

Regulation der Genexpression

U. Strähle, M. März, S. Rathnam, S. Rastegar, ITG

Einleitung

Leben beruht auf der geordneten Realisation genetischer Information, die im Genom im Zellkern niedergelegt ist. Das Genom des Menschen und des Zebrafischarbais, einem Süßwasserfisch, haben beide ungefähr 25000 Gene [1] (http://www.sanger.ac.uk/Projects/D_rerio/). Die Zahl der Gene unterscheidet sich daher in höheren und niederen Wirbeltieren kaum und selbst der Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* hat immer noch eine respektable Zahl von 19.500 Genen [1].

Gene sind Informationseinheiten, die meistens für ein Protein kodieren. Die Geninformation wird in mehreren Schritten in Proteine übersetzt (Abb. 1). Dazu bedarf es einer Lesemaschinerie, die die genetische Information, die in der Buchstabenabfolge aus A, G, C, und T auf der Desoxyribonukleinsäure (DNS) kodiert wird, entschlüsselt. Das menschliche Genom hat insgesamt 3 Milliarden solcher Buchstaben. Jedes Gen besteht aus einer spezifischen Abfolge dieser vier Buchstaben des genetischen Alphabets. Die Lesemaschine – auch RNA-Polymerase genannt – beginnt an einer definierten Region und Richtung mit dem Ablesen der genetischen Information und schreibt diese in eine Botenribonukleinsäure (Abb. 1, mRNA) um. Diese Ribonukleinsäure wird nach Prozessierung (auch Spleißen genannt) weitergeleitet an Ribosomen – universale Proteinfabriken, die in allen Lebewesen vorkommen (Abb. 1). Diese Ribosomen schreiben dann die Botenribonukleinsäuren in eine Aminosäurekette um, die durch

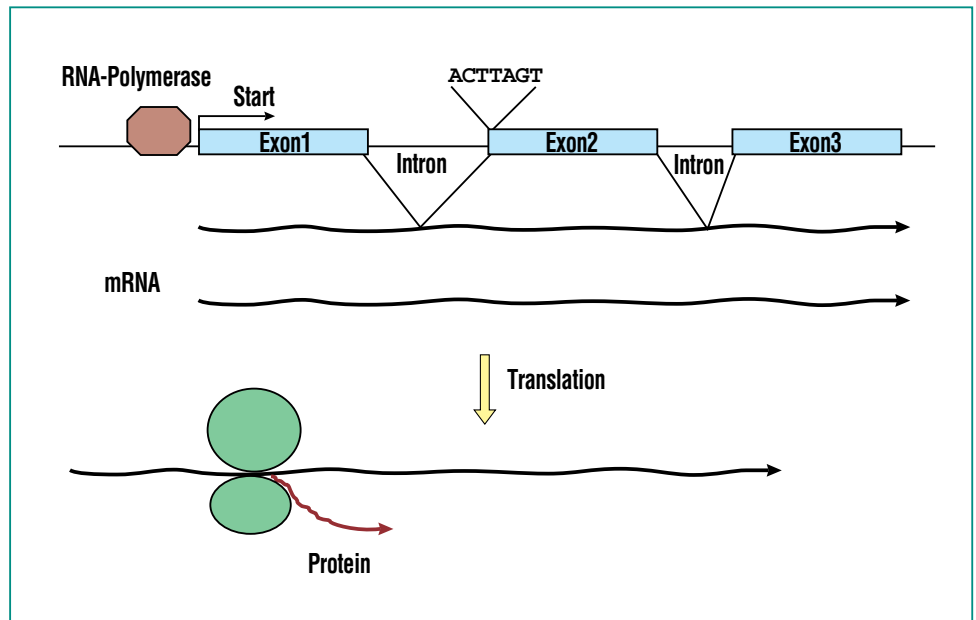


Abb. 1: Vom Gen zum Protein. Gene sind durch eine Startstelle definiert – den sogenannten Promotor – an dem die RNA-Polymerase bindet und die Transkription beginnt. Gene sind in der Regel aus Exonen und dazwischen liegenden Intronen zusammengesetzt. Die RNA-Polymerase schreibt nun das Gen mit allen Exonen und Intronen in eine Boten-RNA um. In einem parallel ablaufendem Vorgang werden die Introne entfernt, so dass ein kohärenter Strang von Exonen entsteht, die mit ihrem Triplet-Code für Proteine kodieren. Dieser Triplet-Code, aus den vier Nukleotiden A, G, C und T zusammengesetzt, wird dann mit Hilfe der Ribosomen (grün) in Protein umgeschrieben.

die spezifische Abfolge der 20 natürlichen Aminosäuren die Struktur und Funktion der verschiedenen Proteintypen unserer Zellen bestimmt.

