

# Modificaciones de la cromatina, regulación génica y cáncer

MARÍA DOLORES DELGADO VILLAR

## RESUMEN

El DNA está empaquetado en la célula enrollado en un octámero de histonas formando la cromatina. La cromatina y sus modificaciones se consideran hoy día aspectos críticos de la regulación de la expresión génica. Las modificaciones que afectan a cómo el material genético se empaqueta y utiliza, sin cambiar la información genética, se denominan modificaciones epigenéticas. Las más importantes son: i) las modificaciones postraduccionales de las histonas como acetilación, metilación y otras que afectan tanto a la estructura global de la cromatina como a la activación o represión génica, ii) el remodelado de la cromatina por factores dependientes de ATP, que cambian la estructura, composición y posición de los nucleosomas y iii) la metilación del DNA en el dinucleótido CpG como mecanismo silenciador de la transcripción. El regulador transcripcional CTCF es un importante organizador de la cromatina y regulador epigenético de genes implicados en cáncer. Las alteraciones en la información epigenética dan lugar a desregulación de la expresión, resultando en el desarrollo del cáncer. Las células cancerosas presentan hipometilación global del DNA, hipermetilación de islas CpG de promotores y patrones alterados de modificación de histonas. Estas alteraciones principalmente resultan en el silenciamiento de genes importantes para la regulación de la proliferación celular normal. Además, numerosos genes que codifican proteínas modificadoras de la cromatina se han encontrado alterados en diversos tumores. La terapia con fármacos modificadores de la cromatina tiene un enorme potencial en el tratamiento del cáncer.

## SUMMARY

DNA is packaged within the cell wrapped around an octamer of histones forming the chromatin. Chromatin modifications are considered nowadays critical aspects of gene expression regulation. Modifications which affect at how the genetic material is packaged and used without change the genetic information are known as epigenetic modifications. The most important are: i) histones post-translational modifications including acetylation, methylation and others, which affect both the global structure of the chromatin and the gene activation or repression, ii) chromatin remodelling by ATP dependent factors which change the structure, composition and position of nucleosomes, and iii) DNA methylation in CpG dinucleotides as a mechanism for silencing transcription. The transcriptional regulator CTCF is an important chromatin organizer and an epigenetic regulator of genes involved in cancer. Alterations in the epigenetic information give rise to expression deregulation leading to tumor development. Cancer cells are characterized by global DNA hypomethylation, hypermethylated CpG islands in promoters and aberrant patterns of histone modifications. These alterations mainly result in the silencing of genes important for the regulation of normal cell proliferation. Furthermore, several genes which codify chromatin modifying proteins have been found altered in different tumors. Treatments with drugs that modify the chromatin have enormous potential for cancer therapy.

## INTRODUCCIÓN

La regulación de la expresión génica constituye un proceso esencial en el mantenimiento de las diferencias estructurales y funcionales de las células. El desarrollo y mantenimiento de la especialización celular es producto de un sofisticado control génico cuyos mecanismos se están empezando a conocer y cuya comprensión será fundamental para el esclarecimiento de la base molecular de numerosas enfermedades. El empaquetamiento del DNA en la cromatina y sus modificaciones se consideran hoy día aspectos fundamentales de la regulación de la expresión génica. El término epigenética se define como cambios heredables en la expresión génica que no son debidos a alteraciones en la secuencia del DNA. Los mecanismos epigenéticos incluyen las modificaciones de las histonas, el remodelado de la cromatina y la metilación del DNA y son importantes para el establecimiento de patrones correctos de expresión génica. Las alteraciones en la información epigenética dan lugar a desregulación de la expresión, resultando en el desarrollo de diversas patologías, entre ellas el cáncer. En este

artículo se recogen las últimas investigaciones sobre las modificaciones de la cromatina, su papel en la regulación de la expresión génica y las alteraciones epigenéticas en cáncer.

## **TRANSCRIPCIÓN GÉNICA Y ESTRUCTURA DE LA CROMATINA. EL NUCLEOSOMA**

El punto de control de expresión génica mejor conocido y más importante en eucariotas es el inicio de la transcripción. Los mecanismos de control a nivel de transcripción determinan si un gen particular será transcrito y con qué frecuencia. La regulación en esta primera etapa se consigue gracias a las acciones combinadas de factores de transcripción que se unen a elementos reguladores cercanos al sitio de iniciación de la transcripción. Los mecanismos de transcripción del DNA «desnudo» son muy similares entre organismos eucariotas y procariotas [revisado en (1, 2) y en otro capítulo de este libro]. El inicio de la transcripción de un gen comienza con la unión de factores de transcripción activadores a secuencias reguladoras específicas situadas 5' del sitio de iniciación de la transcripción. Esto da lugar a la unión de proteínas adaptadoras como «Mediator», que facilitan la unión de los factores generales de la transcripción. La RNA polimerasa II se sitúa en el promotor, junto con diversos factores generales (TFIID, TFIIA, TFIIB) formando el complejo de preiniciación. El dominio carboxi-terminal de la RNA polimerasa II es fosforilado por TFIIH y comienza la transcripción y la subsiguiente elongación y procesamiento del mRNA.

Sin embargo, el DNA no está «desnudo» en el núcleo, sino fuertemente empaquetado formando la cromatina. Tanto la compactación del DNA (unos 2 m de DNA en un núcleo de 10  $\mu\text{m}$  de diámetro) como el control de la transcripción en los eucariotas se consigue mediante la formación de complejos del DNA con proteínas específicas, las histonas, para dar lugar a la cromatina. Esta compactación es el resultado de la superposición de diversos niveles de plegamiento altamente organizados y afecta a todas las etapas de la transcripción, desde la unión de los activadores, formación del complejo de preiniciación, a la elongación (1).

El nucleosoma constituye la unidad estructural de la cromatina. Fue descrito por Roger Kornberg en 1974 [revisado en (3)] y está compuesto por un octámero de cuatro histonas (H3, H4, H2A, H2B), proteínas muy básicas alrededor de las cuales se enrollan 147 pares de bases de DNA dando 1,65 vueltas (Figura 1A). Las histonas se estructuran en dos dominios: una región central plegada, que interacciona con el DNA, formada por una hélice- $\alpha$  larga, flan-

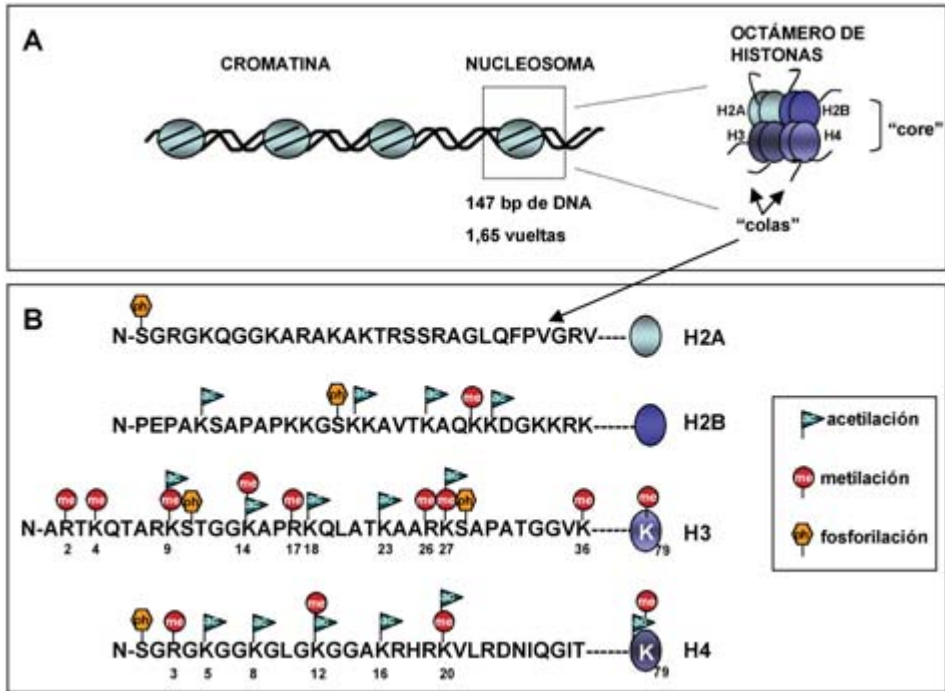


FIGURA 1. Modificaciones postraduccionales de las histonas. (A) Esquema de un nucleosoma, la unidad estructural de la cromatina, compuesto por un octámero de histonas «core» alrededor del cual se enrolla el DNA. Se muestran los dominios desestructurados N-terminal o «colas de las histonas». (B) Las principales modificaciones postraduccionales de las colas de las histonas son acetilación (ac), metilación (me) y fosforilación (ph), en residuos específicos de lisina (K), arginina (R) y serina (S) [figura modificada de (10)].

queda por dos hélices- $\alpha$  cortas, y un dominio N-terminal poco estructurado, de 15 a 30 residuos, denominado «colas de histonas». El dominio N-terminal es flexible y sale fuera del núcleo central o «core» del nucleosoma (Figura 1A). Las colas de las histonas sufren diversas modificaciones postraduccionales (Figura 1B) que afectan a la estructura de la cromatina y a su función.

Además de las histonas canónicas, que son los componentes universales de los nucleosomas, existen formas variantes de histonas implicadas en regulación de la transcripción (1, 4-6). A diferencia de las canónicas, las variantes de histonas se expresan fuera de la fase S del ciclo celular y se incorporan a la cromatina de forma independiente a la replicación del DNA, para responder a distintas situaciones de la célula. Algunas de las variantes de histonas son: la H2A.Z que marca los extremos 5' de los genes en la eucromatina (7, 8). Está localizada en los límites de la heterocromatina, flanqueando la heterocromatina silente impidiendo que ésta se

extienda (ver más adelante). La variante H2AX está implicada en respuesta a daño al DNA. Contiene un residuo C-terminal conservado que se fosforila tras daño genotóxico y tiene un papel represor de la transcripción (1).

