‌کنش‌های سلولی^۱ می‌باشد (۱). این پدیده باعث به وجود آمدن نورواکتودرم و لوله عصبی می‌شود که از آن قسمت‌های مختلف دستگاه عصبی به وجود می‌آید، میان‌کنش‌های سلولی در طی تکامل سیستم عصبی بسیار پیچیده بوده و در این میان مولکول‌های متعددی در زمان‌های حساس فعال شده و موجبات بروز روند مورفوژنز لوله عصبی و به وجود آمدن سه لایه اپاندیمال، مانتل و مارژینال را فراهم می‌آورد (۲ و ۴). نکته قابل توجه در این میان دستیابی به این سؤالات اساسی است که چه عواملی در ظهور نواحی حرکتی و حسی دخیل می‌باشد و در این میان عوامل مؤثر در شکل‌گیری ناحیه حرکتی نخاع کدامند؟

مطالعات نشان داده است که یکی از عواملی که پس از شکل‌گیری لوله عصبی در القاء نواحی مختلف آن مؤثر واقع می‌شود وجود زائده نوتوکورد و اثرات القایی مربوط به آن است (۵). در این رابطه از اثرات القایی نوتوکورد در بخش‌های شکمی لوله عصبی و نهایتاً تمایز صفحه کفی Floor plate می‌توان به عنوان بخشی از وقایع حساس تکامل لوله نام برد (۶ و ۸). مطالعات قبلی ما در این زمینه بیانگر تاثیر صفحه کفی بر تمایز و شکل‌گیری صفحه قاعده‌ای می‌باشد که بازگوکننده نقش گلیکوکونژوگیت‌ها در طی تمایز لوله عصبی است (۹ و ۱۰ و ۱۱). اما در مورد تاثیرگذاری صفحه کفی به سلول‌های نورواکتودرمی و تبدیل آنها به صفحه کفی که خود پیش‌ساز نواحی حرکتی می‌باشند هنوز مطالعات

گسترده‌ای صورت نگرفته است. لذا با توجه به مطالعات قبلی که نشانگر واکنش اختصاصی لکتین با قند انتهایی N-acetylgalactosamine در سلول‌ها و ماده خارج سلولی ناحیه نوتوکورد و صفحه کفی است، در این پژوهش سعی گردید تا مطالعه هیستوشیمیایی بررسی و توزیع گلیکوکونژوگیت‌ها بعد از شکل‌گیری و تمایز صفحه کفی در ناحیه صفحه قاعده‌ای مورد مطالعه و ارزیابی قرار گیرد تا به این سؤال پاسخ داده شود که آیا گلیکوکونژوگیت‌های خاصی همانند صفحه کفی در شکل‌گیری و روند تمایز نورون‌های حرکتی دخالت دارند و اگر چنین است چه نوع گلیکوکانجوگیت اختصاصی در این پدیده درگیر است؟

مواد و روش‌ها

در این پژوهش از ۳۰ سر موش نژاد Balb/c که از مرکز سرم‌سازی رازی تهیه شده و در شرایط استاندارد آزمایشگاهی نگهداری و مورد مراقبت قرار گرفته بودند، استفاده شد. پس از جفت‌گیری و مشاهده پلاک واژن، روز صفر حاملگی در هر یک از نمونه‌ها تعیین گردید و در طی روزهای نهم تا چهاردهم حاملگی تحت بیهوشی که با استفاده از کلروفورم صورت گرفت، جنین‌ها به سرعت از پرده‌های جنینی خارج و پس از شستشو با سرم فیزیولوژی به فیکساتور منتقل شدند. تعداد جنین‌ها به ازای هر یک از روزهای فوق‌الذکر ۲۴ عدد بوده است. در این پژوهش از فیکساتور نرمالین و B4G (محلول ۶ درصد کلر و جیوه، ۱ درصد استات سدیم و ۱/۰ درصد گلو تارالدئید در آب مقطر) استفاده گردید. بعد از این که نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در فیکساتور قرار داده شدند، با استفاده از روش‌های معمول بافت‌شناسی از این جنین‌ها در موقعیت‌های ترانسورس و ساژیتال اقدام به تهیه بلوک‌های پارافینی شد و آنگاه برش‌های سریال ۵ میکرونی تهیه گردید.

