Physiology and Pharmacology, 12(1), 1 - 13
Spring 2008 [Article in Persian]

Physiology and Pharmacology

Evaluation of the effect of chick embryonic notochord on neural induction and differentiation of mouse embryonic stem cells

Maryam Anjomshoa[1, 2], Khadijeh Karbalaie[1], Shahnaz Razavi[2] ,Mohammad Mardani[2], Somayeh Tanhaei[1], Mohammad Hossein Nasr-Esfahani[1,*], Hossein Baharvand[3,*]

1. Dept. Stem Cells, Royan Institute, Isfahan Campus,Isfahan, Iran
2. Dept. Anatomical Sciences, School of Medicine, Medical University of Isfahan, Isfahan, Iran
3. Dept. Stem Cells, Royan Institute, Tehran, Iran

Received: 25 Oct 2007 **Revised:** 9 Feb 2008 **Accepted:** 17 Feb 2008

Abstract

Introduction: The aim of this study was to evaluate the ability of the notochord to induce differentiation of mouse embryonic stem cells to neurons and/or motor neurons**.**

Methods: In order to produce embryoid bodies (EBs), mouse embryonic stem cells (ES cells) line Royan B1 were grown in suspension in the absence of LIF for 4 days. Then EBs were divided into 4 groups. EBs in groups 1 and 2 were further cultured in suspension for 4 days in the presence of retinoic acid (RA) while EBs in groups 3 and 4 were cultured in the absence of RA. EBs in groups 1 and 3 were also co-cultured with notochord for 4 more days. Numbers and type of neurons were assessed by immunostaining, flow cytometry and RT-PCR techniques.

Results: EBs in groups 3 and 4 lead to 5 to 6 % neuron production while EBs in the groups 1 and 2 lead to 42 and 55% neuron production, respectively. There was a significant difference ($P < 0.05$) between groups 3 and 4 with groups 1 and 2. Percentage of motor neurons (Hb9 positive) were significantly higher in group 1 (20.4%) compared with other groups (2-3%).

Conclusion: Co-culture of mouse embryonic stem cells in the presence of notochord did not induce neural differentiation of mouse embryonic stem cells, while notochord may direct neural differentiation of mouse embryonic stem cells toward motor neurons.

Key words: Notochord, Neural induction, Embryonic stem cells, Co-culture, Retinoic acid

* Coresponding Author Email: mh_nasr@ med.mui.ac.ir and baharvand50@yahoo.com
Available online @: www.phypha.ir/ppj

فیزیولوژی و فارماکولوژی ۱۲ (۱)، ۱ – ۱۳
بهار ۱۳۸۷

فیزیولوژی و فارماکولوژی

بررسی تأثیر نوتوکورد جنین جوجه در القا و تمایز عصبی سلولهای بنیادی جنینی موش

مریم انجم‌شعاع[۱،۲]، خدیجه کربلایی[۱]، شهناز رضوی[۲]، محمد مردانی[۲]، سمیه تنهایی[۱]، محمد حسین نصراصفهانی[۱*]، حسین بهاروند[۳*]

۱. گروه سلولهای بنیادی، پژوهشکده رویان شاخه اصفهان، اصفهان

۲. گروه آناتومی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان

۳. گروه سلولهای بنیادی، پژوهشکده ی رویان، تهران

دریافت: آبان ۸۶ بازبینی: بهمن ۸۶ پذیرش: بهمن ۸۶

چکیده

مقدمه: هدف این مطالعه بررسی توانایی نوتوکورد در القا سلولهای بنیادی جنینی موش به سلولهای عصبی و تمایزاین سلولها به نورونهای حرکتی بود.

روش‌ها: برای تشکیل اجسام شبه رویانی (EBs)، سلولهای بنیادی جنینی (ES) رده ی Royan B1، به مدت چهار روز در محیط کشت فاقد LIF قرار گرفتند. سپس EBs تشکیل شده به چهار گروه تقسیم شدند، درگروه اول و دوم EBs به مدت چهار روز با اسید رتینوئیک تیمار شدند و در گروه سوم و چهارم تیمار با اسید رتینوئیک صورت نگرفت. علاوه بر این، EBs گروه‌های اول و سوم به مدت چهار روز با نوتوکورد کشت داده شدند، سپس EBs از لحاظ درصد و نوع نورونهای حاصل با استفاده از تکنیکهای RT-PCR، ایمنوسیتوشیمی و فلوسیتومتری مورد بررسی قرار گرفتند.

یافته‌ها: میانگین درصد نورون‌ها در گروه‌های ۱، ۲، ۳ و ۴ به ترتیب ۵۵، ۴۲، ۶ و ۵ درصد بود و از این نظر بین گروه‌های ۱و۲ با گروه‌های ۳و ۴ اختلاف معنی داری ($P<0.05$) دیده شد. درصد نورونهای حرکتی (Hb9 مثبت) در گروه ۱ (۲۰/۴٪) نسبت به سایر گروهها (۳-۲٪) افزایش چشمگیری داشت.

نتیجه‌گیری: نوتوکورد قادر به القای عصبی سلولهای بنیادی جنینی موشی نمی‌باشد، اما قادر به تمایز سلولهای پیشساز عصبی به نورونهای حرکتی می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: نوتوکورد، القای عصبی، سلولهای بنیادی جنینی، هم کشتی، اسید رتینوئیک

مقدمه

در طی تکامل جنین واکنشهای القایی زیادی وجود دارند که در این واکنشها سیگنال‌هایی از یک گروه سلولی روی گروه سلولی دیگری که معمولا" در مجاورت آنها قرار دارند تأثیر گذاشته و باعث تمایز آنها می‌شوند. در بین این واکنشها، بیشتر توجه جنین شناسان به القای عصبی معطوف شده است [۱۵]. تاکنون تحقیقات زیادی برای مشخص کردن بافت و یا بافتهایی که در القای عصبی نقش دارند انجام شده است و از آنجایی که نوتوکورد در کل دوره نورولاسیون ارتباط نزدیکی با صفحه عصبی در حال تکامل داشته [۳۰]، در تحقیقات فراوانی، نقش آن در القا و تمایز بافت عصبی مورد بحث و بررسی قرار گرفته است.

یکی از بارزترین وقایع تکاملی در جنین مهره‌داران، تشکیل نوتوکورد در مرحله‌ی گاسترولاسیون می‌باشد. نوتوکورد از مرکز سازمان دهنده، که در جنین دوزیستان لبه‌ی پشتی بلاستوپور و

* نویسندهٔ مسئول مکاتبات: mh_nasr@ med.mui.ac.ir and baharvand50@yahoo.com

وبگاه مجله: www.phypha.ir/ppj

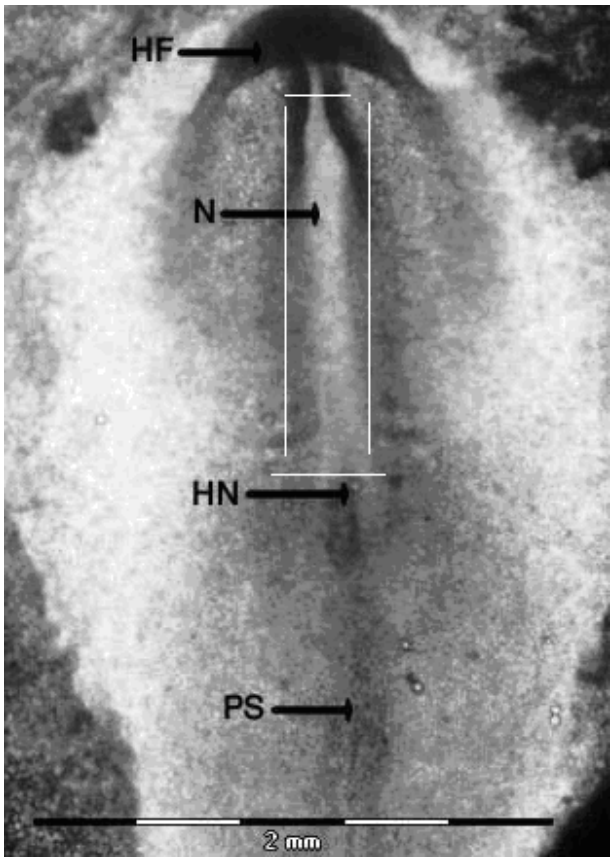
در جنین آمنیون داران گره هنسن نامیده می‌شود، بوجود می‌آید [۳۲] و در مهره داران اولیه مانند بی آروارگان (لمپری) در تمام طول زندگی وجود داشته، اما در مهره داران عالی ساختمانی موقتی می‌باشد، به این ترتیب که درنواحی تشکیل مهره‌ها استخوانی شده [۲] و در مرکز دیسکهای بین مهره‌ای باقی مانده و نوکلئوس پالپوزوس را تشکیل می‌دهد [۳۱].

در مهره‌داران عالی دو نقش مهم به نوتوکورد نسبت داده شده است. اولین نقش نوتوکورد، نقش ساختمانی آن است که به عنوان یک اسکلت محوری تا زمان تشکیل سایر ساختمانها مانند مهره ها، عمل می‌کند. نقش دوم و مهمترآن عمل کردن به عنوان یک مرکز سازمان دهنده است، به این ترتیب که با ترشح مولکولهای مختلف روی اکثر بافتهای اطراف خود از جمله صفحه‌ی عصبی، سومیتها، جوانه‌ی خلفی پانکراس و عروق خونی اثرمی گذارد [۳۲]. در مورد نقش نوتوکورد در القا و تمایز لوله ی عصبی اختلاف نظر وجود دارد. مطالعات اسپمان ومحققان بعدی روی جنین دوزیستان منجر به ایجاد این نظریه شد که مهم ترین واقعه در شروع نوروژنز تشکیل نوتوکورد است که باعث تبدیل بخشی از اکتودرم به صفحه ی عصبی می‌شود. تحقیقات اولیه در پرندگان و پستانداران نیز نشان داد که در آمنیون داران نیز مانند دوزیستان، نوتوکورد قادر به القای اکتودرم به صفحه عصبی بوده (۱۶) و بعد از تشکیل صفحه ی عصبی، باعث الگو یابی لوله عصبی اولیه در ساقه مغز و طناب نخاعی می‌شود (۳۸). در مقابل بعضی از دانشمندان معتقدند که نوتوکورد در القای عصبی اولیه نقش نداشته و تنها در تشکیل انواع سلولهای بخش شکمی لوله ی عصبی نقش دارد [۱۷]. جهت بررسی نقش نوتوکورد در القا و یا الگو دهی بافت عصبی، از روش‌های متفاوتی استفاده شده است. به این ترتیب که در بعضی آزمایشات، نوتوکورد را از جنین جدا کرده و به پیامدهای حذف نوتوکورد پرداخته شده است [۱۲] و در برخی دیگر نوتوکورد را با قطعات بافتی مختلف از جمله صفحه‌ی عصبی هم کشتی داده‌اند [۲۷]. با توجه به نتایج به دست آمده از تحقیقات مختلف در مورد نقش نوتوکورد در القا و تمایز بافت عصبی اظهارات متناقضی بیان شده است.