Es werden nicht immer alle Gene in allen Zelltypen und unter allen physiologischen Bedingungen abgelesen. Vielmehr ist die Arbeit der RNA-Polymerase, in dem so genannten Prozess der Gen-Transkription, in höchstem Maße reguliert. Sowohl Entwicklungsvorgänge, die während der Entstehung unseres Körpers ablaufen, aber auch Anpassung und Steuerung der Zellfunktion im erwachsenen Organismus führen häufig zu unterschiedlicher Transkription und

damit differenzieller Realisation der genetischen Information. Man bezeichnet diesen Prozess auch als Genexpression.

Steuerung der Genexpression

Während der Entwicklung spielt die unterschiedliche Genexpression eine essenzielle Rolle. Als Antwort auf Signale von Nachbarzellen werden Zellen dazu gebracht, sich in höchst spezialisierte Zellformen wie Muskelzellen, Nervenzellen oder Hautzellen, um nur drei Beispiele der mehr als 200 Zelltypen unseres Körpers zu nennen, umzuwandeln. Diese Zellspezialisierung führt dazu, dass unter-

schiedliche Sätze von Genen in diesen speziellen Zelltypen abgelesen bzw. exprimiert werden. Eine Nervenzelle unterscheidet sich daher primär von einer Muskelzelle durch die Gene, die in ihr abgelesen werden.

Gene sind nicht nur dadurch charakterisiert, dass sie Startstellen für die Lesemaschine haben und für den Bau von Proteinen kodieren. Gene haben auch Schalter, die die Transkription – also das Ablesen der genetischen Information – steuern. Diese Schalter können die Expression bestimmter Gene in Zelltypen wie Nervenzellen oder Muskelzellen steuern. Diese Schalter können aber auch dazu dienen,

Genexpression flexibel herauf- oder herunterzuregulieren, um auf physiologische Einflüsse zu reagieren. Einflüsse können sein: die Verfügbarkeit von Nährstoffen oder aber auch die Anwesenheit von Schadstoffen. Umweltgifte zum Beispiel können bestimmte Gene in bestimmten Zellen ansteuern, die dann zum Teil als Schutzmechanismus gegen diese Einflüsse dienen (L.Yang und U.S., in Vorbereitung).

Diese Schalter haben die Eigenschaft, dass sie in allen Orientierungen vor, in und nach kodierenden Regionen lokalisiert sein können, auch weit von der kodierenden Region entfernt [2] (Abb. 2, 3).

Diese Schalter bestehen ebenfalls aus den vier Buchstaben des genetischen Alphabets. Sie können bis zu 200–300 Buchstaben (auch Basenpaare genannt) umfassen und dienen als Bindestellen, an die Transkriptionsfaktoren binden können (Abb. 2). Transkriptionsfaktoren sind Proteine, die auf die Lesemaschine, die Polymerase, Einfluss nehmen können. Diese Transkriptionsfaktoren können Aktivatoren der Polymerase sein. Es gibt aber auch Repressoren, die die Aktivität der Lesemaschine unterbinden.

Das menschliche Genom kodiert für 1962 Transkriptionsfaktoren [1], d. h. acht Prozent des gesamten menschlichen Genoms werden benötigt, um die Gentranskription zu steuern. Dies unterstreicht die Bedeutung der differentiellen Transkription für die Entstehung und Funktion unseres Körpers.

Das Auffinden von Genschaltern gleicht der Suche nach der Stecknadel im Heuhaufen

Genschalter wurden in den letzten 20 Jahren intensiv untersucht. Im Gegensatz jedoch zu den Regionen, die für den Bauplan von Proteinen kodieren, sind diese Genschalter in ihrer Struktur nur sehr schwer zu erkennen. Das hat zur Folge, dass wir, obwohl wir die Basensequenzen ganzer Genome zur Verfügung haben, in den wenigsten Fällen vorhersagen können, wo die Schalter in den Genen präzise sitzen. Das liegt, wie schon erwähnt, an der variablen Position dieser Schalter in den Genen. Weiterhin sind die DNS-Bindestellen von Transkriptionsfaktoren häufig nur