La estructura y modificaciones de la cromatina representan un nivel adicional de regulación para todos los procesos metabólicos del DNA incluidos transcripción, recombinación, reparación del DNA, replicación, formación del centrómero, etc. actuando como una plataforma donde se integran las señales biológicas y tienen lugar las respuestas moleculares (1, 9, 10). La célula ha desarrollado diversos mecanismos para modificar de forma temporal/espacial la organización de la cromatina. Las modificaciones que afectan a cómo el material genético es empaquetado y utilizado, sin que cambie la secuencia del DNA, se denominan modificaciones epigenéticas. El epigenoma se refiere a la descripción completa de estos cambios heredables a lo largo del genoma (11). Las modificaciones epigenéticas más importantes, que se irán detallando a lo largo de este capítulo, son: i) Modificaciones postraduccionales de las histonas que facilitan o impiden la asociación de proteínas reguladoras y factores de transcripción con el DNA (1, 10, 12-14), ii) Remodelado de la cromatina por factores dependientes de ATP, que desplazan o desestabilizan los nucleosomas, exponiendo u ocultando el DNA a las interacciones con factores de transcripción (15), iii) Metilación del DNA en la posición C-5 de residuos de citosina presentes en el dinucleótido CpG por las DNA metil-transferasas. La metilación del DNA de las células eucariotas actúa como silenciador de la transcripción. Existe por tanto una estrecha correlación entre metilación e inactivación transcripcional.

## MODIFICACIONES DE LA CROMATINA Y REGULACIÓN GÉNICA

### Modificaciones postraduccionales de histonas

Se han encontrado al menos ocho tipos de modificaciones postraduccionales en las histonas (tabla 1). Las más conocidas son acetilación, metilación y fosforilación (Figura 1B). La metilación puede ser mono-, di- o tri-metil lisina, o mono-di-metil arginina (16). Esta gran variedad de modificaciones, y la combinación entre ellas, proporciona un enorme potencial de respuestas funcionales. Las modificaciones en histonas son dinámicas y cambian rápidamente en respuesta a estímulos celulares. Se han identificado las enzimas responsables de estas modificaciones (algunos ejemplos se muestran en la tabla 1), así como muchos de los enzimas que eliminan las modificaciones. Con la excepción de la metilación, las modificaciones de las histonas resultan en un cambio en la carga neta de los nucleosomas, lo que afecta a las interacciones DNA-histona (1).

TABLA 1. *Modificaciones postraduccionales de histonas. Tipos de modificaciones, residuos de aminoácidos que se modifican, funciones reguladas y ejemplos de enzimas implicadas en la modificación (1, 12) [una lista más detallada de las enzimas y la nueva nomenclatura aparece en (17)]. ac, acetilación; me, metilación; ph, fosforilación; ub, ubiquitilación; su, sumoilación; ar, ADP-ribosilación.*

<i>Modificaciones</i>	<i>Residuos modificados</i>	<i>Función</i>	<i>Enzimas</i>
Acetilación	K-ac	Transcripción (activación), reparación, replicación	Lisina acetil transferasas (KATs) ej. PCAF, CBP, p300, TIP60
Metilación (lisinas)	K-me1, K-me2, K-me3	Transcripción (activación o represión), reparación	Lisina metil transferasas (KMTs) ej. MLL1, SET1
Metilación (argininas)	R-me1, R-me2	Transcripción (activación o represión)	Arginina metil transferasas ej. PRMT, CARM1
Fosforilación	S-ph, T-ph	Transcripción (activación), reparación, condensación	Serin/treonin quinasas ej. MSK1, Mst1, CKII
Ubiquitilación	K-ub	Transcripción (activación o represión)	Ubiquitilasas ej. UbcH6
Sumoilación	K-su	Transcripción (represión)	
ADP-ribosilación	E-ar	Transcripción (¿?)	PARPs (poli ADP Ribosa Polimerasas)
Deiminación (arginina>citrulina)	R>Cit	Transcripción (represión)	PAD14
Isomerización de prolina	P-cis>P-trans	Transcripción (represión)	Prolil-isomerasas

Las modificaciones de las histonas funcionan mediante dos mecanismos: interfieren en los contactos entre nucleosomas, por ejemplo para «abrir» la cromatina en el caso de la acetilación, o interaccionan con proteínas o complejos proteicos efectores o transductores. Estos se unen vía dominios específicos, como los bromo-dominios que reconocen residuos acetilados o los cromo-dominios que reconocen residuos metilados (Figura 2A) (12, 14). Las distintas modificaciones de histonas actúan de forma combinada para formar el denominado «código de las histonas», que es leído por proteínas que contienen dichos dominios específicos de interacción (10, 14, 18, 19). Estas proteínas son los efectores que inician respuestas biológicas como activación o represión de la transcripción, condensación cromosómica, etc. El cómo este código se establece, se lee y se hereda es objeto de intensa investigación y existen excelentes revisiones sobre el código de las histonas (6, 10, 12, 16). Las consecuencias funcionales de las modificaciones de histonas se pueden dividir, en dos categorías: el establecimiento del estado global de la

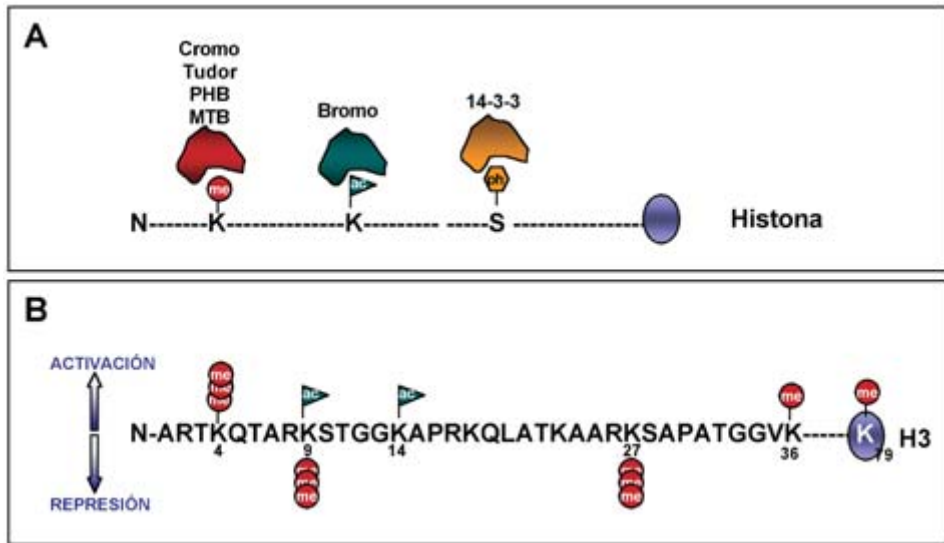


FIGURA 2. Interacción de proteínas con histonas modificadas y efectos en la transcripción. (A) Dominios utilizados por proteínas efectoras para reconocer histonas metiladas, acetiladas o fosforiladas. (B) Resumen de los efectos que produce la metilación o acetilación de la histona H3 sobre la activación o represión de la expresión génica.

cromatina y la regulación de procesos específicos como transcripción, reparación o replicación del DNA. A continuación se describen algunos de estos efectos.

### Modificaciones de las histonas y estados de la cromatina

En función del grado de condensación la cromatina puede dividirse en: *heterocromatina*, regiones de la cromatina muy densamente empaquetadas siempre inactivas, que no se expresan, y *euromatina*, regiones relativamente dispersas poco condensadas que ocupan la mayor parte del núcleo.

La heterocromatina, abundante en telómeros y centrómeros, es importante para la protección de los extremos de los cromosomas y la separación de las cromátidas en mitosis. La heterocromatina tiende a ser rica en secuencias repetitivas, con bajo contenido en genes y transcripcionalmente silente. El estado de heterocromatina silente se asocia con niveles bajos de acetilación y niveles elevados de metilación en algunos residuos de las histonas como H3K9, H3K27 y H4K20 (12). La metilación de la histona H3 en la lisina 9 (H3K9) está implicada en el silenciamiento de la heterocromatina (16). La represión implica la unión al promotor