سلولهای بنیادی یک مدل آزمایشگاهی با ارزش برای بررسی تأثیر فاکتورهای مختلف مؤثر در مراحل اولیه‌ی تکامل پستانداران می‌باشند [۲۲]. این سلولها، سلولهایی پر توان هستند که از توده سلولی داخلی بلاستوسیست قبل از لانه گزینی و یا از اپی بلاست جدا می‌شوند [۲۳] و قادرند با حفظ ظرفیت پر توانی خود در حالت تمایز نیافته، توانایی تقسیم خود را تا مدت نامحدودی حفظ نمایند. این سلولها در شرایط مناسب، قادر به تمایز به انواع سلولها مانند سلولهای قلبی [۲۹]، سلولهای پوست [۴] و سلولهای عصبی [۵] می‌باشند. تحقیقات مختلف نشان داده‌اند که می‌توان از سیستم‌های هم کشتی سلولهای بنیادی جنینی با سلولها و یا قطعات بافتی مختلف، به منظور بررسی تمایز سلولی استفاده کرد و مشخص شده در این سیستم ها، سلولها از وقایع تکوینی موجود زنده تقلید می‌کنند [۸]. با توجه به اینکه بافتهای جنین جوجه اثرات القایی روی بافتهای پستانداران داشته، از معادل موشی خود بزرگتر بوده و به راحتی از جنین جدا می‌شوند، در اکثر سیستم‌های هم کشتی از بافت‌های این جنین‌ها استفاده شده است [۲۵، ۳۴]. در این مطالعه برای نشان دادن نقش نوتوکورد در القا و تمایز سلولهای عصبی، برای اولین بار از هم کشتی نوتوکورد جنین جوجه و سلولهای بنیادی جنینی موشی به منظور بررسی نقش نوتوکورد در القا وتمایز سلولهای عصبی استفاده شد.

مواد و روش‌ها

مواد مورد استفاده در این مطالعه عبارت بودند از: محیط L15 (Gibco, 41300-021)، آنزیم دیسپاز (Gibco, 17105-041)، DMEM (Gibco, 10829 – 018)، سرم جنین گوساله (Fetal Calf Serum; FCS, Gibco, 10439-024)، پنی سیلین– استرپتومایسین (Gibco, 15140 – 0148)، اسیدآمینه های غیر ضروری (Sigma, M 7145)، بتامرکاپتواتانول (Sigma, M 7522)، فاکتور مهار کننده لوکمی (Leukemia inhibitory Factor; LIF, Chemicon, ESG1107)، ال– گلوتامین (Gibco, 25030-024)، انسولین– ترانسفرین– سلنایت سدیم (Gibco, 41400-045)، پروپیدیوم یدید(Sigma,P4170) ، اسید رتینوئیک (Retinoic Acid; RA, Sigma, R2625)، آلژینیت (Sigma, A7003)، کلرید سدیم (Sigma, S5886)، کلرید کلسیم (Sigma C7902)، ژلاتین (Sigma G2500)، DMEM-F12 (Gibco, 31331-023)، آنتی بادی اولیه MAP2 (Microtubule associated



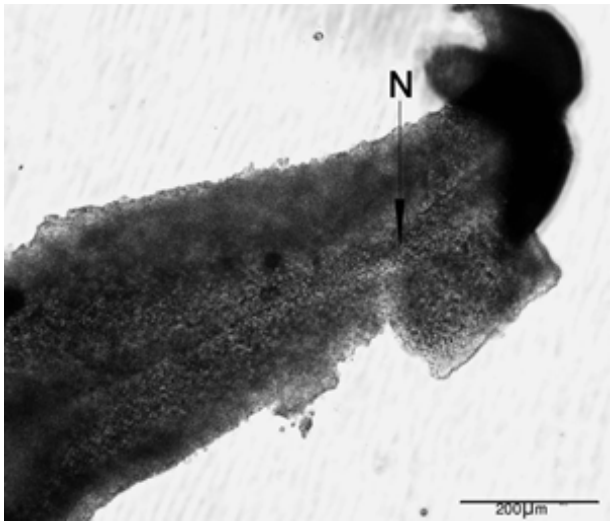
شکل ۱- جنین جوجه در مرحله HH ۶ (مرحله ی چین سری)، جلوی گره هنسن، در بخش میانی جنین نوتوکورد به صورت میله‌ای متراکم قابل مشاهده است. خطوط سفید رنگ محدوده ی برش را نشان می‌دهد. HF: چین سری، N- نوتوکورد، HN، گره هنسن، PS- شیار اولیه

protein 2, Sigma, M1406)، آنتی بادی اولیه Hb9 (Sigma, H1413)، آنتی بادی ثانویه FITC (Sigma, F1262)، EDTA(Sigma, E6758)، آنتی بادی ثانویه FITC (Chemicon, AP106F)، کیت RNeasy (Qiagen, 74104)، Dulbecco´s phosphate buffered saline (Gibco, 21600-051)، آنزیم DNaseI (Fermentase)، کیت Revert AidTM First strand cDNA Synthesis (Fermentase, 1622)، آنزیم SmarTag (سیناژن)، X100 Triton (Sigma, T8787)

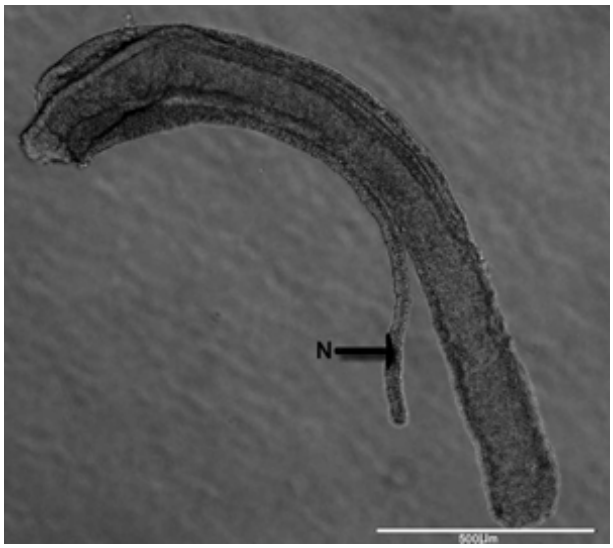
روشهای انجام مراحل مختلف تحقیق عبارت بودند از:

انکوباسیون تخم مرغ: تخم مرغ‌های نطفه دار از مرکز اصلاح نژاد مرغ بومی اصفهان خریداری و در درجه حرارت ۳۸ درجه سانتی گراد و رطوبت نسبی ۶۰ درصد در اتمسفر هوا انکوبه شدند. زمان مناسب انکوبه کردن تخم مرغ‌ها برای رسیدن به مرحله تکاملی مورد نظر با استفاده از جدول همبرگر و همیلتون (HH) بدست آمد [۹]، از آنجایی که نوتوکورد دارای خواص القاء کنندگی از مرحله ۶ HH بوده و آن را تا زمان بسته شدن لوله ی عصبی حفظ می‌کند، از نوتوکورد مراحل ۱۰-۶ HH (۲۰ تا ۳۰ ساعت پس از انکوباسیون) استفاده شد [۱۸، ۲۷].

جدا نمودن جنین جوجه از روی سطح زرده: بعد از گذشت زمان لازم و خارج نمودن تخم مرغها از انکوباتور آنها را بصورت افقی روی سطح صافی به حالت سکون قرار داده، در این وضعیت جنین‌ها روبه بالا قرار می‌گیرند. پس از شکستن تخم مرغ‌ها در پتری دیش‌های استریل ۱۰ سانتیمتری قرار گرفتند. به کمک حلقه کاغذی استریل جنینها از سطح زرده برداشته شده و به محیط L15 سرد انتقال داده شدند. سپس در زیر استریو میکروسکوپ الیمپوس مدل SZX12 جنینها از لحاظ مرحله‌ی تکوینی مورد بررسی قرار گرفتند و جنین‌های مناسب انتخاب شدند. نوتوکورد به صورت میله‌ای متراکم و پررنگ در جنین در جلوی گره‌ی هنسن قابل مشاهده بود (شکل A-۱). جدا نمودن نوتوکورد از جنین جوجه: به منظور جدا نمودن نوتوکورد از بافتهای اطراف از روش پلازک استفاده شد [۲۶]، بطور خلاصه روش کار به این ترتیب بود: با کمک سوزن‌های ظریف دو برش به صورت عرضی یکی در جلوی گره‌ی هنسن و دیگری در انتهای سری نوتوکورد و دو برش طولی در دو طرف نوتوکورد ایجاد کرده (شکل ۱) ونوتوکوردهای جدا شده (شکل ۲) را به محیط L15 سرد انتقال داده، در مرحله ی بعد جهت جدا کردن نوتوکورد از بافتهای اطراف، قطعات جدا شده به مدت



شکل ۲- بخش میانی در جلوی گره هنسن از جنین جدا شده است. N- نوتوکورد



شکل ۳- قطعه ی نوتوکوردی بعد از تیمار با آنزیم دیسپاز، نوتوکورد (N) در حال جدا شدن از بافتهای اطراف است.