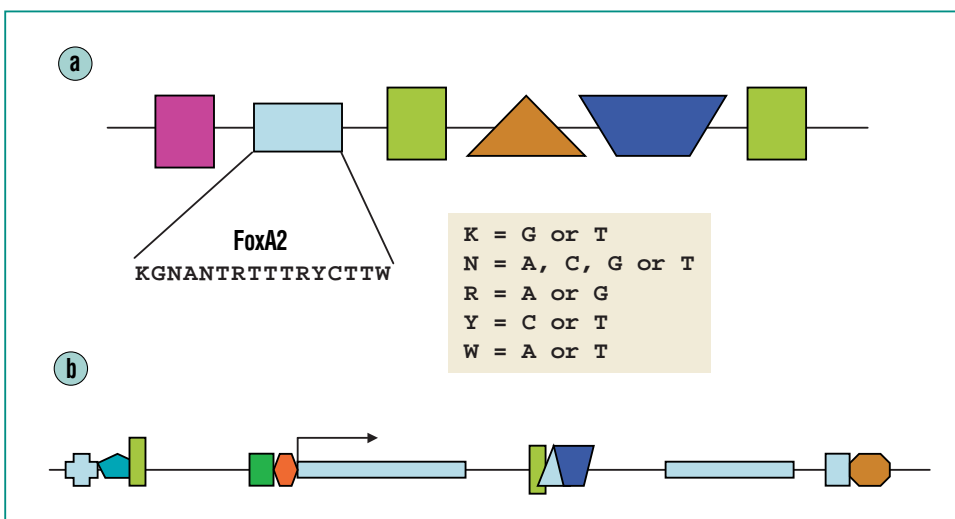


Abb. 2: a) Struktur einer regulatorischen Region (Genschalter), die die Transkription von Genen steuert. Farbige Boxen stellen Transkriptionsfaktoren dar, wie z. B. das Protein FoxA2, das durch die Konsensus-Erkennungssequenz KGNANTRTTRYCTTW ausgezeichnet ist (K = G oder T, N = A, C, G oder T, R = A oder G, Y = C oder T, W = A oder T). Diese Konsensus-Erkennungssequenz wird durch das Aneinanderlegen vieler verschiedener Bindestellen eines bestimmten Transkriptionsfaktors erstellt. Man sieht daran, dass die Erkennungssequenzen von Transkriptionsfaktoren recht variabel sein können. b) Genschalter können vor, in und hinter den kodierenden Abschnitten liegen. Jede dieser Regionen ist in der Regel durch eine Anhäufung von Transkriptionsfaktor-Bindestellen charakterisiert. Häufig gibt es mehrere Genschalter in einem Gen, die entweder redundant wirken oder bestimmte Funktionen haben können.

sehr schwer zu erkennen, da sie an so genannten degenerierten Bindestellen angreifen (Abb. 2), die eine gewisse Flexibilität in der Abfolge der Basenpaare erlauben. Suchprogramme haben daher nach wie vor Schwierigkeiten, solche Sequenzen im Genom zu entdecken [3]. Weiterhin sind häufig nur solche Bindestellen aktiv, die mit anderen Faktoren assoziiert sind, d. h. die Kombinatorik verschiedener Transkriptionsfaktoren in Nachbarschaft ist ein wichtiges Charakteristikum für solche Genschalter [4].

Ein Riesenschritt in unserer Fähigkeit zur Identifizierung von Genschaltern in dem Genom von Wirbeltieren war die Entdeckung, dass die Sequenzen von solchen Schaltern konserviert, d. h. in der Evolution erhalten geblieben sind zwischen niedrigen Wirbeltieren wie den Fischen und höheren Wirbeltieren – den Säugern, wie Maus und Mensch [5]. Man kann daher durch Aneinanderlegen der DNA-Sequenzen verschiedener Wirbeltierarten konservierte Bereiche identifizieren, die nicht für Proteine kodieren, aber mit hoher Wahrscheinlichkeit Genschalter darstellen (Abb. 3, 4). Wir haben solche konservierten regulatorischen Sequenzen sowohl im Neurogenin1 als auch dem Sonic-hedgehog-(shh)-Gen des Zebrafährblings identifiziert und charakterisiert [6–8]. Diese Genschalter sind im Bereich von 60–70 % identisch in ihrer Sequenz mit Abschnitten in den verwandten Genen im menschlichen Genom (Abb. 2, 3).

Leider gilt das nicht für alle Gene. Diese hochkonservierten regulatorischen Sequenzen scheinen vor allem in speziellen Klassen von

Genen vorhanden zu sein. Diese umfassen Regulatorgene und auch Transkriptionsfaktorgene, die in der Entwicklung eine Rolle spielen [9–11]. In anderen Genen, so genannten Haushaltsgenen, die für den normalen Haushalt der Zelle verantwortlich sind, findet man solche hochkonservierten Schalter in der Regel nicht. Dort – nimmt man an – wurde die Struktur der regulatorischen Sequenzen so durcheinander gemischt, dass sie mit den heute zur Verfügung stehenden Suchalgorithmen nicht aufzufinden sind [3, 12]. Es ist nach wie vor ein Rätsel, warum regulatorische Gene so besonders hoch konservierte Genschalter haben müssen. Es gibt Spekulationen, dass dies damit zu tun haben könnte, dass diese Gene in embryonalen Stammzellen nicht abgelesen werden dür-

fen, um die vorzeitige Umwandlung dieser Stammzellen in die spezialisierten Zellen des ausgewachsenen Körpers zu verhindern [13]. Die Analyse der Funktion solcher regulatorischen Elemente ist nach wie vor eine große Herausforderung für die moderne Biologie. Man nimmt an, dass nicht nur einzelne Gene durch bestimmte Transkriptionsfaktoren gesteuert werden, sondern dass ganze Gen-Netzwerke von solchen Faktoren kontrolliert werden. Weiterhin gibt es Evidenz, dass regulatorische Mechanismen sich während der Entwicklung sehr schnell verändern können, so dass nicht die gleichen Prinzipien bzw. Mechanismen die Expression eines gegebenen Gens in der Entwicklung und im erwachsenen Organismus steuern.