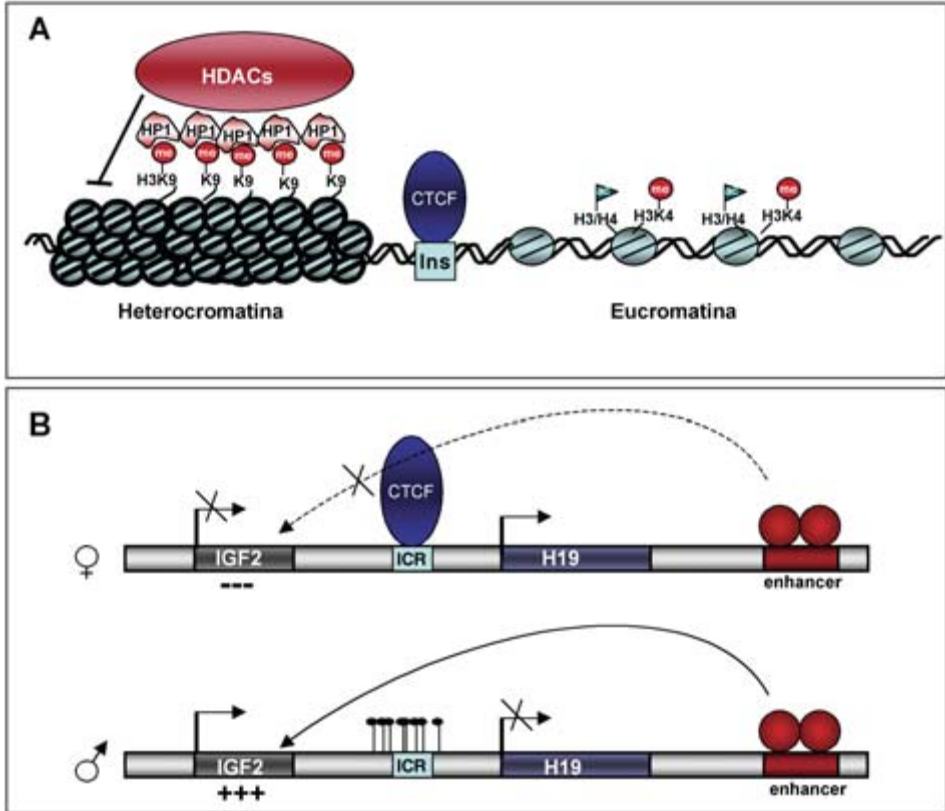


FIGURA 3. CTCF es un factor multifuncional regulador de la cromatina. (A) CTCF se une a secuencias del DNA denominadas insulators (Ins) y actúa como barrera impidiendo que la heterocromatina se extienda hacia la eucromatina. Se muestran marcas de metilación de heterocromatina silente (histona H3 en la lisina 9, H3K9) que atraen a complejos corepresores (HP1 e histona deacetilasas HDAC) para reprimir la expresión génica. Algunas marcas de eucromatina activa son acetilación de histonas H3 y H4 y metilación de la histona H3 en la lisina 4 (H3K4). (B) CTCF regula la impronta génica del locus IGF2/H19. En el alelo materno CTCF se une al DNA no metilado del ICR (Imprinting Control Region) impidiendo la expresión de IGF2. Este solo se expresa a partir del alelo paterno, cuyo ICR está metilado y CTCF no se puede unir, permitiendo la activación de IGF2 por los enhancers. En ciertos tumores se produce pérdida de impronta génica (LOI, Lost of Genomic Imprinting) de este locus.

de los genes reprimidos de HP1, proteína con un cromodominio que reconoce residuos H3K9 metilados (Figura 3A). El silenciamiento de la heterocromatina se propaga por la acción de histona-metil-transferasas que metilan nuevos residuos de H3K9 con la subsiguiente unión de más moléculas de HP1 (16).

En las regiones de eucromatina el DNA presenta mayor flexibilidad funcional: los genes pueden ser activados o permanecer inactivos y el DNA puede ser



desempaquetado para la replicación o la reparación. En general, los genes transcripcionalmente inactivos presentan bajos niveles de acetilación, metilación y fosforilación, mientras que la eucromatina transcripcionalmente activa tiene niveles elevados de acetilación. La acetilación de las histonas H3 y H4 y la di- o tri-metilación de H3K4 y la presencia de la variante de histona H2AZ son modificaciones típicas de eucromatina (1, 7). Algunas de estas modificaciones alteran directamente la estructura de alto orden de la cromatina. Por ejemplo, la acetilación de H4K16 inhibe la formación de fibras compactas de 30 nm (20, 21).

En mamíferos, la demarcación entre estos diferentes estados de la cromatina viene delimitada por elementos barrera (22). El regulador transcripcional CTCF, cuyas funciones se detallarán más adelante, se une a elementos aislantes del DNA o insulators e impide que la heterocromatina se extienda hacia regiones de eucromatina (Figura 3A) [revisado en (23, 24)].

### **Modificaciones de histonas y transcripción génica**

El empaquetamiento del genoma eucariótico en la cromatina tiene gran influencia en la transcripción génica. La regulación de la expresión génica requiere de factores de transcripción que, una vez unidos a las secuencias reguladoras de los genes, inicien una cascada de modificaciones que resulten en la expresión o silenciamiento del gen. Algunas modificaciones de la cromatina a nivel local se han asociado a activación y otras a represión génica (Figura 2B), sin embargo los efectos parecen depender del contexto (12). La mayoría de las modificaciones se distribuyen de forma específica en la región reguladora 5' del gen, el promotor proximal, el extremo 5' del ORF (Open Reading Frame) y el extremo 3' del ORF (Figura 4) (1, 25).

La localización de una modificación está altamente regulada y es crucial para sus efectos en la transcripción. Algunas de las modificaciones más conocidas son:

Acetilación y deacetilación de las histonas. Se han identificado y caracterizado proteínas con actividad lisina acetil transferasas, con un importante papel en la regulación génica (26). Las histonas son ricas en lisinas y son dianas de acetilación (Figura 1B) (10). Las colas de las histonas son acetiladas en el grupo epsilon-amino de los residuos de lisina. La acetilación tiene un efecto activador de la transcripción ya que reduce fuertemente la afinidad de las histonas por el DNA, al neutralizar la carga positiva de las lisinas. Así, los nucleosomas se empaquetan menos eficientemente, permitiendo que DNA sea más accesible a proteínas reguladoras. Además, las marcas de acetilación de lisinas pueden ser interpretadas vía proteínas efectoras con bromo-dominios (Figura 2A). Los bromo-dominios son módulos proteicos frecuen-

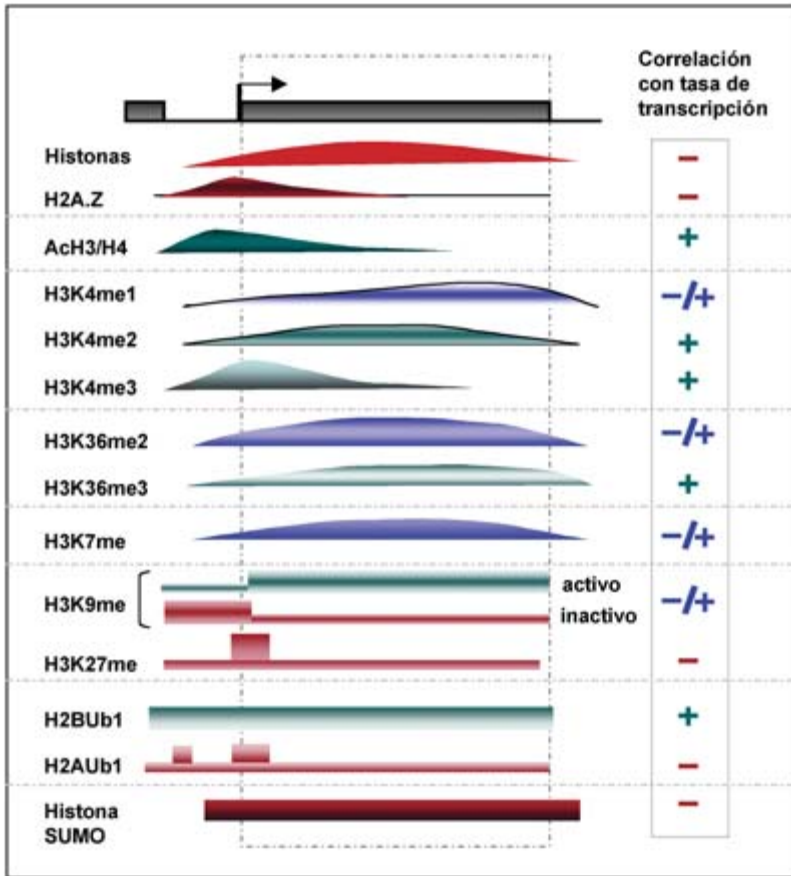


FIGURA 4. Distribución de modificaciones de histonas y tasa de transcripción. Patrones de distribución de las distintas modificaciones de histonas a lo largo de un gen arbitrario donde se muestra la región reguladora 5', el ORF y el extremo 3' final. Las curvas representan los patrones que han sido determinados a partir de estudios globales del genoma. Figura tomada de (1).

temente encontradas en proteínas asociadas a cromatina, especialmente en histona acetil-transferasas (HAT) (14). La acetilación de histonas tiene lugar en múltiples residuos de lisina y es llevada a cabo por varias HATs. La mayoría de las HATs forman parte de grandes complejos multiproteicos (27) y se agrupan en distintas familias como GNAT, MYST, CBP/p300, etc. [ver la lista completa de las familias de histona acetil-transferasas y sus sustratos en (10, 17)]. Los miembros de la familia Gcn5/PCAF (GNAT) funcionan como coactivadores de distintos activadores de la transcripción. Contienen un dominio acetil-transferasa y un bromo-dominio, por el que se unen a los residuos de acetil-lisinas. Este fue el primer dominio de unión a histonas caracterizado estructuralmente [revisado en (14)]. La familia p300/CBP tam-

bién ha sido extensamente estudiada. Los miembros de esta familia son reguladores más globales de la transcripción. Contienen un gran dominio HAT, un bromo-dominio y otras regiones que median interacciones proteína-proteína. Varios miembros de esta familia se han visto alterados por translocaciones cromosómicas en diversos procesos malignos (ver más adelante, tabla 3).

La deacetilación de histonas se correlaciona con compactación de la cromatina y represión transcripcional. Hay varias familias de histonas deacetilasas (HDAC): clase I (HDAC 1, 2, 3 y 8), clase II (HDAC 4, 5, 6, 7, 9 y 10), clase IV (HDAC 11) y la clase III NAD-dependiente de la familia SIRT (sir-tuinas) (10, 28, 29). Las HDAC de clase I, las histona-deacetilasas más conocidas, son ubicuas y presentan localización nuclear. Tienen una elevada homología estructural y contienen zinc en el sitio activo, esencial para su actividad. Están presentes en numerosos complejos de represión junto con co-represores como NcoR, SMRT, MEF, MeCP2, Sin3A, etc. que son atraídos a regiones específicas de la cromatina para reprimir la expresión génica. Los niveles relativos de acetilación de histonas estarán determinados por las actividades enzimáticas contrapuestas HAT y HDAC y el equilibrio controlado de ambas actividades es esencial para la proliferación celular normal.