۱۵ دقیقه در محیط L15 حاوی ۰/۵ mg /mL آنزیم دیسپاز قرار گرفتند. سپس قطعات بافتی جدا شده را به محیط L15 سرد که برای خنثی نمودن آنزیم، حاوی سرم بود انتقال داده و ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه ی سانتی گراد نگهداری شدند. پس از این مرحله مجددا" با کمک سوزن‌های ظریف تا حد امکان بافتهای اطراف نوتوکورد را جدا کرده (شکل ۳) و سپس نوتوکوردهای مذکور را از یک پیپت پاستور که انتهای آن با استفاده از شعله باریک شده است، چندین بار به آرامی عبور داده و نهایتا" نوتوکوردهای جدا شده در محیط L15 سرد قرار داده شدند.

کشت سلولهای بنیادی جنینی: در این طرح از سلولهای بنیادی جنینی Royan B1 مشتق از موش نژاد C57 BL/6 استفاده شد. این سلولها روی سلولهای فیبروبلاستی جنینی موش، به عنوان لایه ی تغذیه کننده و در محیط کشت سلولهای بنیادی کشت داده شدند. این محیط از Knockout DMEM همراه با پنی سیلین- استرپتومایسین ۱ درصد، اسیدآمینه‌های غیر ضروری ۰/۱ mM، بتامرکاپتواتانول ۱۰۰ µM، سرم جنین گوساله ۱۵ درصد، ال- گلوتامین ۲ mM و فاکتور مهار کننده لوکمی ۱۰۰۰U/ml تشکیل شده است.

جهت تشکیل EBs به ازای هر میلی لیتر از محیط کشت سلولهای بنیادی فاقد LIF، تعداد ۵۰/۰۰۰ سلول بنیادی جنینی به دیش‌های غیر چسبنده انتقال داده شد. سپس در انکوباتور در دمای ۳۷ °c و CO2 ۵ درصد، به مدت ۴ روز نگهداری شدند، در طی این مدت سلولها بهم چسبیده و EBs را تشکیل دادند. سپس نیمی ازEBs را به مدت ۴ روز تحت تیمار با ۱ میکرومول اسید رتینوئیک (RA)، در محیط کشت سلولهای بنیادی فاقد LIF و نیمی دیگر، در همین محیط ولی بدون RA قرار گرفتند.

قرار دادن نوتوکوردها در دانه‌های آلژینیت: به منظور جدا نمودن قطعات بافتی نوتوکورد از سلولهای بنیادی در هنگام هم کشتی، قطعات بافتی نوتوکورد در دانه‌های آلژینیت قرار داده شدند. آلژینت یک بیوپلیمر طبیعی است که از آن به عنوان یک بستر یا ماتریکس برای به دام انداختن یا تحویل دادن پروتئینها و سلولهای مختلف استفاده می‌شود [۱۱]. در این دانه‌ها نوتوکورد قادر به تماس مستقیم با سلولهای ES نبوده و فقط فاکتورهای ترشحی قابل انتشار آنها می‌توانند بر روی این سلولها تأثیر بگذارند. مراحل انجام کار به این ترتیب بود که قطعات نوتوکورد از محیط 15 به محلول آلژینیت ۱درصد (۱ گرم آلژینیت در کلرید سدیم ۱۵ مولار) انتقال داده شدند، سپس با ۲۰ میکرولیتر از محلول آلژینیت که حاوی ۱۵ تا ۲۰ قطعه نوتوکورد به صورت یک قطره در محلول کلرید کلسیم ۱/۲ مولار قرار گرفتند. بعد از ۱۰ دقیقه محلول کلرید کلسیم را خارج کرده و دو بار با محلول کلرید سدیم ۰/۹ در صد و دو بار با محیط کشت مورد استفاده در مرحله هم کشتی شتشو داده شدند.

هم کشتی نوتوکورد واجسام شبه جنینی: پس از انتقال EBs از هر دو گروه (گروه تحت تیمار و گروه بدون تیمار با RA) به ظروف کشت ۲۴ خانه ای،یک دانه آلژینیت به ازای هر خانه آن به ترتیبی اضافه شد که چهار گروه با تیمارهای مختلف که عبارت بودند از: گروه اول، EBs تیمار شده با RA و تحت هم کشتی با نوتوکورد، گروه دوم EBs تیمار شده با RA، گروه سوم بدون تیمار با RA و تحت هم کشتی با نوتوکورد و گروه چهارم بدون تیمار با RA تشکیل شدند.

محیط کشت مورد استفاده در این مرحله از محیط DMEM- F12 همراه با مکملها ی پنی سیلین- استرپتومایسین ۱ درصد، اسیدآمینه‌های غیر ضروری ۰/۱ mM، سرم جنین گوساله ۱۵ درصد، ال- گلوتامین ۲mM و انسولین، ترانسفرین، سلنایت سدیم۱ درصد تشکیل شده بود.

رورانه تغییرات مرفولوژیکی سلولها در زیر میکروسکوپ اینورت الیمپوس مدلCKX41 مورد بررسی قرار گرفت. از آنجایی که نوتوکورد می‌تواند اثرات القایی خود را بیش از ۱۰۰

ساعت حفظ کند [۲۷] کشت به مدت ۴ روز ادامه یافت. سپس سلولها جمع آوری شده و مورد بررسی قرار گرفتند.

ایمنوسیتوشیمی: مراحل انجام کار بطور خلاصه به این ترتیب بود، ثابت نمودن سلولها با پارافرمالدئید ۴ درصد، نفوذپذیر کردن سلولها با محلول ۰/۲ درصدTriton X100 به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ^{o}C ۴، بلوکه کردن سلولها به مدت ۱ ساعت در دمای ^{o}C ۳۷ در سرم بز ۱۰ درصد، قرار دادن در آنتی بادی اولیه رقیق شده MAP2 (به نسبت ۱ به ۲۰۰) وHb9 (به نسبت ۱ به ۴۰۰) به مدت ۱ ساعت در دمای ^{o}c ۳۷، انکوبه کردن نمونه‌ها با آنتی بادیهای ثانویه FITCبه مدت ۱ ساعت در دمای ^{o}c ۳۷، و در مرحله ی آخر هسته ی سلولها با محلول mg/mL ۰/۲ پروپیدیوم یدید رنگ آمیزی شد. نمونه‌های رنگ شده با میکروسکوپ فلوروسانس الیمپوس مدل BX51 مورد بررسی قرار گرفتند. با استفاده از دوربین الیمپوس مدلDP70 و نرم افزاراولیسیا (Olysia) از نمونه‌ها عکسبرداری شد و درصد سلولهایی که با آنتی بادیهای فوق الذکر رنگ گرفته بودند تعیین گردید.

استخراج RNA و RT-PCR: جهت استخراج RNA از نمونه ها، از کیت RNeasy با توجه به روش پیشنهادی کیت استفاده شد. سپس RNA استخراج شده با آنزیم DNaseIتیمارشد. مقدار ۲ میکروگرم از RNA استخراج شده جهت سنتزcDNA، طبق روش پیشنهادی کیت First strand cDNA Synthesis Kit Revert Aid^{TM} مورد استفاده قرار گرفت.واکنشPCR با پرایمرهای جدول ۱ به کمک آنزیم SmarTag صورت گرفت.

فلوسیتومتری: از این روش به منظور تعیین درصد دقیق سلولهای عصبی و نوع سلولهای عصبی تمایز یافته پس از ۱۲ روز کشت، استفاده شد. به این ترتیب که ابتدا EBs تریپسینه شده و به صورت تک سلولی درآمدند، سپس EBs هر گروه جمع آوری شد و در بافر شستشو قرار گرفتند. بافر شتشو شامل FBS ۱درصد، EDTA mM ۲ و PBS می‌باشد. در مرحله ی بعد سلولها با استفاده از پارافرمالدئید ۴ درصد تثبیت شده و با کمک محلول TritonX100 ۲ درصد نفوذپذیر گشتند، بعد از انکوبه کردن سلولها با سرم بز ۱۰ درصد، آنتی بادی اولیه رقیق شده MAP2 (به نسبت ۱ به ۲۰۰) و Hb9 (به نسبت ۱ به ۴۰۰) به نمونه‌ها اضافه شد و به مدت ۱ ساعت در دمای ^{o}c ۴ قرار گرفتند. در نهایت سلولها با آنتی بادی ثانویه FITC به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ^{o}c ۴ انکوبه شدند و سلولها توسط دستگاه فلوسیتومتر پارتک مورد بررسی قرار گرفتند. داده‌ها توسط نرم افزار فلوماکس e 2.4 آنالیز شدند.

آنالیز آماری: جهت آنالیز آماری و مقایسه ی میانگین سلولهای عصبی در هر گروه، از نرم افزار SPSS ۱۱/۵ و تست آماری ANOVA استفاده شد، مقادیر P<۰/۰۵ به عنوان سطح معنی دار در نظر گرفته شد.

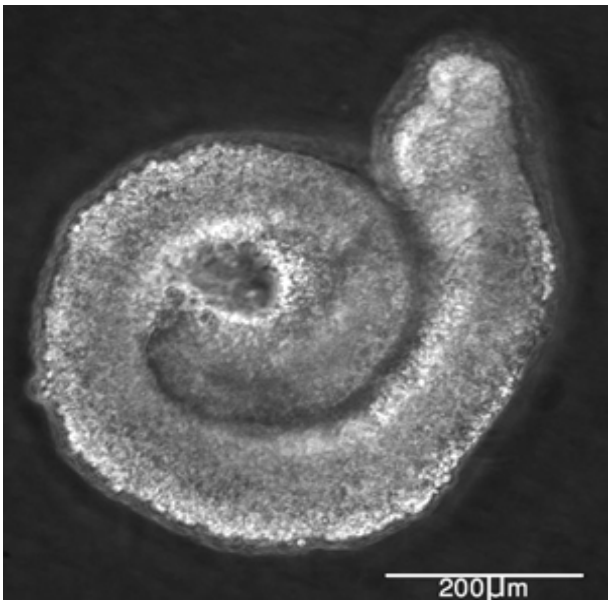
جدول ۱– پرایمرهای مورد استفاده در واکنش‌های PCR.