لکتین مورد استفاده در این پژوهش WFA بود که با HRP

^۱ Cell interactions

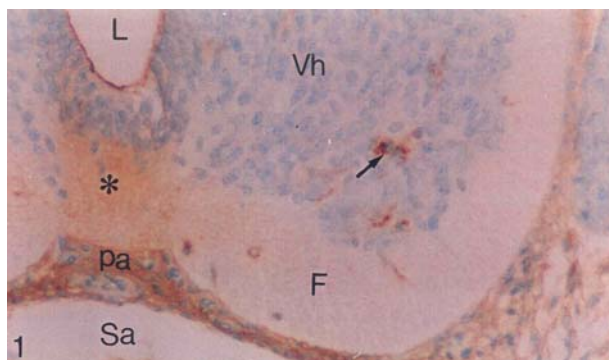
کونژوگه شده بود. این لکتین که از طریق هلال احمر از شرکت Merk خریداری گردیده بود، به منظور انجام پروسه لکتین هیستوشیمی در محلول ۰/۱ مولار PBS رقیق گردید. به گونه‌ای که هر میلی‌لیتر آن دارای ۱۰ میکروگرم لکتین بود. آنگاه مقاطع پس از حذف پارافین و آبدهی، به منظور حذف املاح اضافی جیوه به مدت ۱۰ دقیقه در محلول لوگل قرار داده شدند و پس از شستشوی بافت‌ها با محلول PBS به مدت ۲ ساعت در معرض لکتین قرار گرفتند. در خاتمه پس از شستشوی برش‌ها با PBS به مدت ده دقیقه در معرض محلول PBS که حاوی ۰/۳ درصد دی‌آمینوبنزیدين و ۰/۱ درصد آب اکسیژنه بود قرار گرفتند. پس از شستشوی مجدد نمونه‌ها با PBS و آب جاری با آلین بلو با $\text{PH} = ۲/۵$ رنگ‌آمیزی شدند. سپس برش‌های مورد نظر توسط همکاران طرح به صورت جداگانه مورد بررسی قرار گرفته و به وسیله میکروسکوپ BH2 تصویربرداری شد. براساس واکنش آنها به لکتین رتبه‌بندی شدند و نتایج حاصل جهت مطالعه آماری با استفاده از آزمون کروسکال والیس مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت (۹-۱۱). ضریب اطمینان مطالعه ۹۵ درصد بوده است.

یافته‌ها

تکامل دستگاه عصبی موش از روز هفتم و تحت تاثیر اثرات القایی نوتوکورد آغاز شد و نواودان عصبی Neural groove که پیش در آمد پیدایش لوله عصبی است در سطوح پشتی جنین شروع به ظاهر شدن نمود. در طی روز دوازدهم جنینی مقطع عرضی نخاع دارای دو لایه سلولی تشخیص داده شد که اپاندیمال و مانتل (ماده خاکستری آینده) نامیده می‌شوند. یک لایه نازک مارژینال که در آینده ماده سفید را خواهد ساخت در روزهای بعد در خارج دو لایه اولیه ظاهر می‌شود. بررسی برش‌های مربوط به این ناحیه نشان می‌دهد که این لایه در صفحه کفی دارای تراکم بیشتری در

مقایسه با صفحه بالی می‌باشد.

همچنین نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که تا روز سیزدهم جنینی نواحی فوق‌الذکر دارای عکس‌العمل مثبتی با آلین بلو بوده در حالی که واکنش لوله عصبی و نخاع فاقد واکنش با لکتین می‌باشد. در طی روز سیزدهم جنینی برخی از سلول‌های حاشیه‌ای مانتل در ناحیه‌ای که شاخ قدامی نخاع را خواهد ساخت واکنش شدیدی با لکتین WFA از خود نشان دادند در حالی که بخش عمده سلول‌های این ناحیه و ماده خارج سلولی مجاور فاقد واکنش مثبت می‌باشند. در طی این روز همچنین سطح لومینال لایه اپاندیمال دارای عکس‌العمل مثبت با این لکتین می‌باشند (تصویر ۱).

