

Expressional analysis of SALL4 mRNA in prosencephalon during chicken embryogenesis

Bahadori M¹, Zafar Balanejad S², Forghanifard MM^{1*}

1- Department of Biology, Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan, Iran

2- Department of Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran

Received: 3 Feb 2014, Accepted: 7 May 2014

Abstract

Background: According to the important of SALL4 gene during the development of embryonic nervous system, our aim in this study was to analyze and quantify mRNA expression of SALL4 in Prosencephalon during different stages of chicken embryogenesis.

Materials and Methods: In this experimental study, incubated Ross fertilized eggs were applied in 37°C-37.5°C in 60-65% humidified atmosphere after beginning of embryogenesis. Prosencephalon part of the brain tissue was collected from the eggs, daily. Total RNA extraction and cDNA synthesis was performed from resected tissues. The synthesized cDNA was used as template for quantitatively analysis of SALL4 mRNA expression by real-time PCR.

Results: The Results indicate that the level of SALL4 gene expression is significantly variable during embryogenesis. However it doesn't show variation during the early days. The maximum copy number of SALL4 mRNA was quantified on 15th day of chicken development.

Conclusion: SALL4 mRNA expression is high when the Prosencephalon is under development, using of HAMBURGER-HAMILTON chart, there is relation between increasing SALL4 expression and developing limbs and anterior brain.

Keywords: Embryogenesis, Gene expression, Prosencephalon, Real time PCR, SALL4

*Corresponding author:

Address: Department of Biology, Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan, Iran.

Email: Forghanifard@gmail.com

بررسی بیان ژن SALL4 در پروزنسفالن (مغز قدامی) طی تکوین جنین جوجه

ملیحه بهادری¹، سعیده ظفر بالانژاد²، محمد مهدی فرقانی فرد^{3*}

1- دانشجوی کارشناسی ارشد زیست شناسی سلولی و تکوین، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان، دامغان، ایران

2- استادیار، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد، مشهد، ایران

3- استادیار، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان، دامغان، ایران

تاریخ دریافت: 92/11/14 تاریخ پذیرش: 93/2/17

چکیده

زمینه و هدف: با توجه به نقش ژن SALL4 در تکوین اندام‌های مختلف از جمله سیستم عصبی و مغز، در این مطالعه بیان ژن SALL4 در طول تکوین جنین جوجه در بافت پروزنسفالن مغز و بیشترین میزان بیان در طول رشد و نمو این موجود مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش تجربی در ابتدا از تخم مرغ‌های نطفه‌دار انکوبه شده در درجه حرارت 37-37/5 درجه سانتی‌گراد و رطوبت 65 - 60 درصد استفاده شد. پس از شروع رشد و نمو جنینی قسمتی از بافت پروزنسفالن مغز روزانه از تخم مرغ‌ها جمع‌آوری گردید. RNA تام استخراج و سنتز cdNA از بافت تفکیک شده انجام شد. cdNA سنتز شده به عنوان الگو برای بررسی کمی بیان mRNA SALL4؛ به وسیله Real Time PCR استفاده شد.

یافته‌ها: نتایج حاصل نشان می‌دهد بیان ژن SALL4 در طول رشد و نمو جنین در پروزنسفالن متغیر می‌باشد، اما در روزهای ابتدایی جنینی بیان آن نوسانات زیادی را نشان نمی‌دهد به طوری که حداکثر تعداد نسخه‌های mRNA ژن SALL4 در 15 روز رشد و نمو جنینی تعیین شد.

نتیجه‌گیری: بیان این ژن در روزهایی که رشد اندام‌ها و مغز قدامی در حال کامل شدن است افزایش بیشتری نشان می‌دهد. با استفاده از جدول هامبورگ-همیلتون به نظر می‌رسد ارتباطی بین افزایش بیان ژن SALL4 و رشد و نمو اندام‌های بینایی و نیم کره‌های مغز در حال تکوین وجود دارد.

واژگان کلیدی: بیان ژن، پروزنسفالن، تکوین جنین، SALL4، Real time PCR

*نویسنده مسئول: دامغان، میدان سعدی، بلوار چشمه علی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد دامغان، گروه زیست شناسی

Emali: Forghanifard@gmail.com

مقدمه

از آن زمان که ارسطو برای نخستین بار تکوین سه هفته‌ای جوجه را دنبال کرد، تا به امروز این موجود نمونه مناسبی برای مطالعات جنین‌شناسی بوده است. این موجود در تمام طول سال به مقدار زیاد در دسترس بوده و به راحتی می‌توان آن را پرورش داد (1). جوجه نشان دهنده سیستمی است که اجازه مداخله تجربی و شباهت عمده به دیگر مهره‌داران را دارد، به این ترتیب نشان دهنده مکمل مهمی برای موجوداتی نظیر موش است و در جنین پرند دستکاری با شیوه‌های مختلف ارائه شده و نتایج حاصل از مطالعات را می‌توان در مهره‌داران دیگر نیز استفاده کرد (2).