Metilación de histonas. Las modificaciones postraduccionales por metilación en el nitrógeno en las cadenas laterales de lisinas y argininas de las proteínas son muy estables. En contraste con la acetilación, la metilación suele estar catalizada por enzimas específicos para residuos específicos de las histonas (30). Se han identificado algunas de las enzimas responsables de la metilación de las histonas. Estas se agrupan en varias clases: a) histona metil-transferasas específicas de lisina conteniendo el dominio SET. Son las responsables de las metilaciones en las histonas H3 (residuos K4, K9, K27, K36) y H4 (K20); b) lisina metil-transferasas sin dominio SET, que metilan a H3K79 y c) arginina metil-transferasas que metilan distintos residuos de arginina en las histonas H3 y H4 (16) [para una relación completa y la nueva nomenclatura, ver (10, 17)].

La metilación en residuos de lisina tiene lugar por enzimas con actividad lisina-histona-metil-transferasa (KHMTasa) (16) principalmente en las histonas H3 y H4. Las lisinas pueden aceptar uno, dos o tres grupos metilo y los diferentes estados de metilación de un residuo dado darán lugar a respuestas diferentes. La metilación de histonas puede tener un efecto activador o represor de la expresión (resumido en la Figura 2B). Hay tres sitios implicados en activación: H3K4, H3K36 y H3K79. La metilación de H3K4 crea un sitio de unión de proteínas con cromodominios que, a su vez, atraen a acetil-transferasas para activar la transcripción (31). Además la H3K4 metilada media la asociación de complejos remodeladores de la cromatina que producen cambios en los nucleosomas para la activación de la transcripción (32). Igual-

mente, la metilación en H3K36 y H3K79 se correlacionan con activación transcripcional (10). Recientemente se han predicho e identificado regiones promotoras (marcadas por la trimetilación de H3K4) e intensificadoras en base estudios de alta resolución de los estados de modificación de la cromatina (33). Por otra parte, la metilación de tres residuos de histona: H3K9, H3K27 y H4K20 se ha relacionado con represión transcripcional (12). La metilación en H3K9 (principalmente trimetilación) está implicada en el silenciamiento de la heterocromatina, como se mencionó anteriormente. La metilación en H3K27 se ha encontrado en el silenciamiento de la expresión de genes HOX, en la inactivación del cromosoma X y durante el imprinting genómico (12). Un estudio de alta resolución del genoma completo correlaciona la metilación de histonas H3 y H4, los sitios de unión de CTCF y la presencia de la variante de histonas H2AZ con los perfiles de expresión génica (34).

### **Remodelado de la cromatina**

Los complejos de remodelado de la cromatina son complejos multiproteicos que requieren de la hidrólisis del ATP para alterar los contactos histona-DNA (15). Los mecanismos del remodelado incluyen el desenrollamiento transitorio del DNA del octámero de histonas, la formación de lazos de DNA, o el deslizamiento de los nucleosomas a diferentes posiciones. Como consecuencia se produce un cambio en la accesibilidad del DNA nucleosomal a los factores de transcripción. Existen al menos cinco familias de complejos de remodelado de la cromatina, con diversas funciones biológicas (15, 35). Las más estudiadas son las familias SWI/SNF y ISW1, con un papel en cáncer (36-38).

### **Metilación del DNA**

La metilación del DNA está catalizada por distintas familias de DNA metiltransferasas (DNMTs) formando 5'-metil-citosina [revisado en (39, 40)]. Durante la fase S, las DNMTs copian el patrón de metilación de la hebra parental a la hebra hija del DNA, de forma que la metilación se hereda tras la división celular (41). En el genoma de mamíferos esta modificación tiene lugar en residuos de citosina que preceden a guaninas, es decir, en dinucleótidos CpG. La mayor parte del genoma no contiene el dinucleótido CpG, sin embargo éste se concentra en las denominadas «islas CpG» situadas en las regiones reguladoras 5' de los genes. Se estima que alrededor del 90% de las islas CpG se encuentran no-metiladas en células somáticas normales (42) (Figura 5A). La metilación del DNA es

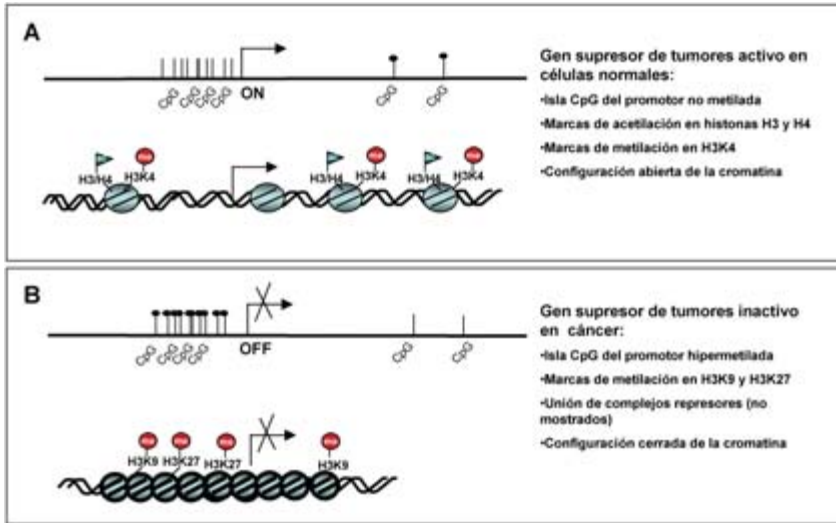


FIGURA 5. Patrones de metilación del DNA y de configuración de la cromatina en células normales y tumorales. (A) Los promotores de los genes supresores de tumores activos en células normales presentan islas CpG no metiladas, marcas de acetilación y metilación de histonas propias de cromatina activa y configuración de cromatina descondensada relativamente libre de nucleosomas. (B) Los genes supresores de tumores silenciados en cáncer presentan promotores con islas CpG hipermetiladas, marcas represivas de metilación de histonas y elevado gado de condensación de la cromatina.

un mecanismo normal de silenciamiento génico con un papel en la represión transcripcional de regiones repetidas y centroméricas, y durante el desarrollo.

Existe una relación funcional entre metilación del DNA y modificaciones de las histonas, ya que hay proteínas de unión al DNA metilado (Methyl-CpG-binding domain proteins, MBD) que atraen a complejos histona deacetilasa e histona metiltransferasas hacia la cromatina (40). La familia de proteínas MBD consta de cinco miembros (MeCP2, MBD 1, MBD 2, MBD 3 y MBD 4) y están asociadas a regiones silenciadas por hipermetilación del DNA (43). Estas regiones suelen estar hipo-acetiladas e hiper-metiladas en residuos específicos de histonas como H3K9 y H3K27 mientras que los promotores de genes activos, no metilados, presentan hiperacetilación de H3 y H4 y metilación de H3K4 (33, 41). La metilación del DNA y las modificaciones de histonas están también relacionadas con el remodelado de la cromatina. Las islas CpG no metiladas de los promotores son hipersensibles a DNAsas y están relativamente libres de nucleosomas, mientras que las metiladas contienen nucleosomas y son resistentes a las nucleasas (41) (Figura 5).

La metilación del DNA es también la base de la inactivación del cromosoma X y de la impronta génica, modificación epigenética que permite que solo el ale-

lo materno o paterno de un gen se exprese. En ambos procesos está implicado el regulador transcripcional CTCF anteriormente mencionado. CTCF regula la impronta génica del locus IGF2/H19 mediante su unión a la región ICR (Imprinting Control Region), no metilada en el alelo materno, impidiendo la expresión del gen IGF2 (Insulin-like Growth Factor). CTCF no se une al alelo paterno, por estar hipermetilada la región ICR, e IGF2 se expresa (Figura 3B). CTCF es una proteína con múltiples funciones como regulador transcripcional, organizador de la cromatina y posible supresor tumoral (44, 45). En células de leucemia CTCF inhibe el crecimiento, induce diferenciación eritroide (46) y regula la transcripción ribosomal (47) mediante su unión a genes ribosomales (Rosa M. et al, no publicado). CTCF aparece desregulado en algunos tumores y participa en la regulación epigenética de genes implicados en cáncer como el supresor de tumores RB (48).

## **MODIFICACIONES DE LA CROMATINA Y CÁNCER**

La desregulación de la expresión génica es una de las características principales de las células cancerosas. En estos últimos años se ha puesto de manifiesto que las alteraciones epigenéticas adquiridas, junto con las alteraciones genéticas, participan en todas las etapas del desarrollo de un tumor. Las alteraciones epigenéticas en cáncer incluyen: i) hipometilación global del DNA, ii) hipermetilación de islas CpG de promotores y iii) patrones alterados de modificación de histonas. Estas alteraciones principalmente resultan en el silenciamiento de genes reguladores clave para la proliferación celular normal. Las modificaciones epigenéticas y su posible aplicación en el diagnóstico y tratamiento del cáncer son temas de investigación muy activos y existen excelente revisiones recientes sobre los mismos (10, 41, 49-54).