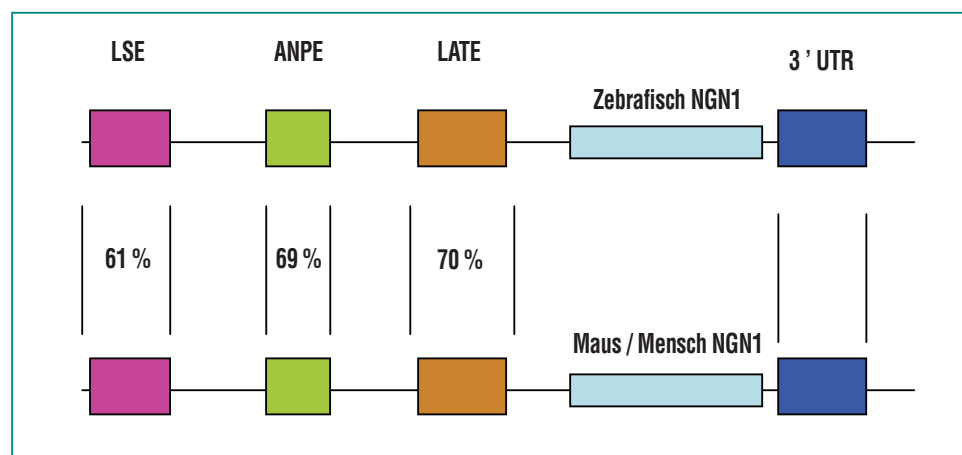


Abb. 3: Die regulatorische Architektur des Neurogenin1-Gens (NGN1). Die farbigen Boxen sind mehrere 100 Basenpaare lang und binden daher eine Vielzahl verschiedener Transkriptionsfaktoren. Das regulatorische Element LSE treibt die Expression in der lateralen Neuralplatte. Das Element ANPE vermittelt Expression in der vorderen Neuralplatte und das Element LATE ist für die Expression im Dienzephalon und in sensorischen Neuronen verantwortlich. Diese Elemente im Zebrafährbling-Gen sind zu 61, 69 und 70 % in ihrer Buchstabenabfolge konserviert mit dem Maus und dem menschlichen NGN1-Gen. Eine weitere hoch konservierte Region findet sich in der 3' nicht translatierten Region (UTR), die sich hinter dem Gen befindet. Eine spezielle Funktion wurde dieser Region bisher nicht zugeordnet.