ژن‌ها	توالی پرایمرها
Oct-4	(F):5'-GCGTTCTCTTTGGAAAGGTGTTC-3'
	(R):5'-CATACTCGAACCCACATCCTTCTCT-3'
Nestin	(F):5'- TCGAGCAGGAAGTGGTAGG-3'
	(R):5'- TTGGGACCAGGGACTGTTA-3'
PAX6	(F):5'-AGAGGACCCATTATCCAGATG-3'
	(R):5'-GCTGACTGTTCATGTGTGTTTG-3'
NKX2.2	(F):5'-AGCCCTTTCTACGACAGCAG-3'
	(R):5'-GCGTCACCTCCATACCTTTCTC-3'
NKX6.1	(F):5'-GACAAAGATGGGAAGAGAAAAC-3'
	(R):5'-GGTCCAGAGGTTTGTTGTAATC-3'
Olig2	(F):5'-GAACCCGATGATCTTTTTCTGC-3'
	(R):5'-CCGTAGATCTCGCTCACCAGTC-3'
MAP2	(F):5'-GTTCCCACGTCTCCACTTCTTC-3'
	(R):5'-CCAGGTCATTCATGTTGCTCTC-3'
α-MHC	(F):5'-CTGCTGGAGAGGTTATTCCTCG-3'
	(R):5'-GGAAGAGTGAGCGGCGCATCAAGG-3'
β-MHC	(F):5'-TGCAAAGGCTCCAGGTCTGAGGGC-3'
	(R):5'-GCCAACACCAACCTGTCCAAGTTC-3'
Pdx1	(F):5'-CGCCACCCCAGTTTACAAGC-3'
	(R):5'-GAACCAGATTTTGATGTGTGTCTCG-3'
Isl1	(F):5'-GACTTTGAGCAAGGGGTTACG-3'
	(R):5'-ACATGAAAAGTGGCAAGTCTCC-3'
Hb9	(F):5'-GGCGCTTTCCTACTCATACC-3'
	(R):5'-TCCTCTTCCGTCTTCTCCTCAC-3'
β-Tubulin	(F):5'-TCACTGTGCCTGAACTTACC-3'
	(R):5'-GGAACATAGCCGTAAACTGC-3'

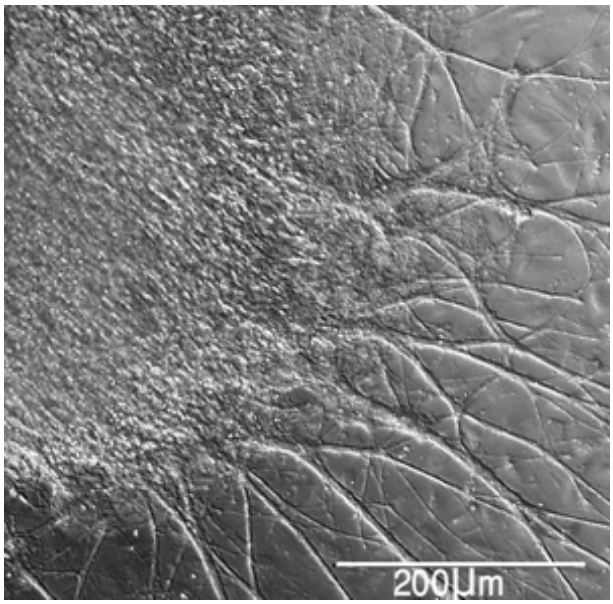
یافته‌ها

نتایج نشان داد که بعد از جدا سازی و کشت قطعات نوتوکوردی حاصل از جنین جوجه، بعضی از ویژگیهای خاص نوتوکورد از جمله ساختمان میله‌ای شکل آن حفظ نشده و معمولا" این قطعات با طول متوسط ۱ تا ۳ میلیمتر به دور خود پیچیده (شکل ۴) وسلولها از بافت اصلی مهاجرت کرده و مرفولوژی آنها بعد از گذشت ۲۴ ساعت تغییر کرد، یکی از دلایل این امر را می‌توان به نحوه ی جدا سازی قطعات و استفاده از آنزیم دیسپاز نسبت داد که باعث از بین رفتن غلاف اطراف نوتوکورد می‌شود.

مرفولوژی گروههای مورد مطالعه با میکروسکوپ اینورت



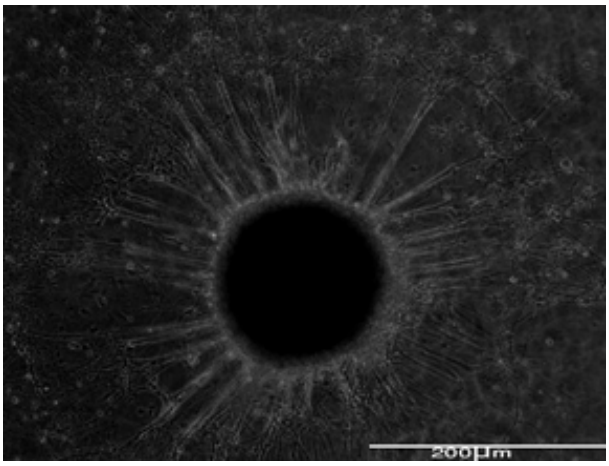
شکل ۴– نوتوکورد بعد از جدا شدن ساختمان میله‌ای خود را حفظ نکرده و به دور خود می‌پیچد.



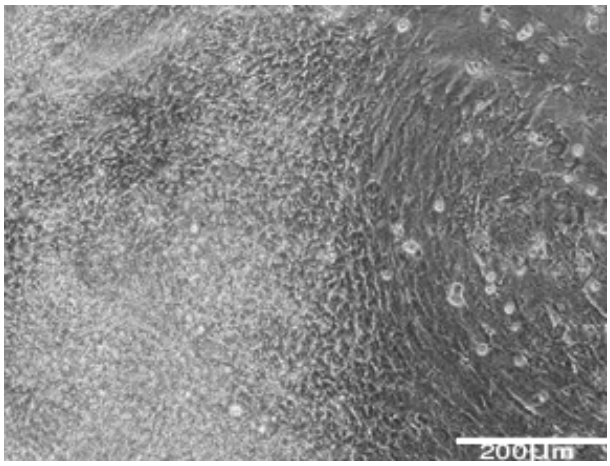
شکل ۵– تمایز سلولها ی EBs در گروه اول، بعد از ۴ روز هم کشتی در EBs این گروه سلولهایی با مرفولوژی نورون قابل مشاهده بود.

نشان داد بعد از ۴ روز کشت سلولهای عصبی به ویژه در گروه اول (شکل۵) و دوم (شکل ۶) قابل مشاهده اند، در گروه سوم اکثر EBs مرفولوژی خاصی نشان نمی‌دهند (شکل ۷) و در گروه چهارم درصد زیادی از EBs دارای ضربان می‌باشند (شکل ۸).

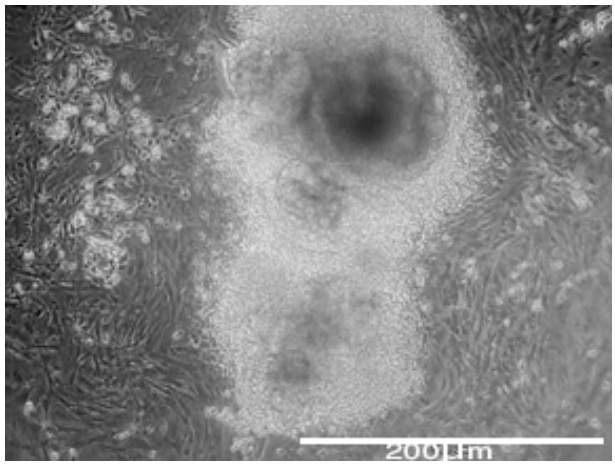
نتایج RT-PCR نشان داد که سلولهای بنیادی مارکرOct4 را بیان می‌کنند (شکل ۹)، این ژن در سلولهای بنیادی بیان شده و نشان دهنده ی پر توانی این سلولها می‌باشد [۳]. بیان این مارکر در سایر گروههای مورد مطالعه نیز دیده شد که نشان می‌دهد سلولهای بنیادی در بین سایر سلولها، با وجود گذشت زمان و تمایز سلولی، وجود دارند. بعد از گذشت ۴ روز و تشکیلEBs، بیان مارکرهای Nestin، α-MHC، β-MHC و Pdx1 نشان دهنده ی تشکیل سلولهایی با منشأ هر سه لایه‌ی زایای جنینی می‌باشند، به این ترتیب که Nestin مارکر خاص لایه‌ی اکتودرمی و سلولهای پیشساز عصبی [۲۱]، α-MHC وβ-MHC مارکر سلولهای مزودرمی [۲۹] وPdx1 مارکر سلولهای اندودرمی می‌باشد [۲۲]. در EBs که به مدت ۴ روز تحت تیمار با RA بودند Nestin و Pax6 بیان شده است، بیان همزمان این دو مارکر نشان دهنده ی تمایز این سلولها به سمت سلولهای پیشساز عصبی است [۳۴]، ولی در EBs که RAدریافت نکرده‌اند مارکرهای هر سه لایه ی زایای جنینی بیان شد که نشاندهنده ی تمایز خود بخود در این گروه است.



شکل ۶– EBs در گروه دوم بعد از کشت، سلولهای با مرفولوژی نورونی مشاهده می‌شوند.

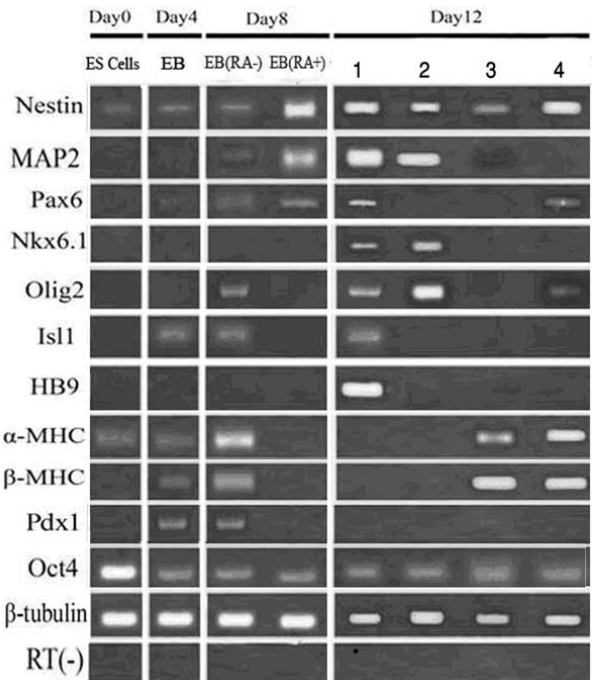


شکل ۷– EBs در گروه سوم بعد از کشت، اکثرا" مرفولوژی خاصی نداشتند.