### **Metilación del DNA y cáncer**

Las células cancerosas en general presentan un bajo contenido en 5-metil citosinas. Esta hipometilación tiene lugar principalmente en elementos repetitivos del DNA lo que puede dar lugar a inestabilidad genómica y a deleciones o translocaciones cromosómicas (52, 55). Mediante estudios globales de metilación del DNA y microarrays genómicos se han descrito grandes áreas de DNA hipometilado en regiones pobres en genes en células transformadas (56). Durante el desarrollo de un tumor, el grado de hipometilación del DNA va aumentando según la lesión progresa desde la proliferación celular benigna al cáncer invasivo (50). La pérdida de impronta génica (LOI, Lost Of Genomic Imprinting) también está asociada a la hipometilación del DNA en cáncer.

En paralelo a esta hipometilación global, en las células tumorales se produce la hipermetilación de islas CpG, que normalmente no están metiladas. La hipermetilación de los promotores de genes supresores de tumores es un mecanismo muy frecuente de silenciamiento génico en muchos tipos de cáncer (Figura 5B). Algunos ejemplos de supresores tumorales típicos que son inactivados por este mecanismo son el gen del retinoblastoma (RB), p16<sup>INK4a</sup>, MLH1, o BRCA1. La hipermetilación de islas CpG de promotores afecta a genes implicados en diferentes procesos celulares: regulación del ciclo celular, reparación del DNA, metabolismo de carcinógenos, interacciones célula-célula, apoptosis, etc, todos ellos implicados en el desarrollo tumoral (52, 57). Ver en la tabla 2 una lista de genes inactivados por hipermetilación, sus funciones y tipos de tumores donde aparecen.

TABLA 2. *Algunos genes silenciados en cáncer por hipermetilación del promotor [ver un catálogo más exhaustivo en Esteller 2007 (51)].*

<i>Gen</i>	<i>Función</i>	<i>Tipo de cáncer</i>
MLH1	Reparación del DNA	Colon, estómago, endometrio
BRCA1	Reparación del DNA, transcripción	Mama, ovario
p16 <sup>INK4a</sup>	Inhibidor de quinasas dependientes de ciclinas (regulación del ciclo celular)	Múltiples tipos
p14 <sup>ARF</sup>	Inhibidor de MDM2 (regulación de p53)	Colon, estómago, riñón
p15 <sup>INK4b</sup>	Inhibidor de quinasas dependientes de ciclinas (regulación del ciclo celular)	Leucemia
GSTP1	Conjugación al glutation	Próstata, mama, riñón
p73	Homólogo de p53	Linfoma
ER / PR	Receptores de estrógenos / de progesterona	Mama
AR	Receptor de andrógenos	Próstata
RASSF1A	Homólogo a efector de ras	Diversos tipos
RB	Inhibidor del ciclo celular	Retinoblastoma, múltiples tipos
APC	Inhibidor de beta-catenina	Tracto digestivo
RIZ1	Histona metil-transferasa	Mama, hígado, diversos tipos
DAPK	Proapoptótica	Linfoma, pulmón, colon



CTCF regula la transcripción de algunos de los genes cuyos promotores están anormalmente hipermetilados en tumores, tales como p14, p16, BRCA1, o RB (44). En el caso de RB, se ha observado que la pérdida de unión de CTCF a una isla CpG del promotor se correlaciona con la incorporación de proteínas de unión al DNA metilado y de componentes represores de la cromatina, induciéndose su silenciamiento epigenético (58). Se ha propuesto que CTCF protege de la hipermetilación aberrante del promotor de RB y, posiblemente, de otros genes supresores tumorales (48).

Los distintos tipos de cáncer presentan alteraciones epigenéticas específicas: inactivación de genes supresores tumorales como BRCA1 en cáncer de mama o p15<sup>INK4b</sup> en leucemia, translocaciones cromosómicas que afectan a modificadores de histonas como CBP o MLL1 en leucemia, pérdida de impronta génica del gen IGF2 en cáncer colorectal, etc (50). Se han definido perfiles específicos de hipermetilación de genes en distintos tumores o «metilomas» (51, 57). Estas firmas de metilación diferencial pueden servir para diferenciar entre tumores del mismo tipo (11, 41). Los patrones de metilación del DNA asociados con el desarrollo y progresión de tumores tienen un uso potencial en clínica. Hay marcadores de DNA hipermetilado que se están investigando como herramientas complementarias de diagnóstico, como factores pronóstico y predictores de la respuesta al tratamiento (50). Así, la detección de islas CpG hipermetiladas en fluidos biológicos y suero se pueden utilizar para el diagnóstico precoz en cáncer (ej. GSTP1 en orina de posibles pacientes de cáncer de páncreas) o para el posterior seguimiento (ej. metilación de p15 en leucemia mieloide aguda). La hipermetilación de genes específicos y los perfiles del metiloma global del DNA se pueden aplicar al pronóstico una vez detectado el tumor, y la hipermetilación de islas CpG, como predictor de la respuesta a quimioterapia y hormonoterapia (50).

## **Modificaciones de histonas y cáncer**

Los promotores silenciados por hipermetilación están generalmente asociados a otras modificaciones de histonas como son la hipoacetilación de residuos de lisina en histonas H3 y H4 y la hipermetilación de H3K9 o H3K27, que median la formación de una estructura de cromatina represiva (Figura 5B) (41). También son típicas en cáncer modificaciones globales de histonas como la pérdida de acetilación de lisina 16 y trimetilación de lisina 20 de la histona H4 (59). Algunas marcas de acetilación y metilación de histonas también puede tener valor pronóstico en ciertos tumores (60).



El silenciamiento de un típico gen supresor de tumores supone la unión de complejos represores transcripcionales al promotor hipermetilado, tales como DNA metil-transferasas (DNMT), proteínas de unión a DNA metilado (MBD), histona metil-transferasas para H3K9 e histona deacetilasas (HDAC) (52). Por otro lado, la expresión de oncogenes en cáncer requiere la actividad de proteínas coactivadoras de la transcripción como histona acetil-transferasas (HAT), histona metil-transferasas para H3K4 y complejos de remodelado de la cromatina como SWI/SNF (49). No es de extrañar que numerosos genes con funciones en la regulación epigenética se encuentren alterados en muchos tipos de cáncer (10). Algunos de estos genes se recogen en la tabla 3.

TABLA 3. *Algunos genes modificadores de la cromatina alterados en cáncer [ver una lista más detallada en (49, 51)].*

<i>Gen</i>	<i>Alteración</i>	<i>Tipo de cáncer</i>
MLH1	Reparación del DNA	Colon, estómago, endometrio
<b>DNA metil transferasas</b>		
DNMT1, DNMT3b	Sobreexpresión	Diversos tipos
<b>Proteínas de unión a metil-CpG</b>		
MeCP2, MBD1, MBD3	Sobreexpresión. Mutación (rara)	Diversos tipos
<b>Histona acetil transferasas</b>		
p300	Mutación	Colon, estómago, endometrio
CBP	Mutación, translocación, delección	Colon, estómago, endometrio, pulmón, leucemia
MOZ, MORF	Translocación	Neoplasias hematológicas
<b>Histona deacetilasas</b>		
HDAC1, HDAC2	Expresión desregulada	Diversos tipos
<b>Histona metil transferasas</b>		
MLL1	Translocación	Neoplasias hematológicas
MLL2	Amplificación génica	Glioma, páncreas
RIZ1	Hipermetilación islasCpG	Diversos tipos
<b>Factores de remodelado de la cromatina</b>		
MTA1, MTA3	Sobreexpresión	Mama, Neoplasias hematológicas
EMSY	Amplificación, sobreexpresión	Mama
HLTF (familia SWI/SNF)	Hipermetilación islasCpG	Diversos tipos
PASG/LSH (familia SWI/SNF)	Mutación	Neoplasias hematológicas

## Terapia epigenética del cáncer

En contraste con las alteraciones genéticas, el silenciamiento génico por modificaciones epigenéticas es potencialmente reversible (10). La metilación del DNA y las modificaciones de histonas son dianas atractivas para el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos, ya que el tratamiento con drogas que inhiben la metilación en citosina y la deacetilación de histonas pueden reestablecer la transcripción génica (52). Los inhibidores de histona deacetilasa (HDACi) tienen un enorme potencial como agentes anticancerosos (28, 29, 41, 54). Los HDACi inducen diferenciación celular, parada de ciclo celular y apoptosis, inhiben migración, invasión y angiogénesis en líneas tumorales y muestran actividad antitumoral en animales. Hay numerosos ensayos clínicos en curso con HDACi. Asimismo se están ensayando inhibidores de metilación del DNA (DNMTi) (61). HDACi y DNMTi muestran efectos sinérgicos en la activación transcripcional y existen ensayos clínicos que combinan ambos agentes epigenéticos (41, 61). Recientemente se ha aprobado el uso de estos inhibidores para el tratamiento de síndrome mielodisplásico y linfoma cutáneo de células T.

En conclusión, recientemente se está acumulando gran cantidad de conocimientos en relación con la regulación de la expresión por mecanismos epigenéticos y surgiendo numerosas dianas potenciales para tratamiento del cáncer. Existe el proyecto de caracterizar el epigenoma humano completo con objeto de catalogar los perfiles de las marcas epigenéticas de todo el genoma, en células normales y patológicas. Ello tendrá importantes implicaciones en el desarrollo de nuevos marcadores tumorales y el diseño de nuevas drogas para la terapia anticancerosa.

## Agradecimientos

Agradezco a Javier León y a Verónica Torrano por la lectura crítica del manuscrito. El trabajo en el laboratorio de la autora está financiado por el Fondo de Investigaciones Sanitarias, Instituto de Salud Carlos III.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Li, B., Carey, M., y Workman, J. L. (2007) The role of chromatin during transcription. *Cell* **128**, 707-719.
2. Delgado, M. D., y Leon, J. (2006) Gene expression regulation and cancer. *Clin Transl Oncol* **8**, 780-787.