دوره جنینی جوجه 21 روز است. پیدایش و نمو مغز جوجه در اوایل دوره جنینی رخ داده و بخش‌های مختلف مغز جوجه شامل پروزنسفالن، مزنسفالن و رومنسفالن شکل می‌گیرد (3).

مغز جلویی یا پروزنسفالن به دو ناحیه تلن سفالون و دیان سفالون تقسیم می‌شود، تلن سفالون سرانجام نیم کره‌های مغزی را ایجاد می‌کنند و دیان سفالون، وزیکول‌های بینایی و مناطق تالاموس و هیپوتالاموس مغز را تشکیل می‌دهد (4).

ژن SALL4 جزء خانواده ژن SALL می‌باشد که در تکوین نقش مهمی دارد، ژن‌های مربوط به SALL در *c. elegans*، ماهی، قورباغه (زنوپوس)، موش و انسان تشخیص داده شده است (5).

تا کنون سه عضو از خانواده ژن SALL شامل SALL1، SALL2، و SALL4 در جوجه شناسایی شده است (6). محل قرارگیری ژن SALL4 در ناحیه 2q13،2 است، ژن SALL4 در بازوی بلند (q) کروموزوم 20 و در موقعیت 13،2 قرار گرفته است (7).

Nanog و SALL4 به ترتیب فاکتورهای کلیدی در حفظ مرحله عدم تمایز و تکثیر سلولی می‌باشند. خاموش شدن بیان ژن SALL4 منتهی به تکثیر بسیار زیاد سلول‌های بنیادی جنینی می‌شود و در صورت از بین رفتن SALL4 موش‌ها تا روز 7 جنینی زنده باقی نمی‌مانند (8).

موش‌های فاقد SALL4 در 6/5 روزگی جنینی می‌میرند که نشان می‌دهد در میان خانواده SALL، SALL4 برای تکوین جنینی اولیه بسیار مهم است (9-11). با توجه به نقش ژن SALL4 در رشد و نمو دوران جنینی، در این مطالعه میزان بیان ژن SALL4 مورد ارزیابی قرار گرفته است به طوری که با استفاده از روش Real Time PCR و در طی روزهای جنینی حداکثر بیان دریافت پروزنسفالن مغز جوجه بررسی گردید.

مواد و روش‌ها

این مطالعه از نوع تجربی است که از تخم مرغ‌های نطفه‌دار تهیه شده از تعاونی مرغداران طوس مشهد، نژاد Ross جهت پرورش و سپس استخراج بافت مغز از ناحیه پروزنسفالن در داخل دستگاه جوجه کشی (RCOM Digital incubator, korea) با درجه حرارت بین 37/5-37 درجه سانتی‌گراد و رطوبت بین 60 تا 65 استفاده شد. از نظر ماکروسکوپی از روز 3 انکوباسیون سه قسمت مغز به طور کامل در زیراسترونومیکروسکوپ قابل رویت می‌باشد که شامل پروزنسفالن، مزنسفالن و رومنسفالن است. پس از جدا کردن پروزنسفالن، بافت در درون محلول RNAlater (ziest baran, USA) قرار داده شده و در دمای 20- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. محققین در طول مراحل تحقیق نظیر بی‌هوش نمودن و تشریح حیوان متعهد به رعایت اصول اخلاقی پژوهش بودند.

استخراج RNA از بافت پروزنسفالن

استفاده از RNA سالم جهت به کارگیری در روش‌های ژنتیک مولکولی مانند میکروآرای، Real time PCR یا RT-PCR کمی، ضروری به نظر می‌رسد. کار با RNA با کیفیت پایین ممکن است نتایج بعدی حاصل از کار بر روی این RNA را تحت تاثیر قرار دهد. استخراج RNA با استفاده از دستورالعمل کیت تهیه شده از شرکت دنا زیست آسیا انجام شد. بعد از استخراج RNA در آب فاقد RNAase در دمای 20- درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شود.