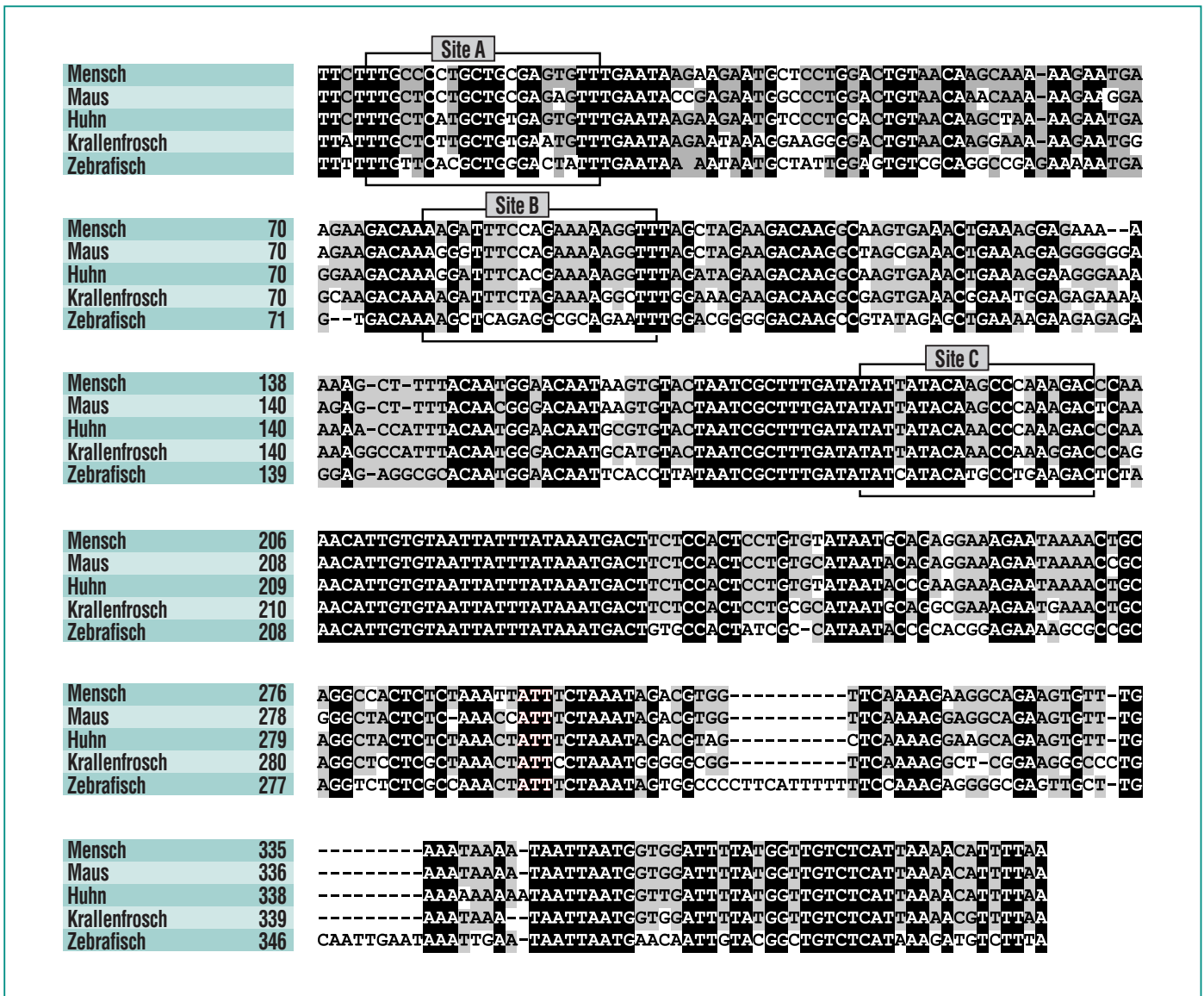


Abb. 4: Sequenzvergleich der LATE-Region des Neurogenin1-Gens. Es wurden hier die Sequenzen der LATE-Region des NGN1-Gens des Menschen, der Maus, des Huhns, des Krallenfrosches *Xenopus tropicalis* und des Zebrafischartes untereinander gereiht. Man sieht, dass die Sequenz der LATE-Region mit ihren fast 400 Basenpaaren über 450 Millionen Jahre der unabhängigen Evolution höchst konserviert geblieben ist.

Sonic hedgehog als Paradigma für einen Entwicklungsregulator mit konservierten regulatorischen Sequenzen

shh Protein, das vom shh-Gen kodiert wird, ist ein sezerniertes Pro-

tein, d. h. es wird von Zellen produziert und in die Umgebung abgegeben [14, 15]. Shh wirkt auf Nachbarzellen, indem es an Rezeptoren auf der Oberfläche bindet und dann über eine Signalkaskade Transkriptionsfaktoren aktiviert, die in der Zielzelle zur Expression bestimmter Gene führen [14, 15].

shh hat weiterhin die Eigenschaft, dass es je nach Menge in den Zielzellen unterschiedliche Antworten auslösen kann. Man nennt ein solches Molekül auch Morphogen, weil es in Abhängigkeit von der Konzentration unterschiedliche Zellumwandlungen steuern kann. So werden z. B. in der Entwicklung des