3. Kornberg, R. D., y Lorch, Y. (1999) Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome. *Cell* **98**, 285-294.
4. Sarma, K., y Reinberg, D. (2005) Histone variants meet their match. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 139-149.
5. Kamakaka, R. T., y Biggins, S. (2005) Histone variants: deviants? *Genes Dev* **19**, 295-310.
6. Ray-Gallet, D., Gerard, A., Polo, S., y Almouzni, G. (2005) [Variations on the topic of the «histone code»]. *Med Sci (Paris)* **21**, 384-389.
7. Raisner, R. M., Hartley, P. D., Meneghini, M. D., Bao, M. Z., Liu, C. L., Schreiber, S. L., Rando, O. J., y Madhani, H. D. (2005) Histone variant H2A.Z marks the 5' ends of both active and inactive genes in euchromatin. *Cell* **123**, 233-248.
8. Raisner, R. M., y Madhani, H. D. (2006) Patterning chromatin: form and function for H2A.Z variant nucleosomes. *Curr Opin Genet Dev* **16**, 119-124.
9. Khorasanizadeh, S. (2004) The nucleosome: from genomic organization to genomic regulation. *Cell* **116**, 259-272.
10. Santos-Rosa, H., y Caldas, C. (2005) Chromatin modifier enzymes, the histone code and cancer. *Eur J Cancer* **41**, 2381-2402.
11. Bernstein, B. E., Meissner, A., y Lander, E. S. (2007) The mammalian epigenome. *Cell* **128**, 669-681.
12. Kouzarides, T. (2007) Chromatin modifications and their function. *Cell* **128**, 693-705.
13. Ruthenburg, A. J., Li, H., Patel, D. J., y Allis, C. D. (2007) Multivalent engagement of chromatin modifications by linked binding modules. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 983-994.
14. Taverna, S. D., Li, H., Ruthenburg, A. J., Allis, C. D., y Patel, D. J. (2007) How chromatin-binding modules interpret histone modifications: lessons from professional pocket pickers. *Nat Struct Mol Biol* **14**, 1025-1040.
15. Saha, A., Wittmeyer, J., y Cairns, B. R. (2006) Chromatin remodelling: the industrial revolution of DNA around histones. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 437-447.
16. Shilatifard, A. (2006) Chromatin modifications by methylation and ubiquitination: implications in the regulation of gene expression. *Annu Rev Biochem* **75**, 243-269.
17. Allis, C. D., Berger, S. L., Cote, J., Dent, S., Jenuwien, T., Kouzarides, T., Pillus, L., Reinberg, D., Shi, Y., Shiekhhattar, R., Shilatifard, A., Workman, J., y Zhang, Y. (2007) New nomenclature for chromatin-modifying enzymes. *Cell* **131**, 633-636.
18. Jenuwein, T., y Allis, C. D. (2001) Translating the histone code. *Science* **293**, 1074-1080.

19. Spivakov, M., y Fisher, A. G. (2007) Epigenetic signatures of stem-cell identity. *Nat Rev Genet* **8**, 263-271.
20. Shogren-Knaak, M., Ishii, H., Sun, J. M., Pazin, M. J., Davie, J. R., y Peterson, C. L. (2006) Histone H4-K16 acetylation controls chromatin structure and protein interactions. *Science* **311**, 844-847.
21. Shogren-Knaak, M., y Peterson, C. L. (2006) Switching on chromatin: mechanistic role of histone H4-K16 acetylation. *Cell Cycle* **5**, 1361-1365.
22. Gaszner, M., y Felsenfeld, G. (2006) Insulators: exploiting transcriptional and epigenetic mechanisms. *Nat Rev Genet* **7**, 703-713.
23. Wallace, J. A., y Felsenfeld, G. (2007) We gather together: insulators and genome organization. *Curr Opin Genet Dev* **17**, 400-407.
24. Bartkuhn, M., y Renkawitz, R. (2008) Long range chromatin interactions involved in gene regulation. *Biochim Biophys Acta* in press.
25. Rando, O. J. (2007) Chromatin structure in the genomics era. *Trends Genet* **23**, 67-73.
26. Yang, X. J., y Seto, E. (2008) Lysine acetylation: codified crosstalk with other posttranslational modifications. *Mol Cell* **31**, 449-461.
27. Brown, C. E., Lechner, T., Howe, L., y Workman, J. L. (2000) The many HATs of transcription coactivators. *Trends Biochem Sci* **25**, 15-19.
28. Glaser, K. B. (2007) HDAC inhibitors: clinical update and mechanism-based potential. *Biochem Pharmacol* **74**, 659-671.
29. Martinez-Iglesias, O., Ruiz-Llorente, L., Sanchez-Martinez, R., Garcia, L., Zambrano, A., y Aranda, A. (2008) Histone deacetylase inhibitors: mechanism of action and therapeutic use in cancer. *Clin Transl Oncol* **10**, 395-398.
30. Bannister, A. J., y Kouzarides, T. (2005) Reversing histone methylation. *Nature* **436**, 1103-1106.
31. Pray-Grant, M. G., Daniel, J. A., Schieltz, D., Yates, J. R., 3rd, y Grant, P. A. (2005) Chd1 chromodomain links histone H3 methylation with SAGA- and SLIK-dependent acetylation. *Nature* **433**, 434-438.
32. Santos-Rosa, H., Schneider, R., Bernstein, B. E., Karabetsov, N., Morillon, A., Weise, C., Schreiber, S. L., Mellor, J., y Kouzarides, T. (2003) Methylation of histone H3 K4 mediates association of the Isw1p ATPase with chromatin. *Mol Cell* **12**, 1325-1332.
33. Heintzman, N. D., Stuart, R. K., Hon, G., Fu, Y., Ching, C. W., Hawkins, R. D., Barrera, L. O., Van Calcar, S., Qu, C., Ching, K. A., Wang, W., Weng, Z., Green, R. D., Crawford, G. E., y Ren, B. (2007) Distinct and predictive chromatin signatures of transcriptional promoters and enhancers in the human genome. *Nat Genet* **39**, 311-318.

34. Barski, A., Cuddapah, S., Cui, K., Roh, T. Y., Schones, D. E., Wang, Z., Wei, G., Chepelev, I., y Zhao, K. (2007) High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell* **129**, 823-837.
35. Mellor, J. (2005) The dynamics of chromatin remodeling at promoters. *Mol Cell* **19**, 147-157.
36. Neely, K. E., y Workman, J. L. (2002) The complexity of chromatin remodeling and its links to cancer. *Biochim Biophys Acta* **1603**, 19-29.
37. Klochendler-Yeivin, A., Muchardt, C., y Yaniv, M. (2002) SWI/SNF chromatin remodeling and cancer. *Curr Opin Genet Dev* **12**, 73-79.
38. Gibbons, R. J. (2005) Histone modifying and chromatin remodelling enzymes in cancer and dysplastic syndromes. *Hum Mol Genet* **14**, 85-92.
39. Goll, M. G., y Bestor, T. H. (2005) Eukaryotic cytosine methyltransferases. *Annu Rev Biochem* **74**, 481-514.
40. Klose, R. J., y Bird, A. P. (2006) Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends Biochem Sci* **31**, 89-97.
41. Gal-Yam, E. N., Saito, Y., Egger, G., y Jones, P. A. (2008) Cancer epigenetics: modifications, screening, and therapy. *Annu Rev Med* **59**, 267-280.
42. Eckhardt, F., Lewin, J., Cortese, R., Rakyan, V. K., Attwood, J., Burger, M., Burton, J., Cox, T. V., Davies, R., Down, T. A., Haefliger, C., Horton, R., Howe, K., Jackson, D. K., Kunde, J., Koenig, C., Liddle, J., Niblett, D., Otto, T., Pettett, R., Seemann, S., Thompson, C., West, T., Rogers, J., Olek, A., Berlin, K., y Beck, S. (2006) DNA methylation profiling of human chromosomes 6, 20 and 22. *Nat Genet* **38**, 1378-1385.
43. Esteller, M. (2005) Aberrant DNA methylation as a cancer-inducing mechanism. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **45**, 629-656.
44. Klenova, E. M., Morse, H. C., 3rd, Ohlsson, R., y Lobanenkov, V. V. (2002) The novel BORIS + CTCF gene family is uniquely involved in the epigenetics of normal biology and cancer. *Semin Cancer Biol* **12**, 399-414.
45. Filippova, G. N. (2008) Genetics and epigenetics of the multifunctional protein CTCF. *Curr Top Dev Biol* **80**, 337-360.
46. Torrano, V., Chernukhin, I., Docquier, F., D'Arcy, V., Leon, J., Klenova, E., y Delgado, M. D. (2005) CTCF regulates growth and erythroid differentiation of human myeloid leukemia cells. *J Biol Chem* **280**, 28152-28161.
47. Torrano, V., Navascues, J., Docquier, F., Zhang, R., Burke, L. J., Chernukhin, I., Farrar, D., Leon, J., Berciano, M. T., Renkawitz, R., Klenova, E., Lafarga, M., y Delgado, M. D. (2006) Targeting of CTCF to the nucleolus inhibits nucleolar transcription through a poly(ADP-ribosylation)-dependent mechanism. *J Cell Sci* **119**, 1746-1759.