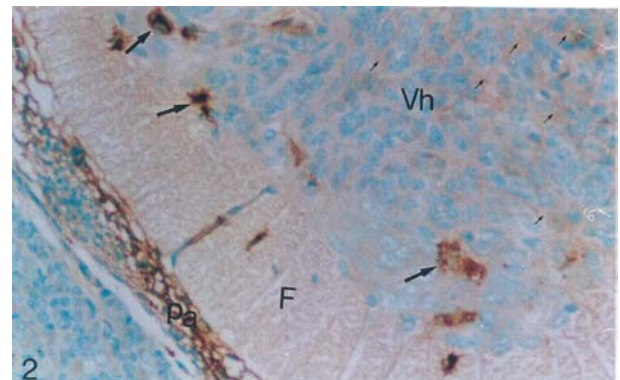


تصویر ۱: مقطع عرضی نخاع جنین ۱۳ روزه موش.

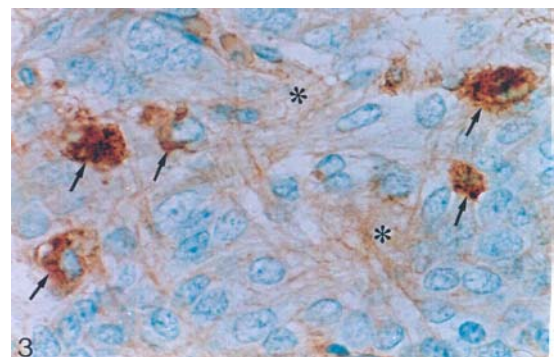
در این نما تعداد محدودی از سلول‌های پیش ساز نورون‌های حرکتی (فلش) که به صورت پراکنده با لکتین WFA شدیداً واکنش نشان داده‌اند دیده می‌شوند. در این تصویر ماده خارج سلولی در محدوده صفحه کفی لوله عصبی دارای واکنش مثبتی هستند (ستاره). علاوه بر این نرم شامه (Pa) به خصوص در محدوده طناب‌های قدامی نخاع دارای واکنش شدیدی نسبت به این لکتین می‌باشد. این واکنش به تدریج در نرم شامه ناحیه خلفی طرفی لوله عصبی کاهش می‌یابد. در این ناحیه واکنش شدید لایه اپاندیمال نیز مشاهده می‌شود. (Vh) شاخ قدامی نخاع، (F) طناب قدامی، (Sa) فضای زیر عنکبوتیه (درشت‌نمایی ۱۵۰)

در طی اوایل روز چهاردهم سلول‌هایی که احتمالاً پیش ساز نورون‌های حرکتی شاخ قدامی نخاع هستند و دارای تراکم زیادی در بخش حاشیه‌ای طناب قدامی می‌باشند دارای واکنش شدیدی با لکتین می‌باشد در حالی که طی این روز سلول‌های بخش مرکزی طناب قدامی شروع به بیان گلیکوکونژوگیت‌ها با قند انتهایی N-acetylgalactosamine

می نمایند که در نتیجه دارای عکس العمل ضعیفی با لکتین فوق می باشد (تصاویر ۳ و ۲).



تصویر ۲: مقطع عرضی نخاع جنین ۱۴ روزه موش.
در این تصویر نیز سلول های پراکنده درشتی که در حاشیه شاخ قدامی نخاع (Vh) دیده می شوند که منطقه گلژی آنها با لکتین WFA به شدت واکنش داده اند (فلش های بزرگ). در نواحی عمقی تر این بخش از نخاع ماده خارج سلولی (فلش های کوچک) نیز با واکنش کمتری نسبت به این لکتین قابل مشاهده است. در این تصویر نیز ماده سفید (F) بر این لکتین واکنش نداده است در حالی که نرم شامه مجاور آن به شدت واکنش داده است (درشت نمایی ۴۰۰)