میکرولیتر Sybergreen ، 0/4 میکرولیتر ROX dye ، 0/6 میکرولیتر پرایمر، 7 میکرولیتر آب مقطر دیونیزه و 2 میکرولیتر cDNA است.

با استفاده از پرایمرهای Real time PCR و استفاده از Sybergreen ، بیان ژن در نمونه‌های cDNA تهیه شده از بافت مغز در روزهای مختلف جنینی مورد ارزیابی قرار گرفت.

برنامه دمایی که دستگاه برای انجام Real time PCR تنظیم شد شامل یک مرحله 10 دقیقه‌ای در دمای 95 درجه سانتی‌گراد و چرخه‌های دمایی شامل 10 ثانیه 95 درجه سانتی‌گراد، 30 ثانیه دمای 56 درجه سانتی‌گراد و 30 ثانیه دمای 72 درجه سانتی‌گراد بود که در 45 سیکل تکرار گردید. همراه با واکنش Real time PCR منحنی استاندارد نیز رسم گردید.

جدول 1. توالی پرایمر های طراحی شده جهت واکنش

Real-time PCR	
پرایمرهای	5'→3'
Real-time PCR	
Forward 4SALL	5 - CGAAGGGGAACCTGAAGGTC-3
Reverse 4SALL	5 -GAGATCTCGTTGGTCTTCATTG-3
GAPDH primer	
Forward GAPDH	5-AGATGGTGAAAAGTCGGAGTCA-3
Reverse GAPDH	5-ATCATTGATGGCCACCACTTG-3

نتایج با استفاده از آزمون‌های آماری کای اسکوئر و تی تست در محیط نرم افزاری SPSS، تجزیه و تحلیل شدند.

یافته ها

براساس مطالعات آناتومیکی و استناد به جدول همابورگ - همیلتون (H-H) و استفاده از استرئومیکروسکوپ استخراج بافت پروزنسفالن انجام شد، که در بیستین ساعت انکوباسیون صفحه عصبی شکل

RNAهای استخراج شده در دوره‌های مختلف زمانی بافت پروزنسفالن مغز با استفاده از کیت تهیه شده از شرکت پارس توس جهت سنتز cDNA مورد استفاده قرار گرفت. ترکیبات لازم برای سنتز cDNA با حجم نهایی 20 میکرولیتر شامل 5 میکرولیتر Total RNA، 1 میکرولیتر Oligo dt، 4 میکرولیتر آب مقطر دیونیزه که در دمای 65 درجه سانتی‌گراد به مدت 5 دقیقه در دستگاه ترموسایکلر قرار داده شد. در مرحله بعدی 10 میکرولیتر (RT-2X) preMix به ترکیبات اولیه اضافه گردید و مجدداً در دمای 25 درجه سانتی‌گراد به مدت 10 دقیقه در دستگاه قرار داده شد و سپس دستگاه برای مدت 60 دقیقه در دمای 50 درجه سانتی‌گراد و در مرحله آخر دستگاه برای مدت 10 دقیقه در 70 درجه سانتی‌گراد تنظیم گردید.

بهینه سازی شرایط RT-PCR برای تکثیر ژن SALL4

واکنش RT-PCR طبق دستورالعمل کیت تهیه شده از شرکت پارس توس انجام شد به طوری که مسترمیکس با حجم نهایی 29 میکرولیتر تهیه شده و شامل بافر 10X به میزان 3 میکرولیتر، 0/5 میکرولیتر مجموع نوکلئوتیدها، 1 میکرولیتر کلرید منیزیم، پرایمر 2 میکرولیتر، 0/2 میکرولیتر آنزیم Taq DNA polymerase، 21/3 میکرولیتر آب مقطر دیونیزه و 1 میکرولیتر cDNA است.