شکل ۸– EBs در گروه چهارم بعد از کشت، اکثرا" دارای ضربان بودند.

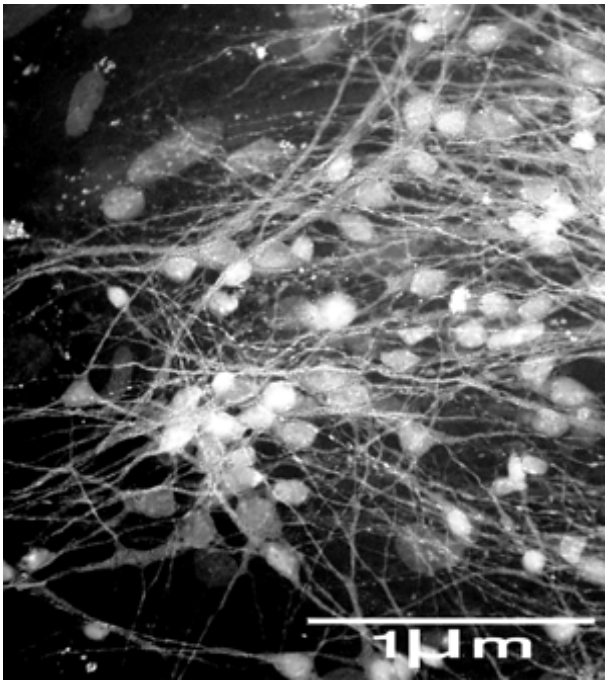
بعد از ۱۲ روز در گروه اول، ژنهای MAP2، Nkx6.1، Isl1، Olig2 و Hb9 بیان شد (شکل۹). MAP2 مشخصه‌ی سلولهای عصبی بالغ [۲۸]، Nkx6.1 مارکر سلولهای پیشساز نورونهای حرکتی [۲۲]، Isl1 مارکر سلولهای اندودرمی و نورونهای حرکتی [۱] و Olig2 مارکر سلولهای پیشساز نورونهای حرکتی و الیگودندروسیتها [۷] و Hb9 مارکر نورونهای حرکتی بالغ می‌باشند [۲۰]. در مجموع این الگوی بیان ژنی نشان میدهد که در این گروه علاوه بر تشکیل سلولهای پیش ساز نورونهای حرکتی، نورونهای حرکتی بالغ نیز تمایز یافته اند.



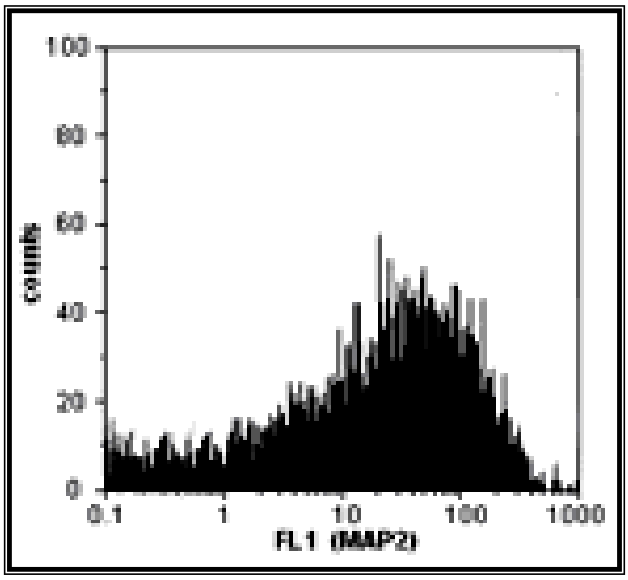
شکل ۹– لگوی بیان ژنها در سلولهای ES و EBs در تیمارهای مختلف بعد از ۴، ۸ و ۱۲ روز

نتایج ایمنوسیتوشیمی (شکل ۱۰) و فلوسیتومتری (شکل ۱۱) نیز نشان داد که در این گروه، سلولهای عصبی $MAP2^+$ ۵۵ درصد کل سلولها را تشکیل داده و درصد نورونهای حرکتی $Hb9^+$ ۲۰/۴ می‌باشد (شکل۱۲و ۱۳).

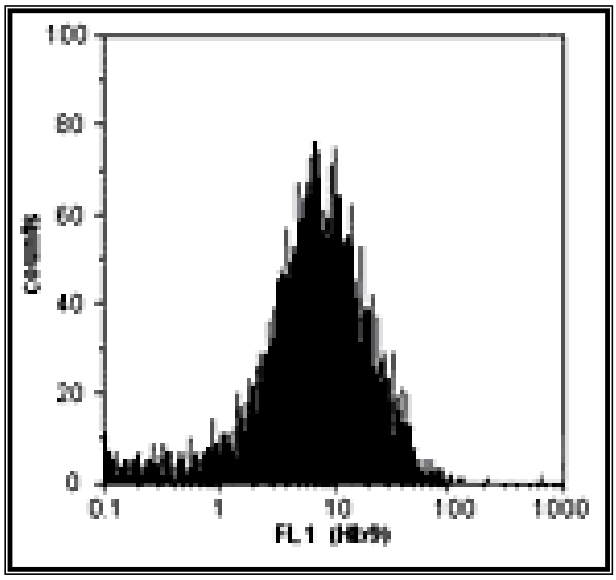
در گروه دوم بیان مارکرهای MAP2، Olig2 و Nkx6.1 (شکل ۹) نشان داد که اکثر سلولهای حاصل احتمالا" الیگودندروسیت و یا سلولهای پیشساز نورونهای حرکتی می‌باشند، ولی سلولهای عصبی حرکتی بالغ در این گروه تمایز نیافته اند. نتایج ایمنوسیتوشیمی (شکل ۱۴) و فلوسیتومتری (شکل ۱۵) نشاندهنده ی حضور ۳۵ تا ۴۲ درصد نورون در این گروه بود ولی درصد نورونهای حرکتی اندک و ۳ درصد کل سلولها را تشکیل می‌داد (شکل ۱۶، ۱۷). بین درصد نورونها در گروه اول و دوم اختلاف معنی داری دیده نشد (شکل ۱۸)، اما بین تعداد نورونهای حرکتی حاصل در این دو گروه اختلاف معنی دار وجود داشت (شکل ۱۹). نتایج RT-PCR (شکل ۹)، ایمنوسیتوشیمی (شکل ۲۰، ۲۱) و فلوسیتومتری (شکل ۲۲، ۲۳) در گروههای سوم و چهارم مورد مطالعه نشان داد که مارکرهای خاص سلولهای عصبی در این دو گروه بیان نشده و سلولهای عصبی درصد بسیار کمی از کل سلولها را تشکیل می‌دهند، که به ترتیب در گروه سوم و چهارم ۶ و ۵ درصد بود که مشابه



شکل ۱۰– سلولهای عصبی $MAP2^+$در گروه اول.



شکل ۱۱– نتایج فلوسیتومتری بـا اسـتفاده از آنتـی بـادی MAP2در گـروه اول نورونها ۴۴ درصد از کل سلولها را تشکیل دادند.

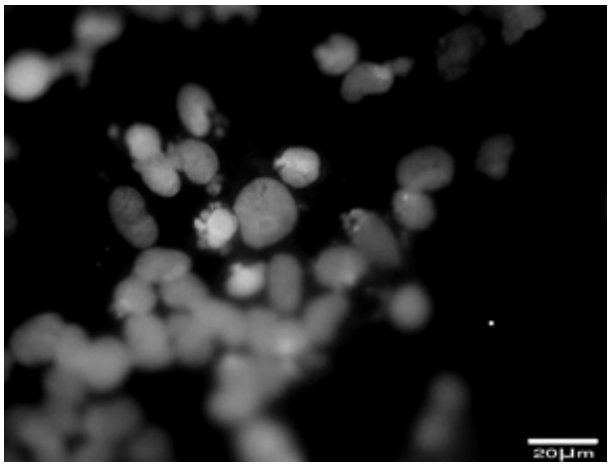


شکل ۱۳– نتایج فلوسیتومتری با استفاده از آنتی بادی Hb9 در گـروه اول، ۲۰/۴ درصد کل سلولها را نورونهای حرکتی تشکیل دادند.

می‌باشد، ولی اختلاف بین گروه اول و دوم با گروههـای سـوم و چهارم از لحاظ درصد نورونهـای MAP2 مثبـت معنـی دار بـود (شکل ۱۸).