تصویر ۳: بزرگنمایی بیشتر، تصویر ۲ در ناحیه شاخ قدامی نخاع. سلول هایی که در مقایسه با سلول های مجاور درشت تر به نظر می رسند (فلش ها) نسبت به لکتین WFA شدیداً واکنش داده اند. همان گونه که در تصویر مشاهده می شود این واکنش به خصوص در ناحیه گلژی این سلول ها دیده می شود. در همین ناحیه استتاله هایی (ستاره) که دارای واکنش مثبت هستند نیز دیده می شوند. (درشت نمایی ۱۰۰۰)

در اواخر روز چهاردهم به میزان سلول هایی که با این لکتین واکنش نشان می دهد به میزان قابل ملاحظه ای افزوده می شود که این افزایش به لحاظ آماری معنی دار است ($P < 0.05$). این روند با درجات خفیف تری در استتاله های این

سلول ها نیز به چشم می خورد. شایان ذکر است که در حفاصل سلول های پیش ساز نورو ن های حرکتی در طی روزهای فوق الذکر سلول هایی وجود دارند که فاقد عکس العمل با این لکتین می باشند که چنین به نظر می رسد که این سلول ها پیش ساز سلول های پشتیبان در نواحی فوق باشد.

بحث

پس از شکل گیری لوله عصبی و به وجود آمدن لایه های مختلف آن، تمایز سلول های عصبی یکی از مراحل حساس و بحرانی در شکل گیری نخاع می باشد که در نهایت منجر به ظهور هسته های متفاوت با عملکردهای مختلف حسی، حرکتی و خود مختار می شود. بررسی مقاطع میکروسکوپی جنین موش در طی روزهای مختلف نشان داد که روند شکل گیری نواحی حرکتی و متعاقباً هسته های حرکتی در نخاع موش از اوایل روز سیزدهم جنینی شروع می شود و اولین عکس العمل ها که مبین شروع تمایز در این سلول ها می باشند در سلول های حاشیه ای ناحیه شاخ قدامی نخاع انجام می شود. در طی روز بعد بر میزان این سلول ها افزوده شده ضمن این که سلول های بخش مرکزی این ناحیه نیز عکس العمل ضعیف تری با این لکتین نشان می دهند. این پیشامدها مبین چندین واقعه است که می توان از ابعاد مختلف آن را مورد بررسی قرار داد. با مراجعه به منابع مختلف نظر به این که ماهیت این نوع سلول ها ناشناخته بوده و تاکنون مطالعه ای در این زمینه صورت نگرفته است و این که چرا این عکس العمل ها از ناحیه سطحی شروع شده و سپس به نواحی عمقی هم گسترش می یابد (۱۲)، به این دلیل است که در طی شکل گیری لوله عصبی، تکثیر سلول های اپاندیمال و مهاجرت آنها به عمق شکل گیری لایه مانتل منجر می شود که در آینده ماده خاکستری نخاع را خواهد ساخت (۱۳). لذا با توجه به این که سلول هایی که در ناحیه سطحی مانتل قرار دارند نسبت به

سلول‌های عمقی‌تر، مسن‌تر می‌باشند، شاید عکس‌العمل به شدت رنگ‌پذیری در این سلول‌ها نسبت به سلول‌های عمقی در این ناحیه قابل توجه باشد.