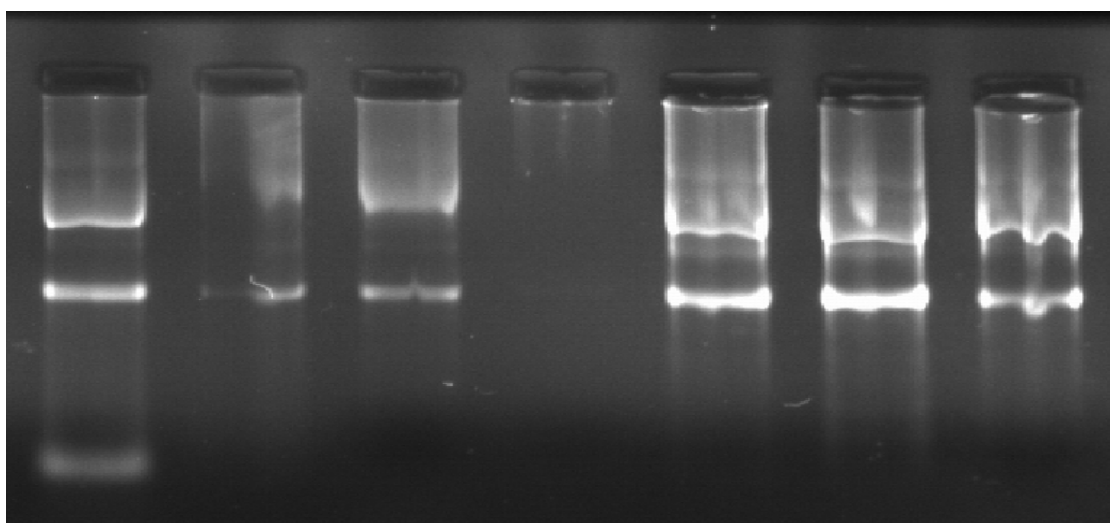
پس از آماده سازی مواد جهت RT-PCR، تنظیمات دستگاه ترموسایکلر شامل 30 چرخه شامل واسرشتگی به مدت 30 ثانیه در دمای 94 درجه سانتی‌گراد، اتصال به مدت 30 ثانیه در دمای 56 درجه سانتی‌گراد و مرحله بازآرایی به مدت 30 ثانیه در دمای 72 درجه سانتی‌گراد بود.

انجام Real time PCR

توالی پرایمرهایی که برای بررسی ژن SALL4 استفاده شدند، شامل پرایمرهایی جهت Real time PCR و پرایمرهای مربوط به ژن GAPDH به عنوان کنترل داخلی جهت نرمال سازی است که از شرکت تکاپو زیست طبق جدول 1 تهیه گردید. مواد مورد نیاز جهت انجام Real time PCR با حجم نهایی 20 میکرولیتر شامل 10

گرفته و اولین جفت سومیت نمایان می‌شود سپس با گذشت ساعات بیشتری از انکوباسیون (ساعت 24 و 25) تشکیل چین‌های عصبی و نیز لوله گوارشی شروع به ظاهر شدن می‌کند، در اوایل ساعات جنینی لوله عصبی ابتدایی ساختاری راست و مستقیم دارد. با این حال پیش از شکل‌گیری ناحیه خلفی لوله عصبی، سمت قدامی آن دچار تغییرات زیادی می‌گردد. سپس در طی تکوین، سه وزیکول اولیه تشکیل می‌شود: مغز قدامی، مغز میانی، مغز خلفی متمایز می‌شوند.

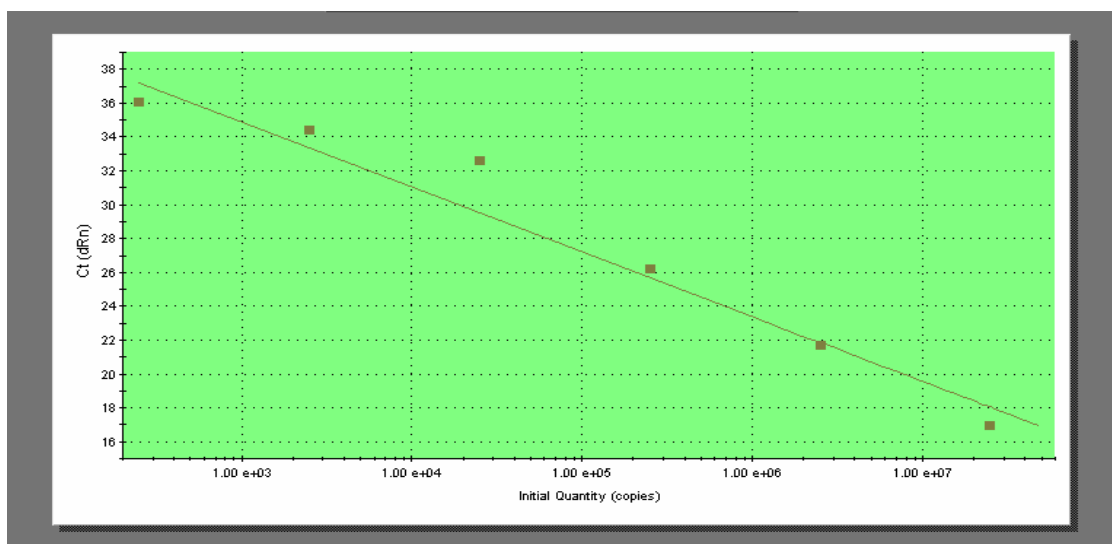
با استفاده از RNA استخراج شده، Total RNA حاصل از پروزنسفالن در طول رشد و نمو جنین جوجه در شرایط RNase-free تهیه و کیفیت RNA به کمک الکتروفورز ژل آگارز 2 درصد بررسی شد؛ در بررسی ژل آگارز باندهای 28S و 18S قابل رویت است (شکل 1). cDNA های سنتز شده از بافت جنینی پروزنسفالن برای استفاده در Real time PCR به عنوان الگو بر روی ژل آگارز 2 درصد، الکتروفورز شده تا از لحاظ کیفی مورد بررسی قرار گیرد و از ژن GAPDH به عنوان نرمالایز استفاده گردید.