48. Recillas-Targa, F., De La Rosa-Velazquez, I. A., Soto-Reyes, E., y Benitez-Bribiesca, L. (2006) Epigenetic boundaries of tumour suppressor gene promoters: the CTCF connection and its role in carcinogenesis. *J Cell Mol Med* **10**, 554-568.
49. Esteller, M. (2006) Epigenetics provides a new generation of oncogenes and tumour-suppressor genes. *Br J Cancer* **94**, 179-183.
50. Esteller, M. (2008) Epigenetics in cancer. *N Engl J Med* **358**, 1148-1159.
51. Esteller, M. (2007) Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nat Rev Genet* **8**, 286-298.
52. Gronbaek, K., Hother, C., y Jones, P. A. (2007) Epigenetic changes in cancer. *Ap-  
mis* **115**, 1039-1059.
53. Jones, P. A., y Baylin, S. B. (2007) The epigenomics of cancer. *Cell* **128**, 683-692.
54. Minucci, S., y Pelicci, P. G. (2006) Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer. *Nat Rev Cancer* **6**, 38-51.
55. Feinberg, A. P., y Tycko, B. (2004) The history of cancer epigenetics. *Nat Rev Cancer* **4**, 143-153.
56. Weber, M., Davies, J. J., Wittig, D., Oakeley, E. J., Haase, M., Lam, W. L., y Schubeler, D. (2005) Chromosome-wide and promoter-specific analyses identify sites of differential DNA methylation in normal and transformed human cells. *Nat Genet* **37**, 853-862.
57. Esteller, M. (2007) Epigenetic gene silencing in cancer: the DNA hypermethylome. *Hum Mol Genet* **16 Spec No 1**, R50-59.
58. De La Rosa-Velazquez, I. A., Rincon-Arano, H., Benitez-Bribiesca, L., y Recillas-Targa, F. (2007) Epigenetic regulation of the human retinoblastoma tumor suppressor gene promoter by CTCF. *Cancer Res* **67**, 2577-2585.
59. Fraga, M. F., Ballestar, E., Villar-Garea, A., Boix-Chornet, M., Espada, J., Schotta, G., Bonaldi, T., Haydon, C., Roperio, S., Petrie, K., Iyer, N. G., Perez-Rosado, A., Calvo, E., Lopez, J. A., Cano, A., Calasanz, M. J., Colomer, D., Piris, M. A., Ahn, N., Imhof, A., Caldas, C., Jenuwein, T., y Esteller, M. (2005) Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. *Nat Genet* **37**, 391-400.
60. Seligson, D. B., Horvath, S., Shi, T., Yu, H., Tze, S., Grunstein, M., y Kurdستاني, S. K. (2005) Global histone modification patterns predict risk of prostate cancer recurrence. *Nature* **435**, 1262-1266.
61. Issa, J. P. (2007) DNA methylation as a therapeutic target in cancer. *Clin Cancer Res* **13**, 1634-1637.

# La vía de Hedgehog: embriogénesis y enfermedad

MARÍA ÁNGELES ROS LASIERRA

## RESUMEN

En este trabajo pretendemos dar una amplia visión de las funciones biológicas de las proteínas Hedgehog y de su participación en el complejo e intrincado sistema de señalización intercelular. Aunque la vía de señalización de Hedgehog (Hh) se descubrió y estudió primeramente debido al importante papel que desempeña durante el desarrollo embrionario, más recientemente se ha puesto de manifiesto su implicación en una gran variedad de tumores y en el mantenimiento de las células madre de algunos tejidos. Esto hace que el comprender y dominar en lo posible la señalización Hh sea de tremenda importancia para la salud humana.

## SUMMARY

Our goal is to present a wide view of the biological functions of Hedgehog proteins and their participation in the complex and intricate system of intercellular signaling. Hedgehog signaling cascade was first discovered and studied in the context of embryonic development where it plays an essential role. More recently, the involvement of Hedgehog (Hh) signaling in the development of a variety of tumors and in the homeostasis of adult tissues was also unraveled. Therefore, understanding and controlling Hh signaling is of tremendous importance for human health.

## INTRODUCCIÓN

Los mamíferos presentan tres genes de la familia Hedgehog que reciben el nombre de: *Sonic hedgehog* (*Shh*), *Indian hedgehog* (*Ihh*) y *Desert hedgehog*

(*Dhh*). Son homólogos del gen *Hedgehog* (*Hh*) de *Drosophila* (la mosca de la fruta) que fue el primer miembro de la familia en ser identificado (1). *Hh* debe su nombre al aspecto externo de la larva de la mosca mutante que, debido a la disposición de los dentículos, recuerda a un erizo. Aunque *Hh* se identificó en un screening mutagénico realizado en 1980, su clonación no ocurrió hasta 1992 (2, 3) siendo seguida rápidamente por la clonación de sus homólogos en vertebrados (4, 5, 6). *Hh* presenta una mayor homología con *Dhh*, mientras que *Shh* e *Ihh* están más próximos entre sí, lo que se supone ha sido el resultado de una duplicación génica más reciente (7).

La familia de proteínas Hh desempeña funciones esenciales principalmente durante el desarrollo embrionario, pero también en el mantenimiento y regulación de algunas células madre en el organismo adulto y en el desarrollo de muchos tumores humanos (8, 9, 10). Son moléculas de señalización intercelular que tienen la capacidad de señalizar a larga distancia (múltiples diámetros celulares) y de una manera dependiente de concentración (7).

Las proteínas Hh se sintetizan en forma de un precursor que requiere de un importante procesamiento post-traducional para generar el ligando activo. Este procesamiento incluye su digestión autocatalítica y una doble modificación lipídica. Aunque nuestros mayores conocimientos sobre la vía de señalización de Hh derivan de los estudios llevados a cabo en *Drosophila*, los componentes principales de los procesos de producción, secreción, difusión, recepción y transducción de la señal de estas proteínas están muy conservados evolutivamente (revisado en 7, 11, 12). Por ello y en aras de simplificar la descripción, en este trabajo usaremos el término Hh para referirnos a cualquier miembro de la familia en todos aquellos aspectos en los que no existan particularidades importantes entre ellos.

## SÍNTESIS, PROCESAMIENTO Y DIFUSIÓN DE HEDGEHOG

La proteína Hh se sintetiza como un precursor de 45 kD que sufre una hidrólisis intramolecular catalizada por su porción C-terminal lo que origina dos fragmentos peptídicos. El péptido C-terminal es de 25 kD y carece de actividad biológica siendo el fragmento N-terminal, de 19 kD, el que posee toda la actividad biológica conocida de Hh (Fig. 1). A este fragmento se le suele denominar HhN. Asociado a la hidrólisis del precursor, se produce la unión covalente de una molécula de colesterol al extremo C-terminal de HhN que pasa a denominarse HhNp (p de procesado; 13). La actividad colesterol-transferasa necesaria para este proceso reside en el extremo C-terminal del precursor. Además, el



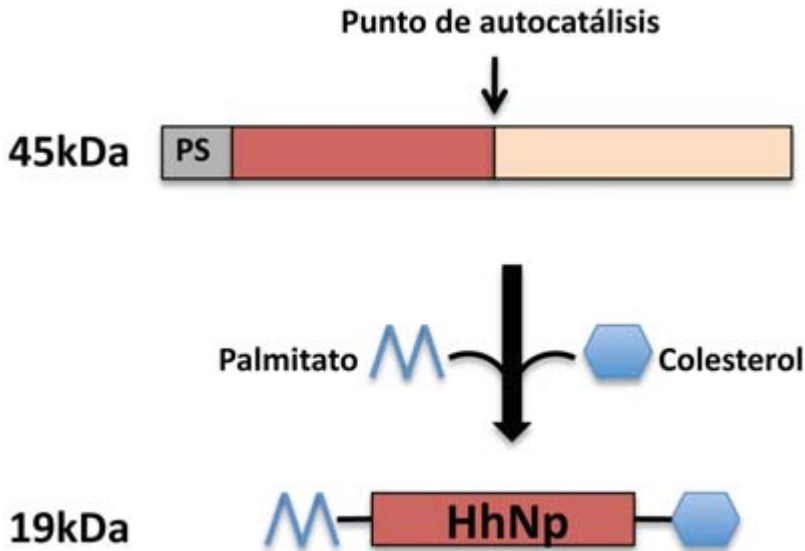


FIGURA 1. Esquema que muestra el procesamiento de las proteínas Hh. Primero se sintetiza un precursor de 45 kDa que sufre una autocatálisis dependiente del fragmento C-terminal para generar el péptido activo que es el fragmento N-terminal de 19 kDa al que se le añaden colesterol y ácido palmítico. Abreviaturas: PS, péptido señal.

fragmento HhNp adquiere otra molécula lipídica, el ácido palmítico, que se une covalentemente a su extremo N-terminal (Fig. 1) (14, 15, 16). Esta última reacción está catalizada por una enzima O-aciltransferasa codificada por el gen *Skinny hedgehog* (*Ski*) (Fig. 2). La adición de estos dos residuos lipídicos repercute enormemente en multitud de aspectos como la localización, secreción, difusión y actividad de las proteínas Hh.

Conviene resaltar que las proteínas Hh son las únicas que se modifican mediante enlace covalente con colesterol. La importancia del colesterol en la señalización por Hh se pone de manifiesto por el hecho de que algunos síndromes humanos con fenotipo de falta de función de *Shh* (holoprosencefalia, ver más adelante) son causados por mutaciones en los enzimas que sintetizan el colesterol (17, 18). Además, se sabía desde hace tiempo que la interferencia farmacológica con la síntesis del colesterol tenía efecto teratológico (19) siendo los fenotipos resultantes coincidentes con los de falta de función de *Shh*.