بحث

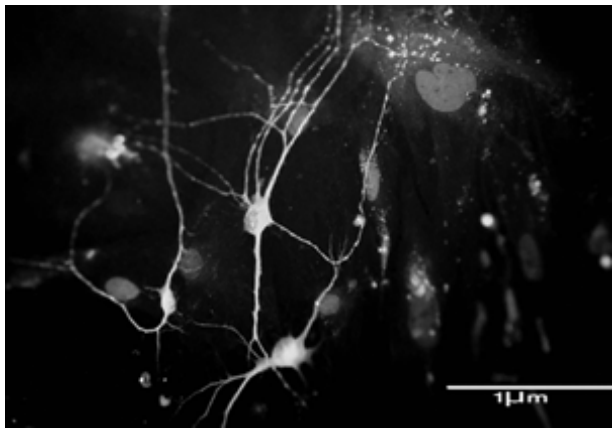
نوتوکورد بخشی از مزودرم محوری اسـت کـه دارای اعمـال بسیار متفاوتی در جنین مهـره داران مـی‌باشـد. یکـی از اعمـال نوتوکورد نقش احتمالی آن در القـای عصـبی و نـورالیزه کـردن اکتودرم است. جهت بررسی اثرات نوتوکورد از روشهای متفـاوتی استفاده شده است، بیشتر ایـن مطالعـات در جنـین دوزیسـتان و



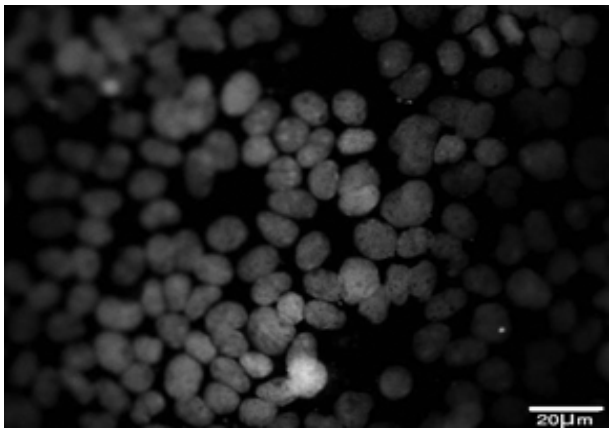
شکل ۱۲– نورونهای حرکتی Hb9 مثبت در گروه اول، تعـداد نورونهـای حرکتـی افزایش قابل ملاحظه‌ای داشت.

پرندگان انجام شده و در پستانداران به دلیل در دسـترس نبـودن سیستم‌های آزمایشگاهی مناسـب ایـن پدیـده مسـتقیما" مـورد مطالعه قرار نگرفته است. تحقیقات نشان داده‌اند که مـی‌تـوان از سلولهای ES به عنـوان ابـزاری در مطالعـه ی مراحـل مختلـف تکوین جنین پستانداران استفاده کرد و مکانیسمهایی کـه باعـث تمایز عصبی در موجود زنـده مـی‌شـوند را در آزمایشـگاه مـورد بررسی قرار داد [۷]. در بسیاری از تحقیقات، بـه منظـور بررسـی تمایز سلولی، از سیستم‌های هم کشتی سلولهای ES با سلولها و یا قطعات بافتی مختلف استفاده شده است. در ایـن تحقیـق بـه منظور نشان دادن تأثیر نوتوکورد در تمایز عصبی، از هم کشـتی سلولهای ES موشی با قطعات نوتوکوردی حاصل از جنین جوجه استفاده شد.

مشاهدات مرفولوژیک در گروه چهـارم نشـان داد کـه اکثـر EBs حاصل ضربان دار بوده و در واقع بـه سـلولهای عضـله ی قلبی تمایز یافته‌اند و با وجودیکه در گروه سوم سلولها مرفولوژی خاصی را نشان ندادند اما نتایج RT-PCR نشان دهنده ی وجود سلولهایی با منشأ هر سه لایه ی زایای جنینی در EBs ایـن دو گروه بود. درصد سلولهای عصبی در این دو گروه پـایین بـوده و نشان می‌دهد که حتی بعد از هم کشتی EBs با نوتوکـورد ایـن تعداد افزایشی نداشته و نوتوکورد، حـداقل در ایـن سیسـتم هـم کشتی طراحی شده قادر به القای سلولهای عصبی نمی‌باشد. این نتایج مشابه نتایج تحقیقاتی بود که نشان مـی‌داد در غیـاب هـر



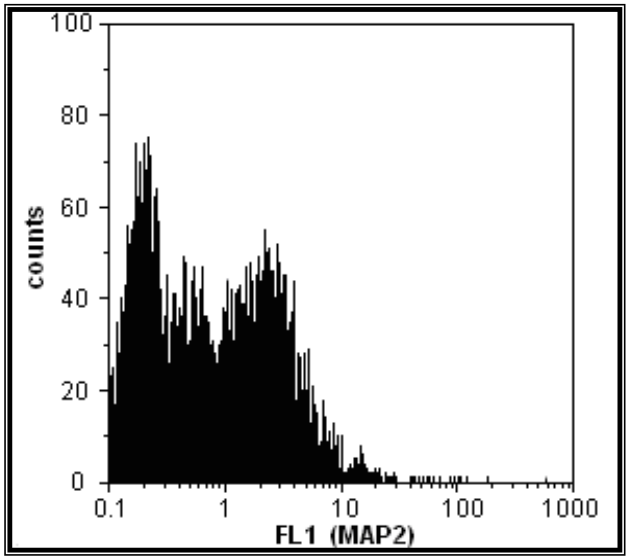
شکل ۱۴– سلولهای عصبی $MAP2^+$ در گروه دوم



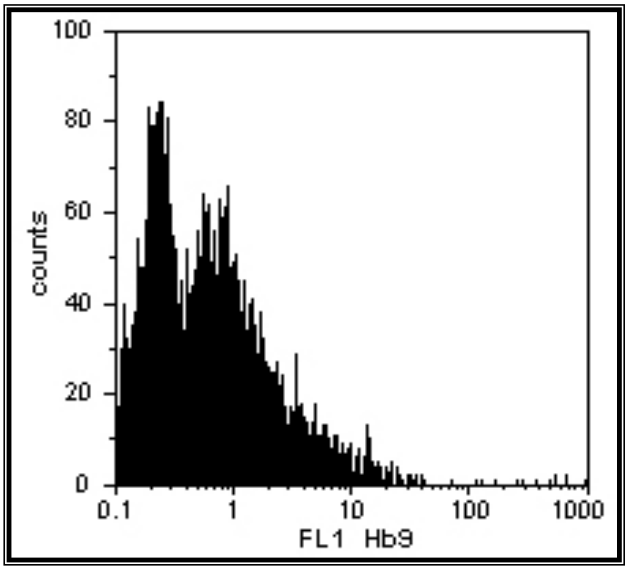
شکل ۱۶– نورونهای حرکتی Hb9 مثبت در گروه دوم.

گونه القا کننده ای، سلولهای ES به سمت تمایز خودبخود رفته و انواعی از سلولهای تمایز یافته با منشأ هر سه لایه‌ی زایای رویانی شامل سلولهای عضله قلبی[۲۹]، هپاتوسیتها [۸] و سلولهای عصبی [۵] مشاهده می‌شوند، اما درصد سلولهای عصبی بسیار پایین می‌باشد (حدود ۰/۱ درصد) [۵، ۲۲، ۳۷].

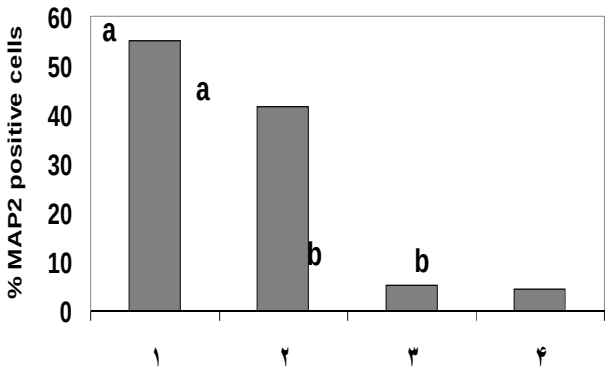
نظرات متفاوتی در مورد چگونگی القای عصبی اولیه در جنین وجود دارد. تحقیقات اسپمان و مانگولد نشان داد که نوتوکورد یک القا کننده ی ابتدایی در جنین بوده که باعث ضخیم شدن اکتودرم رویی خود و تبدیل آن به صفحه‌ی عصبی می‌شود [۱۷]. تحقیقات فراوانی، نوتوکورد و صفحه‌ی پره کوردی را به عنوان منابع سیگنالهای القا کننده‌ی بافت عصبی معرفی کرده‌اند [۱۰]. نوتجن نشان داد که عصبی شدن اکتودرم به وجود نوتوکورد بستگی نداشته و گره قادر به القای بافتهای عصبی می‌باشد [۱۴]. کلین اسمیت نقش گره را نیز در القای عصبی زیر سؤال برده چرا که در جنین‌های فاقد گره، القای عصبی دیده می‌شود [۱۳]، پیکولونشان داد که پروتئینهایی مانند کوردین و نوگین که از گره ترشح می‌شوند با غیر فعال کردن BMP4 باعث تشکیل اکتودرم عصبی می‌شوند [۲۴] و از آنجایی که این پروتئینها از نوتوکورد نیز ترشح می‌شود ممکن است که نوتوکورد نیز به همراه گره در القای عصبی نقش داشته باشد. تحقیقات دیگری نشان داد که با وجودیکه سیگنالهای مختلفی که دارای خاصیت القا کنندگی سلولهای عصبی هستند در گره ساخته می‌شوند، ولی هیچکدام از این سیگنالها مستقیما" دارای این فعالیت نیستند [۱۰]. استوارت و گرهارت گزارش کردند که سرنوشت عصبی یک سرنوشت از پیش تعیین شده اکتودرم بوده و به هیچگونه سیگنالی از بافتهای اطراف وابسته



شکل ۱۵– نتایج فلوسیتومتری با استفاده از آنتی بادی MAP2 در گروه دوم، ۳۵ درصد کل سلولهای این گروه را سلولهای عصبی تشکیل دادند.



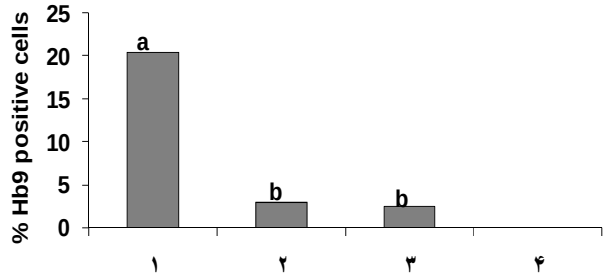
شکل ۱۷– نتایج فلوسیتومتری با استفاده از آنتی بادی Hb9 در گروه دوم،۳ درصد کل سلولها را نورونهای حرکتی تشکیل دادند.



شکل ۱۸– مقایسه ی میانگین درصد سلولهای عصبی MAP^+ در ۴ گروه مورد مطالعه. حروف متفاوت نشان دهنده ی اختلاف معنی دار بین گروههای ۱و۲ با گروههای ۳و۴ می‌باشد ($P<۰/۰۰۵$).