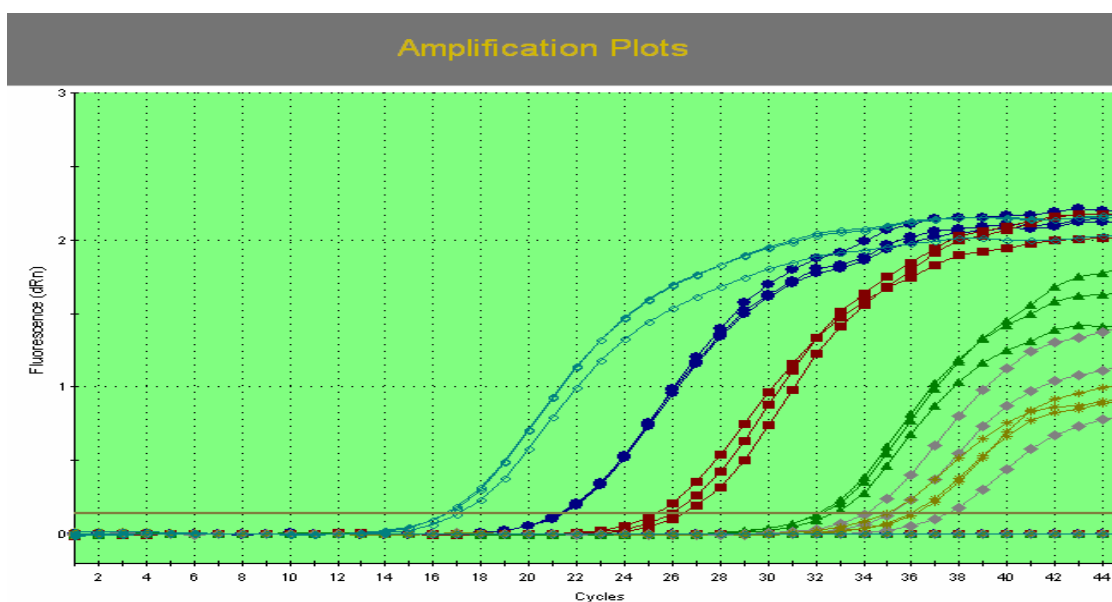
شکل 1. الکتروفورز RNA های استخراج شده، جهت بررسی کیفی حضور باندهای 28S و 18S بر روی ژل آگارز 2 درصد

با توجه به منحنی استاندارد (9) دستگاه به طور اتوماتیک تعداد کپی هر تست را معین می‌کند (شکل 2). همان طوری که در منحنی تکثیر مشاهده می‌شود میزان فلورسانت ساطع شده با افزایش مقادیر محصولات طی

چرخه‌های واکنش PCR افزایش یافته است. محور عمودی براساس شدت نور فلورسانس نشر شده از رنگ گزارش گر و محور افقی براساس تعداد چرخه‌های واکنش است (شکل 3).