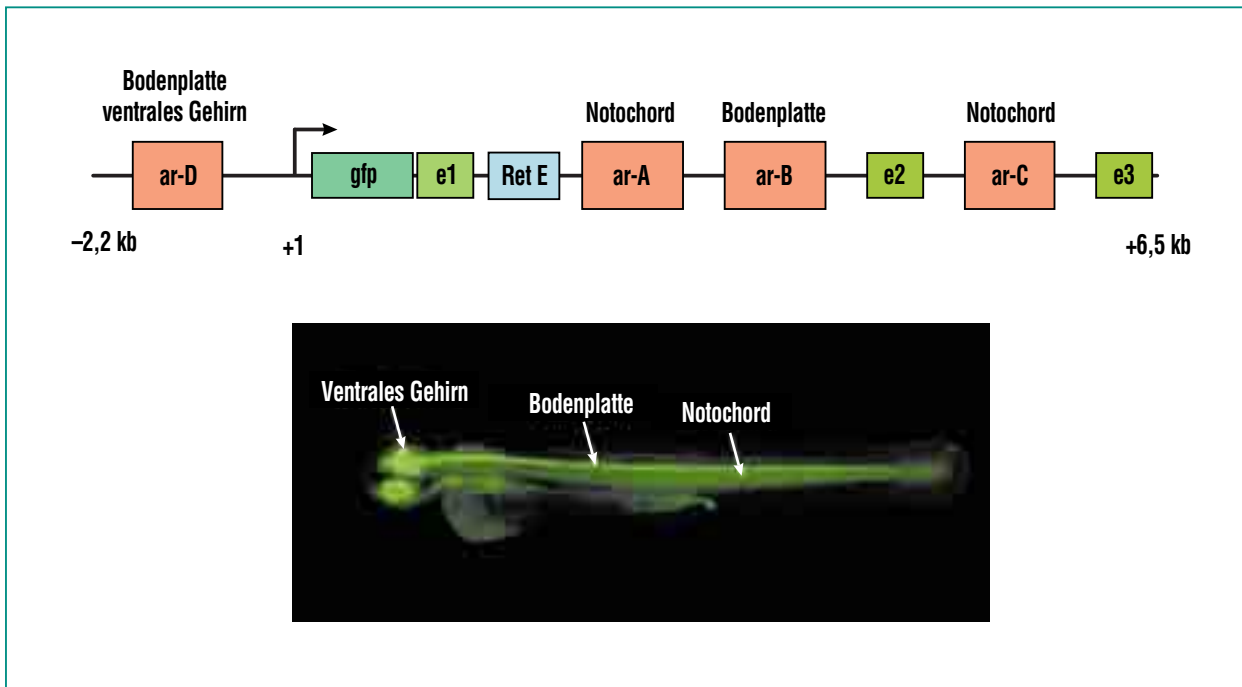


Abb. 5: Struktur des Sonic-hedgehog-Gens. Im Sonic-hedgehog-Gen sind, wie im NGN1-Gen, mehrere Genschalter für die Expression verantwortlich. Die Schalter ar-D und ar-B steuern Expression in der Bodenplatte und ventralem Gehirn. Die Genschalter ar-A und ar-C treiben z. B. Expression im Notochord. RetE ist ein kürzlich entdeckter Genschalter, der die Expression in der Retina treibt.

Neuralrohres, das unser Rückenmark bildet, unterschiedliche Nervenzellen auf der ventralen Seite induziert. Je nachdem wie viel shh-Protein von einer Zelle empfangen wird [14, 15] entwickeln sich embryonale Stammzellen in Motoneurone oder spezielle Typen von Interneuronen. Die Steuerung der Sonic-hedgehog-Expression ist somit von absoluter Wichtigkeit für die normale Entwicklung eines Wirbeltierembryos. Fehlregulierung von shh führt zu Missbildung und kann auch Tumore hervorrufen [14, 15].

In systematischen Analysen des shh-Gens des Zebrafisches konnten wir mehrere Regionen identifizieren, die für die Expression dieses Gens wichtig sind [16–19]. Wir haben in Deletions- und Mu-

tationsansätzen mehrere Genschalter kartiert, die Aspekte der shh-Expression steuern. Diese Genschalter befinden sich sowohl vor der Transkriptionsstartstelle (Abb. 4, 5), als auch in Bereichen der Introne 1 und 2 und sind zum Teil im shh-Gen des Menschen und der Maus konserviert. Diese Genschalter regulieren bestimmte Teilaspekte des Expressionsmusters im Embryo. So finden wir Genschalter wie z. B. ar-D und ar-B, die die Expression in der Bodenplatte, einer Struktur im ventralen Neuralrohr treiben [20]. Andere Genschalter kontrollieren die Expression von shh im Gehirn oder dem Notochord, einer embryonalen Stützstruktur. Dieses Beispiel des shh-Gens zeigt anschaulich wie komplex die regulatorische Struktur von Genen sein kann.

Genschalter als Integrationseinheiten für Signale der Zellkommunikation

shh kontrolliert eine Vielzahl von Prozessen im sich entwickelnden Wirbeltierembryo und im Erwachsenen. Diese umfassen so diverse Prozesse wie die neuronale Differenzierung im Zentralnervensystem, Pankreasentwicklung bis zu Haut, Zahn und Haarbildung, um nur einige Beispiele zu nennen [14, 15]. shh scheint eine grundlegende Funktion auch im Erhalt von Stammzellen zu haben [21]. Dies wirft natürlich die Frage auf, wie ein einziges Signalmolekül eine solche Vielzahl von unterschiedlichen Wirkungen in Zielzellen haben kann. Eine Erklärung, wie oben bereits angesprochen, ist die kon-

zentrationenabhängige Wirkung von shh in Zielzellen. Zusätzlich spielt auch die Kombinatorik verschiedener Signale eine Rolle. Diese Signale steuern parallel geschaltete Signalwege an. Durch Integration dieser Signale können unterschiedliche Genprogramme in den Zielzellen aktiviert werden. Die Integration dieser Signale kann während der Signalübertragung auf dem Weg in den Zellkern durch Protein-Proteinwechselwirkung vollzogen werden. Eine wesentliche Rolle spielen aber sicherlich auch die Genschalter im Genom, die durch ihre freie Kombinierbarkeit zur Integration verschiedener Signaleinflüsse entscheidend beitragen können [4]. Dabei spielt auch die zeitliche Abfolge von Signalereignissen eine Rolle.