بعد دیگری که در بروز این وقایع می‌توان به آن اشاره نمود، این موضوع است که در طی تکامل لوله عصبی، اثرات القایی عناصر مجاور به آن از جمله نوتوگورد دارای اهمیت ویژه‌ای می‌باشد (۱۵ و ۱۱). مطالعات تجربی نشان داده است که در غیاب نوتوگورد، سلول‌های صفحه کفی و موتونورون‌ها تمایز نمی‌یابند (۱۶-۱۴). در همین زمینه مشخص شده است که پیوند نوتوگورد می‌تواند با القاء اکتوپیک و بیان گسترده Vhh-1 موجبات تمایز سلول‌های صفحه کفی را به دنبال داشته باشد (۱۲). از طرفی سلول‌های صفحه کفی با بیان ژن‌های HNF-3 α ، HNF-3 β در تمایز نواحی مختلف و از جمله موتونورون‌ها نقش اساسی دارند (۱۴ و ۱۵ و ۱۷ و ۱۸ و ۱۹). مطالعات مربوط به این زمینه نشان داده است که بیان اکتوپیک ژن HNF-3 β منجر به بروز مارکرهای صفحه کفی در سلول‌های ناحیه پستی لوله عصبی می‌شود (۲۰ و ۲۱) و حتی این موضوع به اثبات رسیده است که جوانه خلفی اندام در تمایز صفحه کفی به نوعی ایفای نقش می‌نماید و احتمالاً این سلول‌ها با بیان Shh ممکن است در تمایز صفحه کفی و نواحی حرکتی نقش داشته باشند. اما هنوز مشخص نیست که این سلول‌ها مستقیماً با بیان Shh موجب تمایز موتونورون‌ها می‌شود و یا این که اول موجبات تمایز صفحه کفی را فراهم می‌آورند و در مرحله بعد این صفحه موجب القاء در

منابع

- Development. 1992; 7(4): 507-512.
- 3) Bronner-fraser M, Fraser S. Differentiation of the vertebrate neural tube. Curr Cell Biology. 1997; 9(6): 885-891.
- 4) Wilson D, Wyett DP. Patterns of lectin binding during mammalian neurogenesis. Journal Anatomy.

موتونورون‌ها می‌شود (۱۳ و ۲۲).

با توجه به اثرات القایی فوق در ارتباط با شکل‌گیری نورون‌های حرکتی دو احتمال وجود دارد. اول این که ممکن است این نواحی با بیان ژن‌های مختلف در اولین وهله دارای اثرات القایی روی سلول‌های سطحی ناحیه صفحه کفی را داشته باشند که منجر به عکس‌العمل این سلول‌ها در طی روز سیزدهم جنینی می‌شود و طی روز بعد، سلول‌های عمقی‌تر با تاخیر به این اثر القایی پاسخ داده و شروع به بیان قند مربوطه و عکس‌العمل می‌نمایند. از طرف دیگر ممکن است که نوتوگورد صرفاً موجبات تمایز را در سلول‌های سطحی این ناحیه فراهم می‌آورد و طی مرحله بعد این سلول‌ها با مهاجرت به بخش عمقی‌تر و تجمع در بخش‌های مختلف نخاع موجبات ظهور مراکز حرکتی را فراهم می‌آورد.

تشکر و قدردانی

نتایج حاصل از این مطالعه مربوط به بخشی از یافته‌های طرح پژوهشی با عنوان «مطالعه تمایزات هیستوشیمیایی و ایمونو هیستوشیمیایی تکامل نخاع» است که با شماره ۵/۴۵۳۸ در تاریخ ۱۷/۱۰/۷۹ از طرف معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مشهد به تصویب رسیده است. لذا بدین وسیله از آن معاونت محترم و شورای محترم پژوهشی دانشگاه تشکر می‌شود و خدمات تکنیکی سرکار خانم متجدد در امر کمک به کار آزمایشگاهی و سرکار خانم حسینی به جهت کمک در تایپ مقاله قدردانی می‌شود.

- 1) Poree LR, Schramm LP. Interaction between medullary and cervical regulation of renal sympathetic activity. Brain Res. 1992; 599 (2): 297-301.
- 2) Sporle R, Schughart K. Neural tube morphogenesis. Current Opinion General