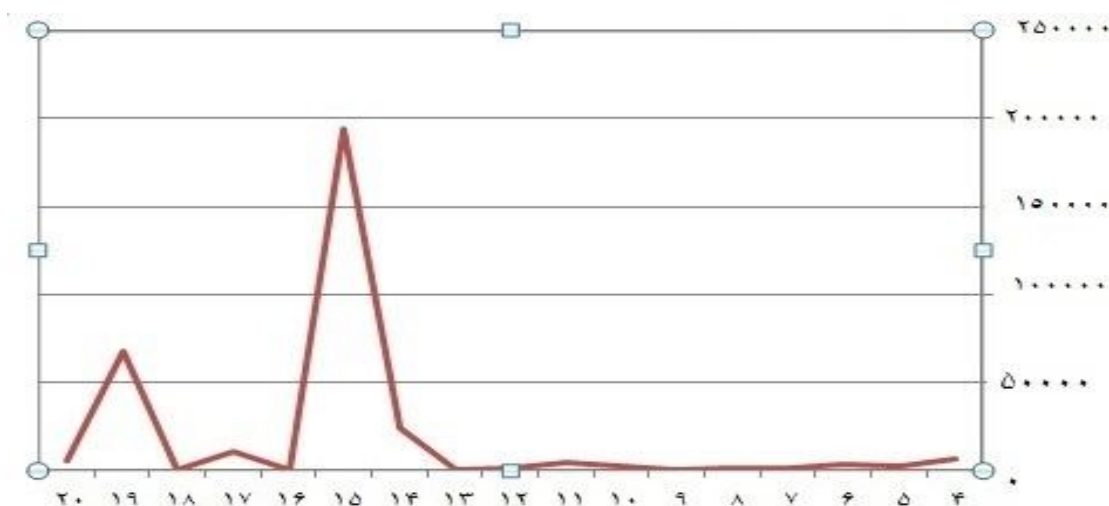
شکل 2. منحنی استاندارد سنجش کمی SALL4 RNA شامل رقت های 10^{-3} تا 10^{-7} و محاسبه تعداد کپی های ژنی است



شکل 3. منحنی های تکثیر ژن SALL4 در آزمایش Real time PCR نشان داده شده است

15 جنینی ($19/38 \times 10^4$) و روز 19 جنینی ($6/77 \times 10^4$) بیشترین نسخه ژنی را نشان می دهد که بیان بالاتری نسبت به روزهای دیگر جنینی دارد و بیشترین بیان این ژن در روز 15 جنینی در بافت پروزنسفالن مغز جنین جوجه صورت گرفته است (شکل 4).

نتایج حاصل از Real-time PCR بافت پروزنسفالن مغز در طی تکوین جوجه نشان می دهد که بیان ژن SALL4 در طول رشد و نمو جنین در پروزنسفالن متغیر بوده است اما در روزهای ابتدایی جنینی بیان این ژن نوسانات زیادی را نشان نمی دهد؛ در حالی که روز



شکل 4. رشد و نمو در پروژنسفالان مغز جنین جوجه در روز های تکوین و میزان بیان ژن SALL4

بحث

در مطالعه حاضر بیان ژن SALL4 در بافت پروژنسفالان مغز جنین جوجه با استفاده از روش Real time PCR در طول رشد و نمو این موجود مورد بررسی قرار گرفت و تغییرات بیان این ژن در طی تکوین این بافت ارزیابی گردید، به طوری که بیشترین بیان در روز 15 جنینی مشاهده شد.

ژن SALL4 جزء خانواده ژن SALL می باشد که در رشد و نمو نقش دارد. رشد و نمو جنینی SALL4 در مغز، تکامل قوس های ریوی و اندام هایی که در رشد و نمو دخالت دارند اثبات شده است (12).

مطالعات نشان می دهد که SALL4 در طی رشد و نمو جنینی در مراحل بلاستوسیست در توده سلول های داخلی و ترفو اکتودرم و هم چنین در مراحل پایانی جنینی در تشکیل لوله عصبی، تکوین مغز، قوس های ریوی و جوانه اندام ها دخالت دارد. هم چنین جهش های کشنده جنینی هموزیگوت SALL4 در اوایل دوران بارداری سبب تغییر شکل در روده و فقدان در بسته شدن لوله عصبی می شود. هم چنین جهش در ژن SALL4 در انسان سبب ایجاد ناهنجاری در اندام های حرکتی (سندرم Okihiro) می شود (8).

SALL4 در طی رشد و نمو جنینی در مراحل

بلاستوسیست در توده سلول های داخلی و ترفو اکتودرم و هم چنین در مراحل پایانی جنینی در تشکیل لوله عصبی، تکوین مغز، قوس های ریوی و جوانه اندام ها دخالت دارد. هم چنین جهش های کشنده جنینی هموزیگوت SALL4 در اوایل دوران بارداری سبب تغییر شکل در روده و فقدان بسته شدن لوله عصبی می شود (13).