Ein Beispiel für dieses Zusammenspiel von verschiedenen Zellkommunikationssignalen liefert die Expression des shh-Genes selbst (Abb. 6). shh wird in der Netzhaut des Auges des Zebrafisches exprimiert und spielt dort eine entscheidende Rolle in der Neurogenese [22, 23]. Im Zebrafisch breitet sich die shh-Expression von einem Initiationspunkt in der Nähe der Nase am Augenstiel, wo später der Sehnerv gebildet wird, wellenförmig über die ganze Netzhaut aus. In diesem Prozess ist das shh-Kommunikationssystem selbst involviert [22, 23]. Es spielen aber auch Signale aus der Fibroblastenwachstumsfaktor-Familie (oder FGF-Familie, von Fibroblast Growth Factors im Englischen) eine wichtige Rolle [24 und S. Rathnam in Vorbereitung]. Das

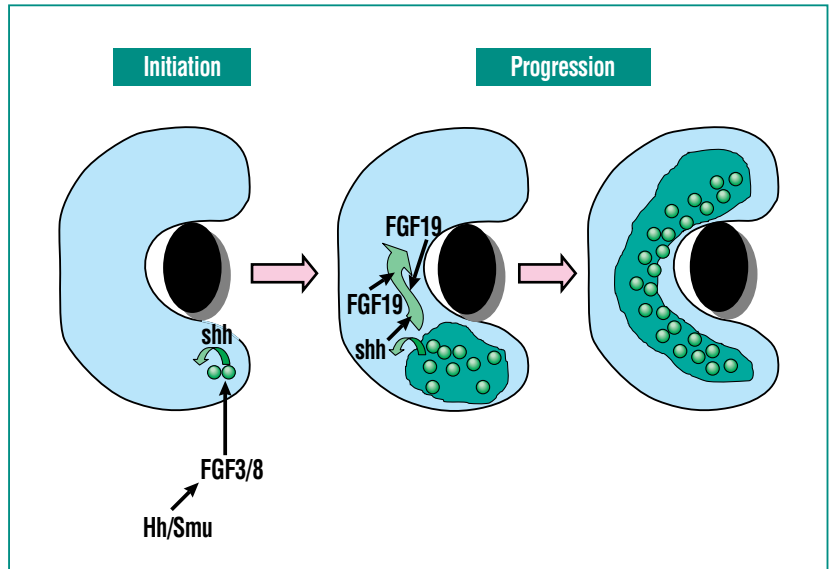


Abb. 6: Modell der Zellkommunikationsprozesse, die zur Etablierung der shh-Expression in der Retina führen. Der Hedgehog-Signalweg (Hhs/Smu) induziert die Bildung des Augenstiels, der dann die Zellkommunikationssignale FGF3 und FGF8 produziert. Diese Signalproteine wirken dann auf die Vorläuferzellen der Retina im Augengebecher und bringen die Zellen in unmittelbarer Nachbarschaft zum Augenstiel dazu shh zu exprimieren. Im nächsten Schritt bewirkt dann shh im Zusammenspiel mit FGF19 die Ausbreitung der shh-Expression in der ganzen Retina.

shh-Signalsystem ist in der Etablierung der Expression zweier FGF-Faktoren, FGF3 und FGF8, im Augenstiel beteiligt [25]. FGF3 und FGF8 schalten dann die shh-Expression in der Netzhaut in der Nähe des Augenstiels an. Zur Ausbreitung bedarf es dann allerdings der Aktion eines weiteren Mitgliedes der FGF-Familie: FGF19. FGF19 steuert zusammen mit Shh in einer selbst-regulatorischen Rückkopplung, die Ausbreitung der shh-Expression in der Retina (S. Rathnam, in Vorbereitung). Dieser Prozess wird im shh-Gen durch einen Genschalter, dem RetE, gesteuert (Abb. 5). Dieser Genschal-

ter integriert somit Einflüsse des FGF- und shh-Signalweges. Dieses Beispiel der shh-Expression in der Retina beschreibt anschaulich wie bestimmte Genexpressionsprozesse in der Entwicklung gesteuert werden. Dabei hat die Integration verschiedener Signale eine große Bedeutung, da damit spezifische Genprogramme in den Zielzellen gesteuert werden können.