- 1995; 186(1): 209-216.
- 5) Gotz W, Quondamatteo F. Glycoconjugate distribution in early human notochord and axial mesenchyme. *Acta Histochemistry*. 2001; 103(1): 21-35.
- 6) Roelink H, Porter J, Chiang C, Tanabe Y, Chang D, Beachy P, Jessell T. Floor plate and motor neuron induction by different concentration of the amino-terminal cleavage product of sonic hedgehog autoproteolysis. *Cell*. 1995; 81(3): 445-455.
- 7) Hirano S, Norita M, Hoshino K, Meguro R. Morphological analysis of the early development of the chick neural tube separated from the floor plate and notochord. *Experimental Neurology*. 1996; 139(2): 317-321.
- 8) Del Brio M, Riera P, Peruzzo B, Rodriguez E. Hindbrain floor plate of the rat: Ultrastructural changes occurring during development. *Microsc Res. Tech*. 2001; 52: 615-626.
- 9) Nikraves M R, Jalali M, Fazel AR. Unique Carbohydrate Appearance of the Floor Plate During Early Neurolation. *Iranian Biomedical Journal*. 2003; 7(3): 133-137.
- ۱۰) نیکروش، محمدرضا. فاضل، علیرضا. جلالی، مهدی. از مزانشیم تا غضروف: مطالعات هیستوشیمی در مزانشیم ناحیه شکمی - داخل لوله عصبی در طی دوران رویانی. *مجله علوم پایه پزشکی ایران*. سال ۱۳۸۱. جلد ۵. شماره ۲. صفحه ۱۰۰ تا ۱۰۶.
- ۱۱) نیکروش، محمد رضا. جلالی، مهدی. فاضل، علیرضا. تغییرات تکاملی گلیکوکانجوگیتها در سلولهای نوروایی تلیوم، نوتوکورد و مزانشیم مجاور آن در اوایل دوران مورفوژنز موش. *نشریه پزشکی یخته*. سال ۱۳۸۱. سال چهارم. شماره ۱۵. صفحه ۱۵۷ تا ۱۶۳.
- 12) Roelink H, Augsburger A, Heemskerk J, Korzh V. Floor Plate and Motor Neuron Induction by vhh-1, a Vertebrate Homolog of hedgehog Expressed by the Notochord. *Cell*. 1994; 76(4): 761-775.
- 13) Jessell TM, Dodd J. Floor plate-derived signals and the control of neural cell pattern in vertebrates. *Harvey Lectures*. 1992; 86(1): 87-128.
- 14) Dirksen ML, Jamrich M. A novel activin-inducible, blas-topore lip specific gene of *Xenopus laevis* contains a fork head DNA- binding domain. *Genes Development*. 2002; 6(4): 599-608.
- 15) Ruiz I, Altaba A, Prezioso VR, Darnell TM. Sequential expression of HNF-3 β and HNF-3 α by embryonic organizing centers: the dorsal lip/node, notochord and floor plate. *Mechanism of Development*. 1993; 44(2): 91-108.
- 16) Bolce ME, Hemmati-Brivanlou A, Harland RM. XFKH2, a *Xenopus* HNF-3 α homologue, exhibits both activin inducible and autonomous phases of expression in early embryos. *Development Biology*. 1993; 160(3): 413-423.
- 17) Sasaki H, Hogan BLM. HNF-3 β as a regulator of floor plate development. *Cell*. 1994; 76: 103-115.
- 18) Strahle U, Blader P, Henrique D, Ingham P. Axial, a target gene of mesoderm and neural induction, shows altered expression in cyclops mutant zebrafish embryos. *Genes Development*. 1993; 7(1): 1436-1446.
- 19) Yamada T, Pfaff SL, Edlund T, Jessell TM. Control of cell pattern in the neural tube: motor neuron induction by diffusible factors from notochord and floor plate. *Cell*. 1993; 73(4): 673-686.
- 20) Knöchel S, Lef J, Klocke B, Hille S, Koster M, Knöchel W. Activin A induced expression of a fork head related gene in posterior chordamesoderm of *Xenopus laevis* embryos. *Medhanism of Development*. 1992; 38(2): 157-165.
- 21) Monaghan AP, Kaestner KH, Grau E, Schütz G. Postimplantation expression patterns indicate a role for the mouse forkhead/HNF-3 α , β and γ genes in determination of the definitive endoderm, chordamesoderm and neuroectoderm. *Development*. 1993; 119(2): 567-578.
- 22) Riddle R, Johnson RL, Laufer E, Tabin C. Sonic hedgehog mediates the polarizing activity of the ZPA. *Cell*. 1993; 75(4): 1401-1416.