با بررسی های انجام شده در روز 11/5 جنینی موش، بیان SALL4 در چند ناحیه جنینی شامل مغز میانی، رومبرها، مزانشیم جوانه اندام و برآمدگی های تناسلی محدود می شود در حالی که در روز 8/5 جنینی در چین های سری، سومیت های اولیه، خط اولیه و آلانتویس یافت شده است. در روز 9/5 زمانی که لوله عصبی شروع به بسته شدن می باشد در سطح مغز جلویی و مغز میانی محدود می شود و بیان زیاد آن در انتهای دمی، لوله عصبی بیشتر است (14-16). در طی رشد و نمو اندام های حسی، بیان SAL به وسیله سیگنال های مولکولی hedgehog (hh) و wingless (wnt) و decapentaplegic (dpp) تنظیم می شود (17).

مطالعات نشان می دهد که ژن SALL4 ممکن است در برخی از مسیرهای سیگنالینگ که در طول مهاجرت سلول های تاج عصبی و تشکیل قلب نقش دارند،

شدن است بیان ژن افزایش بیشتری نشان می‌دهد، پروزنسفالن برجستگی خارجی به نام وزیکول‌های بینایی را ایجاد می‌کند. افزایش بیان ژن SALL4 در پروزنسفالن احتمالاً سبب رشد و نمو اندام‌های بینایی می‌شود که این قسمت مغز نیم کره‌های مغز، بخش کورتکس مغز و حرکات ارادی را شامل می‌شود به طوری که جانور پس از تولد ارتباط صحیحی با محیط برقرار کند.

تقدیر و تشکر

بدین وسیله از همکاری و مساعدت‌های مدیریت محترم گروه زیست‌شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد و بخش ژنتیک انسانی پژوهشکده بوعلی مشهد که در اجرای این طرح همکاری نمودند نهایت سپاسگزاری را داریم. این مقاله برگرفته از نتایج پایان نامه کارشناسی ارشد می‌باشد.

منابع

1. Stern CD. The chick embryo—past, present and future as a model system in developmental biology. *Mechanisms of development*. 2004; 121(9): 1011-3.
2. Agudo D, Gómez-Esquer F, Díaz-Gil G, Martínez-Arribas F, Delcán J, Schneider J, et al. Proteomic analysis of the Gallus gallus embryo at stage-29 of development. *Proteomics*. 2005; 5(18): 4946-57.
3. Henshel DS, Martin JW, DeWitt JC. Brain asymmetry as a potential biomarker for developmental TCDD intoxication: a dose-response study. *Environmental health perspectives*. 1997;105(7):718.
4. Stiles J, Jernigan TL. The basics of brain development. *Neuropsychology review*. 2010;20(4):327-48.
5. Gassei K, Orwig KE. Sall4 expression in gonocytes and spermatogonial clones of postnatal mouse testes. *PloS one*. 2013; 8(1): e53976-7.
6. Sweetman D, Smith T, Farrell ER, Chantry A, Münsterberg A. The Conserved Glutamine-rich Region of Chick Csal1 and Csal3 Mediates Protein Interactions with Other Spalt Family

دخالت داشته باشد. نقش مستقیم سیگنال‌های BMP، Wnt و FGF در تشکیل قلب در درزوفیلا و سایر مهره‌داران نشان داده شده است (18-20).

در خانواده ژن SALL4 بیشترین مطالعات سرطان در مورد SALL4 صورت گرفته است. مطالعات جدید نشان داده‌اند که SALL4، یک مارکر جدید حساس و یک مارکر تشخیصی ویژه در تومورهای سلول زایشی اولیه تخمدان و تومورهای سلول جنسی بیضه‌ای است (21).

میزان بیان mRNA، SALL4 در سرطان‌های پستان به وسیله روش RT-PCR روی نمونه بافت‌های سرطانی و غیر سرطانی به دست آمده از بیماران مبتلا به سرطان پستان انجام گرفته است که سطح بیان mRNA، SALL4 در بافت‌های سرطانی به طور قابل توجهی بیشتر از بافت‌های غیر سرطانی بود. میزان بیان Nanog در سلول‌های سرطانی بیماران مبتلا به سرطان پستان افزایش می‌یابد، تنظیم متقابل بیان ژن بین SALL4 و Nanog که در سلول‌های بنیادی موش مشاهده شده‌اند ممکن است در انسان هم اتفاق بیافتد به این ترتیب این امکان وجود دارد که چندین مولکول مرتبط سلول‌های بنیادی با همکاری یکدیگر نقش اساسی در رفتار سلول‌های سرطانی انسان را داشته باشند (22).