نیست [۳۳]. در تحقیقات دیگری نشان داده شد که در غیاب نوتوکورد، لوله ی عصبی تشکیل شده ولی دارای اندازه ی بسیار کوچکی است و در واقع نقش نوتوکورد را تنها تکثیر سلولهای عصبی بعد از القای اولیه‌ای دانسته‌اند که در نتیجه ی اثرات القایی گره روی می‌دهد [۳۵]. نتیجه‌ای که در مورد نقش نوتوکورد در القای عصبی می‌توان گرفت این است که نوتوکورد احتمالا"در القای اولیه ی عصبی یا نقشی نداشته و یا سایر بخشهای جنین دارای خواص القای عصبی هستند و یا اینکه نوتوکورد، این عمل را با همکاری بخش‌های دیگری از جمله گره و مزودرم پاراگزیال انجام می‌دهد [۱۰].

در این تحقیق برای نشان دادن نقش نوتوکورد در تمایز سلولهای عصبی، سلولهای بنیادی جنینی را به سلولهای بنیادی عصبی تبدیل کرده و سپس با نوتوکورد هم کشتی داده شدند. از

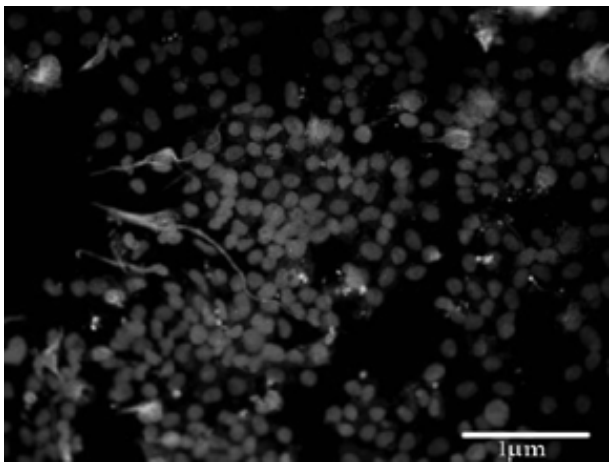


شکل ۱۹– مقایسه ی درصد سلولهای عصبی حرکتی $HB9^+$ در چهار گروه مورد مطالعه، حروف متفاوت نشان دهنده ی اختلاف معنی دار بین گروه اول با سایر گروهها می‌باشد ($P<۰/۰۰۵$).

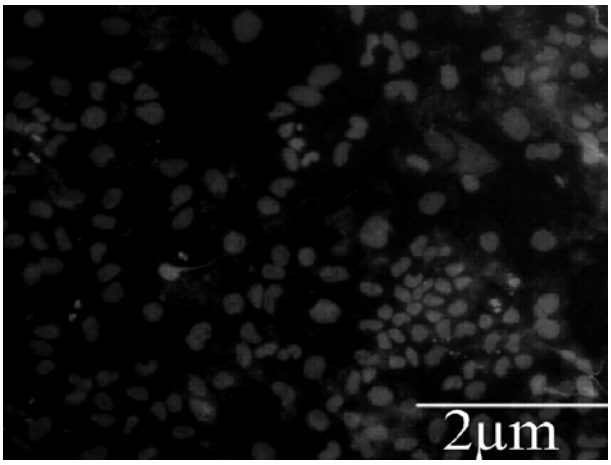
آنجایی که در سیستم عصبی مرکزی RA مشتق از سومیت‌ها هم باعث تشکیل بافت عصبی و هم باعث تشکیل بخش دمی لوله‌ی عصبی (نخاع) می‌شود [۱۹] و در مطالعات فراوانی مشخص شده که در آزمایشگاه نیزRA باعث القای عصبی سلولهای بنیادی جنینی و تبدیل این سلولها به سلولهای بنیادی عصبی می‌شود [۲۲]، جهت انجام مرحله ی پیش القای عصبی در این تحقیق، از RA استفاده شد و پس از ۸ روز، بیان مارکرهای Nestin و Pax6 در EBs که به مدت چهار روز تحت تأثیر RA قرار گرفته بودند نشان دهنده ی تمایز سلولهای بنیادی به سمت سلولهای پیش ساز عصبی بود. محققین مختلف نیز ازRA برای پیش القای سلولهای عصبی استفاده کرده‌اند [۶، ۳۴].

نتایج تحقیق حاضر نشان دادکه در گروه اول و دوم درصد سلولهای عصبی حاصل بعد از استفاده از RA افزایش قابل ملاحظه‌ای داشته ولی بین دو گروه با هم اختلافی دیده نشد. افزایش تعداد سلولهای عصبی به دنبال استفاده از RA در این تحقیق مشابه با تحقیقات دیگران بود که به دنبال استفاده از RA، گزارش کردند که درصد سلولهای عصبی افزایش قابل توجهی داشت [۵، ۳۷].

بین گروه اول و دوم، در نوع ژنهای بیان شده و پروتئینهای خاص سلولهای عصبی حرکتی تفاوت دیده شد، به این ترتیب که همانطور که از نتایج ایمنوسیتوشیمی و RT-PCR مشخص است، درصد سلولهای عصبی حرکتی Hb9 مثبت، در گروه اول افزایش داشتند سلولهای گروه دوم بیشتر مارکر Olig2 را بیان کردند و درصد نورونهای Hb9 مثبت اندک می‌باشد که نشان می‌دهد که استفاده از RA به تنهایی برای تمایز نورونهای



شکل ۲۰– سلولهای عصبی $MAP2^+$ در گروه سوم.

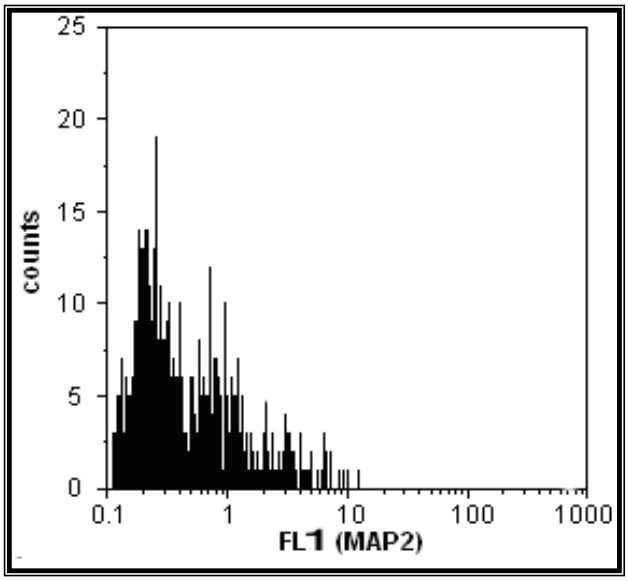


شکل ۲۱- سلولهای عصبی $MAP2^{+}$ در گروه چهارم.

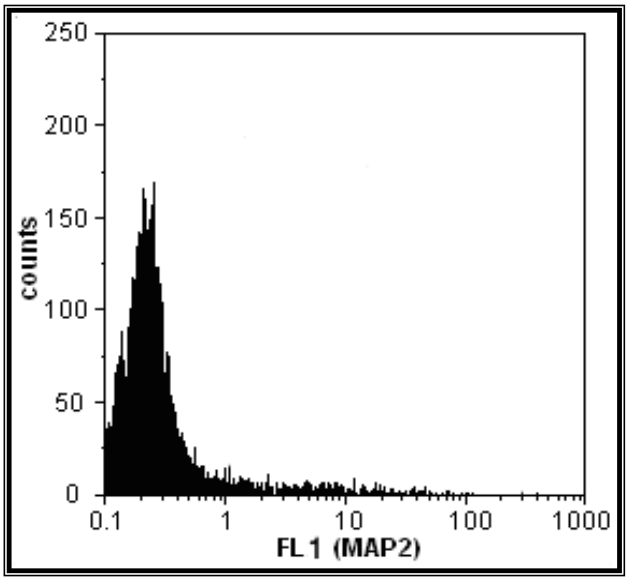
حرکتی کافی نمی‌باشد و سلولهای حاصل در این گروه، احتمالا" سلولهای پیش ساز نورونهای حرکتی و یا الیگو دندروسیتها می‌باشند، این نتایج مشابه نتایج اوکادا و همکاران بود که نشان دادند که در EBs که با RA تیمار شده‌اند بعد از ۴ روز Olig2 بیان می‌شود [۲۲] و برای اینکه سلولهای Olig2 به سمت سلولهای عصبی حرکتی بروند، وجود Shh الزامی است. افزایش نورونهای حرکتی در گروه اول، نشان دهنده ی نقش احتمالی نوتوکورد در تمایز سلولهای عصبی حرکتی می‌باشد. ویچترل و همکاران گزارش کردند زمانی که EBs با RA و Shh تیمار شوند تعداد نورونهای حرکتی Hb9 مثبت ۲۰ تا ۳۰ در صد کل سلولها را تشکیل می‌دهد[۳۷]، که تقریبا" مشابه نتایج حاصل در تحقیق حاضر بود که با استفاده از RA و به دنبال هم کشتی با نوتوکورد، در صد نورونهای حرکتی به ۲۰ درصد رسید. در مجموع با توجه به این نتایج می‌توان نتیجه گرفت که نوتوکورد در تشکیل نورونهای حرکتی سوماتیک از سلولهای بنیادی جنینی نقش دارد.

تحقیقات زیادی نقش نوتوکورد را در القای سلولهای بخش شکمی لوله‌ی عصبی از جمله نورونهای حرکتی نشان داده‌اند [۳۶] و مشخص شده که این اثرات را با واسطه‌ی Shh انجام می‌دهد [۳۵]. اما در مورد نقش نوتوکورد در تمایز سلولهای بخش ونترال لوله ی عصبی نظرات دیگری نیز وجود دارد، بطوری که هالپرن و دوارین و تایلت، نقش نوتوکورد را در القای ساختمانهای بخش ونترال لوله ی عصبی زیرسؤال برده و نتیجه گرفتند که این سلولها از سلولهایی بوجود می‌آیند که از قبل در گره تمایز یافته و به وجود نوتوکورد نیاز ندارند [۱۷، ۳۵].