Literatur

- [1] D.N. Messina, J. Glasscock, W. Gish, M. Lovett, *An ORFeome-based analysis of human transcription factor genes and the construction of a microarray to interrogate their expression*, *Genome Res* 2004, 14(10B), 2041–2047
- [2] H.E. Davidson, *The regulatory genome – gene regulatory networks in development and evolution*, London, Academic Press, 2006
- [3] G. Elgar, *Different words, same meaning: understanding the languages of the genome*, *Trends Genet* 2006, 22(12), 639–641
- [4] R.S. Mann, S.B. Carroll, *Molecular mechanisms of selector gene function and evolution*, *Curr Opin Genet Dev* 2002, 12(5), 592–600
- [5] F. Muller, P. Blader, U. Strähle, *Search for enhancers: teleost models in comparative genomic and transgenic analysis of cis regulatory elements*, *Bioessays* 2002, 24(6), 564–572
- [6] P. Blader, C.S. Lam, S. Rastegar, R. Scardigli, J.C. Nicod, N. Simplicio, C. Plessy, N. Fischer, C. Schuurmans, F. Guillemot, et al., *Conserved and acquired features of neurogenin1 regulation*, *Development* 2004, 131(22), 5627–5637
- [7] P. Blader, C. Plessy, U. Strähle, *Multiple regulatory elements with spatially and temporally distinct activities control neurogenin1 expression in primary neurons of the zebrafish embryo*, *Mech Dev* 2003, 120(2), 211–218
- [8] F. Müller, B. Chang, S. Albert, N. Fischer, L. Tora, U. Strähle, *Intronic enhancers control expression of zebrafish sonic hedgehog in floor plate and notochord*, *Development* 1999, 126(10), 2103–2116
- [9] C. Plessy, T. Dickmeis, F. Chalmel, U. Strähle, *Enhancer sequence conservation between vertebrates is favoured in developmental regulator genes*, *Trends Genet* 2005, 21(4), 207–210
- [10] T. Dickmeis, C. Plessy, S. Rastegar, P. Aanstad, R. Herwig, F. Chalmel, N. Fischer, U. Strähle, *Expression profiling and comparative genomics identify a conserved regulatory region controlling midline expression in the zebrafish embryo*, *Genome Res* 2004, 14(2), 228–238
- [11] A. Sandelin, P. Bailey, S. Bruce, P.G. Engstrom, J.M. Klos, W.W. Wasserman, J. Ericson, B. Lenhard, *Arrays of ultraconserved non-coding regions span the loci of key developmental genes in vertebrate genomes*, *BMC Genomics* 2004, 5(1), 99
- [12] S. Rastegar, S. Albert, I. Le Roux, N. Fischer, P. Blader, F. Muller, U. Strähle, *A floor plate enhancer of the zebrafish netrin1 gene requires Cyclops (Nodal) signalling and the winged helix transcription factor FoxA2*, *Dev Biol* 2002, 252(1), 1–14
- [13] B.E. Bernstein, T.S. Mikkelsen, X. Xie, M. Kamal, D.J. Huebert, J. Cuff, B. Fry, A. Meissner, M. Wernig, K. Plath, et al., *A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells*, *Cell* 2006, 125(2), 315–326
- [14] P.W. Ingham, A.P. McMahon, *Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles*, *Genes Dev* 2001, 15(23), 3059–3087
- [15] A.P. McMahon, P.W. Ingham, C.J. Tabin, *Developmental roles and clinical significance of hedgehog signaling*, *Curr Top Dev Biol* 2003, 53, 1–114
- [16] F. Müller, S. Albert, P. Blader, N. Fischer, M. Hallonet, U. Strähle, *Direct action of the Nodal-related signal Cyclops in induction of sonic hedgehog in the ventral midline of the CNS*, *Development* 2000, 127(18), 3889–3897
- [17] F. Müller, S. Albert, N. Fischer, D. Biellmann, C.J. Neumann, P. Blader, U. Strähle, *Two mechanisms of floor plate specification in the zebrafish embryo*, *Development* 2002, in revision
- [18] F. Muller, B. Chang, S. Albert, N. Fischer, L. Tora, U. Strähle, *Intronic enhancers control expression of zebrafish sonic hedgehog in floor plate and notochord*, *Development* 1999, 126(10), 2103–2116
- [19] R. Ertzer, F. Muller, Y. Hadzhiev, S. Rathnam, N. Fischer, S. Rastegar, U. Strähle, *Cooperation of sonic hedgehog enhancers in midline expression*, *Dev Biol* 2007, 301(2), 578–589
- [20] U. Strähle, C.S. Lam, R. Ertzer, S. Rastegar, *Vertebrate floor-plate specification: variations on common themes*, *Trends Genet* 2004, 20(3), 155–162
- [21] Nicolis SK: *Cancer stem cells and „stemness“ genes in neuro-oncology*, *Neurobiol Dis* 2007, 25(2):217–229.
- [22] C.J. Neumann, C. Nüsslein-Volhard, *Patterning of the zebrafish retina by a wave of sonic hedgehog activity*, *Science* 2000, 289(5487), 2137–2139.
- [23] A. Shkumatava, S. Fischer, F. Muller, U. Strähle, C.J. Neumann, *Sonic hedgehog, secreted by amacrine cells, acts as a short-range signal to direct differentiation and lamination in the zebrafish retina*, *Development* 2004, 131(16), 3849–3858
- [24] J.R. Martinez-Morales, F. Del Bene, G. Nica, M. Hammerschmidt, P. Bovolenta, J. Wittbrodt, *Differentiation of the vertebrate retina is coordinated by an FGF signaling center*, *Dev Cell* 2005, 8(4), 565–574
- [25] Z.M. Varga, A. Amores, K.E. Lewis, Y.L. Yan, J.H. Postlethwait, J.S. Eisen, M. Westerfield, *Zebrafish smoothed functions in ventral neural tube specification and axon tract formation*, *Development* 2001, 128(18), 3497–3509