نتیجه گیری

با توجه به نتایج به دست آمده و مقایسه بیان این ژن در روزهای مختلف جنینی در طی مراحل تکوین پروزنسفالن جنین جوجه، در روزهای ابتدایی جنینی که مغز در حال تشکیل می‌باشد، نوسانات زیادی در بیان ژن SALL4 در بافت پروزنسفالن مغز مشاهده نشد؛ در حالی که در روزهای 15 و 19 جنینی که رشد و نمو پروزنسفالن در حال تکمیل است بیان این ژن افزایش نشان می‌دهد. با توجه به این که بیان ژن SALL4 در تکوین اندام‌ها دخالت دارد، در روزهایی که رشد اندام‌ها و مغز قدامی در حال کامل

- Members Implications for Townes-Brocks syndrome. *Journal of biological chemistry*. 2003; 278(8):6560-6.
7. Gao C, Kong NR, Chai L. The role of stem cell factor SALL4 in leukemogenesis. *Critical Reviews™ in Oncogenesis*. 2011;16(1-2):117-27.
 8. Sakaki-Yumoto M, Kobayashi C, Sato A, Fujimura S, Matsumoto Y, Takasato M, et al. The murine homolog of SALL4, a causative gene in Okihiro syndrome, is essential for embryonic stem cell proliferation, and cooperates with Sall1 in anorectal, heart, brain and kidney development. *Development*. 2006; 133(15): 3005-13.
 9. Raeisossadati R, Farshchian M, Ganji A, Tavassoli A, Velayati A, Dadkhah E, et al. Quantitative analysis of TEM-8 and CEA tumor markers indicating free tumor cells in the peripheral blood of colorectal cancer patients. *International journal of colorectal disease*. 2011;26(10):1265-70.
 10. Desmond ME, Levitan ML. Brain expansion in the chick embryo initiated by experimentally produced occlusion of the spinal neurocoel. *The Anatomical Record*. 2002; 268(2): 147-59.
 11. Hamburger V, Hamilton HL. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *Developmental Dynamics*. 1992; 195(4): 231-72.
 12. Kohlhase J, Hausmann S, Stojmenovic G, Dixkens C, Bink K, Schulz-Schaeffer W, et al. SALL3, a New Member of the Human spalt-like Gene Family, Maps to 18q23. *Genomics*. 1999;62(2):216-22.
 13. Barembaum M, Bronner-Fraser M. A novel spalt gene expressed in branchial arches affects the ability of cranial neural crest cells to populate sensory ganglia. *Neuron glia biology*. 2004; 1(1):57-63.
 14. Kohlhase J, Heinrich M, Liebers M, Froehlich Archangelo L, Reardon W, Kispert A. Cloning and expression analysis of SALL4, the murine homologue of the gene mutated in Okihiro syndrome. *Cytogenetic and genome research*. 2003;98(4):274-7.
 15. Kohlhase J, Heinrich M, Schubert L, Liebers M, Kispert A, Laccone F, et al. Okihiro syndrome is caused by SALL4 mutations. *Human molecular genetics*. 2002;11(23):2979-87.
 16. Warren M, Wang W, Spiden S, Chen-Murchie D, Tannahill D, Steel KP, et al. A Sall4 mutant mouse model useful for studying the role of Sall4 in early embryonic development and organogenesis. *Genesis*. 2007;45(1):51-8.
 17. De Celis JF, Barrio R, Kafatos FC. Regulation of the spalt/spalt-related gene complex and its function during sensory organ development in the *Drosophila* thorax. *Development*. 1999;126(12):2653-62.
 18. Marvin MJ, Di Rocco G, Gardiner A, Bush SM, Lassar AB. Inhibition of Wnt activity induces heart formation from posterior mesoderm. *Genes & development*. 2001; 15(3): 316-27.
 19. Barron M, Gao M, Lough J. Requirement for BMP and FGF signaling during cardiogenic induction in non-precardiac mesoderm is specific, transient, and cooperative. *Developmental Dynamics*. 2000;218(2):383-93.
 20. Délot EC, Bahamonde ME, Zhao M, Lyons KM. BMP signaling is required for septation of the outflow tract of the mammalian heart. *Development*. 2003; 130(1):209-20.
 21. Cao D, Li J, Guo CC, Allan RW, Humphrey PA. SALL4 is a novel diagnostic marker for testicular germ cell tumors. *The American journal of surgical pathology*. 2009;33(7):1065-77.
 22. Kobayashi D, Kuribayashi K, Tanaka M, Watanabe N. Overexpression of SALL4 in lung cancer and its importance in cell proliferation. *Oncology reports*. 2011;26(4):965-70.