در مجموع، نتایج این تحقیق موافق با نظراتی بود که نشان می‌داد که نوتوکورد قادر به القای عصبی سلولهای بنیادی جنین نبوده ولی بعد از القای عصبی اولیه، می‌تواند بر تمایز این سلولها تأثیر گذاشته و نورونهای حرکتی را بوجود آورد و از آنجایی که در اطراف نوتوکورد بافتهای مختلفی قرار دارد برای اینکه نوتوکورد بتواند اثرات القایی خود را بر روی این بافتها اعمال کند نیاز به این است که مراحل القای اولیه در این بافتها صورت گیرد. نتایج همچنین نشان داد که می‌توان از سلولهای بنیادی



شکل ۲۲- نتایج فلوسیتومتری با استفاده از آنتی بادی MAP2 در گروه سوم،۶ درصد کل سلولهای این گروه را سلولهای عصبی تشکیل دادند.



شکل ۲۳- نتایج فلوسیتومتری با استفاده از آنتی بادی MAP2 در گروه چهارم، ۵ درصد کل سلولهای این گروه را سلولهای عصبی تشکیل دادند.

نقش مواد، سلولها و بافتهای مختلف را در مراحل مختلف تکوین جنین بررسی کرده و از نتایج حاصل در تمایز سلولهای بنیادی به سلولهای مختلف استفاده نمود. با وجود پیشرفتهای زیادی که در روشن ساختن مراحل مختلف نوروژنز حاصل شده، اما هنوز نقائص زیادی در این زمینه وجود دارد و به نظر می‌رسد فاکتورهای زیادی در القای عصبی نقش دارند که بایستی شناسایی شوند که می‌توان با مشخص کردن وقایعی که در طی مراحل مختلف القای عصبی در جنین روی می‌دهد، این فاکتورها و چگونگی عملکردشان با هم و با سیگنالهای محیطی را شناسایی نمود و از اطلاعات بدست آمده در تمایز سلولهای بنیادی به سلولهای عصبی استفاده کرد.

سپاسگزاری

این مطالعه بخشی از طرح تحقیقاتی مصوب پژوهشکده رویان بود و در پژوهشکده رویان، شاخه ی اصفهان اجرا گردید. لذا بدینوسیله نویسندگان مراتب تشکر و قدر دانی خود را از مساعدتهای مسئولین محترم پژوهشکده اعلام می‌دارند.

منابع

[1] Ando K, Shioda S, Handa H, Kataoka K, Isolation and characterization of an alternatively spliced variant of transcription factor Islet-1. ***J Mol Endocrinol*** 31 (2003) 419-425.

[2] Fleming A, Keynes R, Tannahill D, A central role for the notochord in vertebral patterning. ***Development*** 131 (2004) 873-880.

[3] Babaie Y, Herwig R, Greber B, Brink TC, Wruck W, Groth D, Lehrach H, Burdon T, Adjaye J, Analysis of Oct4-dependent transcriptional networks regulating self-renewal and pluripotency in human embryonic stem cells. ***Stem Cells*** 25 (2007) 500-510.

[4] Bagutti C, Wobus AM, Fassler R, Watt FM, Differentiation of embryonal stem cells into keratinocytes: comparison of wildtype and beta 1 integrin-deficient cells. ***Dev Biol*** 179 (1996) 184–196.

[5] Bain G, Kitchens D, Yao M, Huettner JE, Gottlieb DI, Embryonic stem cells express neuronal properties in vitro. ***Dev Biol*** 168 (1995) 342–357.

[6] Coleman B, Fallon JB, Pettingill LN, de Silva MG, Shepherd RK, Auditory hair cell explant co-cultures promote the differentiation of stem cells into bipolar neurons. ***Exp Cell Res*** 313 (2007) 232-243.

[7] Du ZW, Li XJ, Nguyen GD, Zhang SC, Induced expression of Olig2 is sufficient for oligodendrocyte specification but not for motoneuron specification and astrocyte repression. ***Mol Cell Neurosci*** 33 (2006) 371-380.

[8] Fair JH, Cairns BA, LaPaglia M, Wang J, Meyer AA, Kim H, Hatada S, Smithies O, Pevny L, Induction of hepatic differentiation in embryonic stem cells by co-culture with embryonic cardiac mesoderm. ***Surgery*** 134 (2003) 189-196.

[9] Hamburger V, Hamilton H, A series of normal stages in the development of chick embryo. ***J Morphol*** 88 (1951) 49-92.

[10] Harland R, Neural induction. ***Curr Opin Genet Dev*** 10 (2000) 357-362.

[11] Iwamoto Y, Araki R, Iriyama K, Oda T, Fukuda H, Hayashida S,. Muramatsu T, Purification and characterization of bifunctional alginate lyase from Alteromonas sp. strain no. 272 and its action on saturated oligomeric substrates. ***Biosci Biotech Bioch*** 65 (2001) 133–142.

[12] Kim SK, Hebrok M, Melton DA, Notochord to endoderm signaling is required for pancreas development. ***Development*** 124 (1997) 4243-4252.

[13] Klingensmith J, Ang SL, Bachiller D, Rossant J, Neural induction and patterning in the mouse in the absence of the node and its derivatives. ***Dev Biol*** 216 (1999) 535–549.

[14] Knoetgen H, Teichmann U, WittlerL, Viebahn C, Kessel M, Anterior neural induction by nodes from rabbits and mice. ***Dev Biol*** 225 (2000) 370–380.

[15] Kuroda H, Wessely O, De Robertis EM, Neural induction in xenopus: Requirement for ectodermal and endomesodermal signals via Chordin, Noggin, b- Catenin, and Cerberus. ***PLOS Biol*** 2 (2004) 623-634.

[16] Le Douarin NM, Early neurogenesis in Amniote vertebrates. ***Int J Dev Biol*** 45 (2001) 373-378.

[17] Le Douarin NM, Halpern ME, Discussion point. Origin and specification of the neural tube floor plate: insights from the chick and zebrafish. ***Curr Opin Neurobiol*** 10 (2000) 23-30.

[18] Liem KF, Jessell TM, Briscoe J, Regulation of the neural

patterning activity of sonic hedgehog by secreted BMP inhibitors expressed by notochord and somites. ***Development*** 127 (2000) 4855-4866.

[19] Maden M, Retinoid signalling in the development of the central nervous system. ***Nat Rev Neurosci*** 3 (2002) 843– 853.

[20] Miles G, Yohn D, Wichterle H, Jessell TM, Rafuse V, Brownstone R, Functional properties of motoneurons derived from mouse embryonic stem cells. ***J Neurosci*** 24 (2004) 7848– 7858.

[21] Moses D, TeperY, Gantois I, Finkelstein D, Horne MK, Drago J, Murine embryonic EGF-responsive ventral mesencephalic neurospheresdisplay distinct regional specification and promote survival of dopaminergic neurons. ***Exp Neurol*** 199 (2006) 209–221.

[22] Okadaa Y, Shimazakia T, Sobueb G, Okano H, Retinoic-acid-concentration-dependent acquisition of neural cell identity during in vitro differentiation of mouse embryonic stem cells. ***Dev Biol*** 275 (2004) 124-142.

[23] O'Shea KS, Self-renewal vs. differentiation of mouse embryonic stem cells. ***Biol Reprod*** 71 (2004) 1755–1765.

[24] Piccolo S, Sasai Y, Lu B, De Robertis EM, Dorsoventral patterning in Xenopus: Inhibition of ventral signals by direct binding of chordin to BMP-4. ***Cell*** 86 (1996) 589–598.

[25] Plachta N, Bibel M, Tucker KL, Barde YA, Developmental potential of defined neural progenitors derived from mouse embryonic stem cells. ***Development*** 131 (2004) 5449–5456.

[26] Placzek M, Dale K, Tissue recombination in collagen gels. ***Meth Mol Biol*** 97 (1999) 293-304.

[27] Placzek M, Jessell TM, Dodd J, Induction of floor plate differentiation by contact-dependent, homeogenetic signals. ***Development*** 117 (1993) 205-218.

[28] Rehen SK, McConnell MJ, Kaushal D, Kingsbury MA, Yang AH, Chun J, Chromosomal variation in neurons of the developing and adult mammalian nervous system. ***Proc Natl Acad Sci USA*** 98 (2001) 13361–1366.

[29] Rohwedel J, Guan K, Hegert C, Wobus AM, Embryonic stem cells as an in vitro model for mutagenicity, cytotoxicity and embryotoxicity studies: present state and future prospects. ***Toxicol In Vitro*** 15 (2001) 741–753.

[30] Sausedo RA, Schoenwolf GC, Quantitative analyses of cell behaviors underlying notochord formation and extension in muouse embryos. ***Anat Rec*** 239 (1994) 103-112.

[31] Smits P, Lefebvre V, Sox5 and Sox6 are required for notochord extracellular matrix sheath formation, notochord cell survival and development of the nucleus pulposus of intervertebral discs. ***Development*** 130 (2003) 1135-1148.

[32] Stemple DL, Structure and function of the notochord: an essential organ for chordate development. ***Development*** 132 (2005) 2503-2512.

[33] Stewart RM, Gerhart JC, The anterior extent of dorsal development of the Xenopus embryonic axis depends on the quantity of organizer in the late blastula. ***Development*** 109 (1990) 363-372.

[34] Sugie Y, Yoshikawa M, Ouji Y, Saito K, Moriya K, Ishizaka S, Matsuura T, Maruoka S, Nawa Y, Hara Y, Photoreceptor cells from mouse ES cells by co-culture with chick embryonic retina. ***Biochem Bioph Res Co*** 332 (2005) 241–247.

[35] Teillet MA, Lapointe F, Le Douarin NM, The relationships between notochord and floor plate in vertebrate development revisited. ***Dev Biol*** 95 (1998) 11733–11738.

[36] 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*** 73 (1993) 673-666.

[37] Wichterle H, Lieberam I, Porter JA, Jessell TM, Directed differentiation of embryonic stem cells into motor neurons. ***Cell*** 110 (2002) 385–397.

[38] Wilson M, Maden L, Mechanisms of dorsoventral patterning in the vertebrate neural tube. ***Dev Biol*** 282 (2005) 1-13.