Hay suficiente evidencia de que en el tejido receptor Hh se localiza extracelularmente, tanto en *Drosophila* como en vertebrados (20, 21). Por ejemplo, en el esbozo temprano de extremidad de ratón, se ha podido detectar que la proteína Shh, difunde en un gradiente de aproximadamente 300 micras de exten-

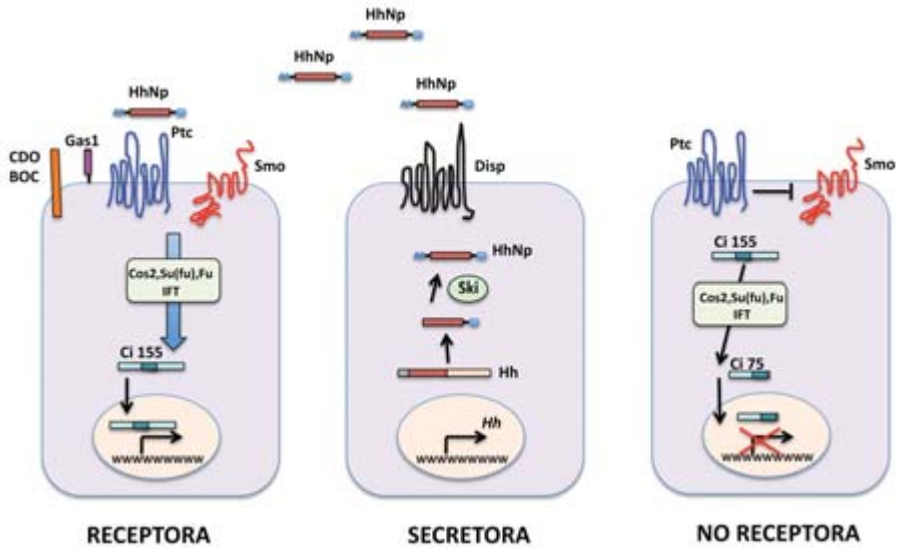


FIGURA 2. Esquema que muestra la señalización de Hh. La célula secretora (central) necesita de Disp para liberarlo al medio extracelular. En la célula receptora (izquierda) Hh se une con su receptor Ptc lo cual libera a Smo e impide el procesamiento proteolítico de Ci, el transductor transcripcional de Hh. La proteína completa Ci es un activador transcripcional que activa los genes diana. En ausencia de señalización (derecha) Ptc bloquea a Smo lo que permite la proteólisis de Ci y la generación de su forma truncada que es un fuerte represor transcripcional de las dianas de la vía.

sión desde las células productoras (21, 22). Sin embargo, la presencia de los dos residuos lipídicos debería suponer el anclaje de HhNp a la membrana plasmática. Efectivamente, diversos estudios han confirmado que tanto la adición del colesterol como la del ácido palmítico reduce la difusión de la molécula pero al mismo tiempo facilita la obtención de concentraciones más elevadas cerca de la fuente de síntesis (23). Se sabe también que, tanto en *Drosophila* como en mamíferos, la secreción de Hh necesita Dispatched (Disp; Dispatched 1 y Dispatched 2 en vertebrados). Disp es una proteína integral de membrana con doce dominios transmembrana que facilita la salida de Hh al espacio extracelular funcionando como un transportador específico de Hh (Fig. 2). Por lo menos en *Drosophila*, Disp es indispensable para que las células que expresan Hh puedan liberarlo al medio extracelular (12).

Las modificaciones lipídicas de las proteínas Hh y su modo de señalización a larga distancia y de una manera dependiente de concentración (ver más adelante), implica la existencia de mecanismos activos que faciliten y controlen su

difusión. Aunque estos mecanismos no son completamente conocidos, se sabe que en el movimiento de HhNp en el medio extracelular participan macromoléculas de la matriz extracelular como por ejemplo el heparan sulfato proteoglicano. En *Drosophila*, la difusión de Hh necesita de *tout-velu* una glicosaminoglicano-transferasa cuyos homólogos en vertebrados son miembros de la familia de glicosaminoglicano-transferasas Exostosins (EXT). En humanos, mutaciones en los genes *EXT1* y *EXT2* son la causa de la exostosis múltiple hereditaria, una enfermedad asociada con el crecimiento en exceso del hueso (24) y que parece estar causada por alteraciones en el transporte de Ihh (25).

Otros factores que podrían facilitar la difusión de HhNp son la formación de complejos multiméricos y la asociación con lipoproteínas. Se ha sugerido que las moléculas de HhNp podrían formar complejos multiméricos en los que los residuos hidrofóbicos se dispondrían en el interior formando especies de micelas. La formación de estos complejos, para lo que las moléculas de Hh tienen que tener las dos modificaciones lipídicas, facilitaría la solubilidad y difusión de Hh en el medio acuoso extracelular (26, 27, 28). Además, estudios recientes en *Drosophila* indican que las lipoproteínas también participan en el transporte de HhNp a largas distancias (29, 30, 31).

## RECEPCIÓN Y TRANSDUCCIÓN DE LA SEÑAL

La señalización por Hh se ha caracterizado en varios procesos de desarrollo y aunque se conocen algunas particularidades propias de tejido o de especie, en general es un proceso muy conservado.

El receptor de Hh en *Drosophila* es Patched (Ptc) del que hay dos homólogos en vertebrados Ptc1 y Ptc2 siendo Ptc1 el que presenta una expresión y función similar a Ptc (32, 33, 34). Ptc es una proteína integral de membrana con doce dominios transmembrana (Fig. 2). El primer paso en el proceso de señalización por Hh es su unión física con Ptc lo que, además de activar la vía, causa la internalización por endocitosis del complejo Hh-Ptc y su posterior degradación lisosomal (35, 36). La internalización de Hh mediada por Ptc es fundamental para eliminar el morfógeno del medio extracelular y contribuye notablemente al establecimiento y mantenimiento del gradiente de concentración (ver más adelante). La regulación de este gradiente es de gran importancia ya que se admite que la diferenciación de las células depende de su posición dentro del gradiente. Recientemente se ha demostrado que en *Drosophila* Ptc actúa también como un receptor de lipoproteínas (31).

En vertebrados se han identificado reguladores tanto positivos como negativos de la señalización por Shh. Un modulador negativo de la señal es Hip (Hedgehog interacting protein; 37) que se une a las tres proteínas Hh con la misma afinidad que Ptc y contribuye también a atenuar la señal secuestrando a Hh en la superficie celular, aunque no induce su internalización como hace Ptc. Es importante señalar que tanto *Ptc* como *Hip* son dianas de Hh de manera que es el propio Hh el que modula su concentración en el medio al controlar la producción de sus moduladores negativos. Un modulador positivo de la señal es *Gas1* (*growth-arrest specific gene*), una proteína de superficie con anclaje glicosilfosfatidilinositol, que se supone actúa aumentando la afinidad de Hh por Ptc (38). Finalmente, Megalin, que es un miembro de la familia de receptores lipoproteicos de baja densidad (39) también se une a Hh con alta afinidad y participa, de una manera desconocida por el momento, en su internalización y señalización.

En *Drosophila ihog* (interferente hedgehog) y *boi* (brother of *ihog*) son glicoproteínas de membrana que funcionan como moduladores positivos de la señalización ya que se unen y secuestran a Hh aumentando su señalización localmente (40). Sus homólogos en vertebrados, llamados respectivamente *cdo* y *boc*, han sido identificados recientemente y parecen conservar la misma función (41, 42).

El sistema de transducción de la señal de Hh implica a Smoothened (Smo), una proteína con siete dominios transmembrana emparentada con la familia de los receptores Frizzled de Wnt (Fig. 2). En mamíferos solo hay un gen *Smo* (43). En ausencia de Hh, Ptc reprime la actividad de Smo por un mecanismo todavía no completamente conocido pero que no implica unión física. La unión de Hh a Ptc inicia su internalización y libera a Smo que a partir de vesículas intracelulares se desplaza y acumula en la superficie celular donde se transloca a los cilios e inicia la cascada de señalización.

Ptc y Smo actúan mediante una cascada de transducción de la señal que culmina con la modulación de la actividad de los factores de transcripción Ci/Gli. En *Drosophila*, la transducción de la señal a partir de Smo, aunque no es completamente conocida, se sabe que implica a un complejo de proteínas de unión a microtúbulos que incluyen Fused (*fu*), Suppressor of Fused [*Su(fu)*], costal2 (*Cos2*), protein kinase A (PKA) y *slimb*. Este complejo retiene a Cubitus interruptus (Ci; 7, 44, 45) que es el mediador transcripcional de la señalización por Hh en *Drosophila* (Fig. 2).

En ausencia de Hh, Ptc reprime la actividad de Smo lo que se traduce en la fosforilación de Ci (Fig. 2) (46) y su subsecuente procesamiento proteolítico originando una forma corta de 75kD, que corresponde con su extremo N-terminal

y que se transloca al núcleo donde reprime la transcripción de los genes diana de Hh. La unión de Hh a Ptc libera a Smo (Fig. 2) lo que resulta en la inhibición de la proteólisis de Ci. La proteína completa Ci (155kD) se transloca al núcleo donde actúa como un activador transcripcional de los genes diana de Hh.

Los homólogos de Ci en vertebrados son los genes Gli, de los que se han identificado tres: *Gli1*, *Gli2* y *Gli3*. Las proteínas Gli son factores de transcripción multifuncionales que pueden actuar como activadores o represores de la transcripción. Estudios genéticos y bioquímicos indican que Gli1 funciona como un activador transcripcional de los genes diana de Shh mientras que Gli2 y Gli3 pueden actuar como activadores o represores según el contexto. Gli2 y Gli3 son los mediadores primarios de la vía de *Shh* mientras que Gli1, cuya expresión es transcripcionalmente regulada por Gli2 y Gli3, actúa secundariamente para potenciar dicha vía (47).

Se ha demostrado que Gli3 y también Gli2 pero no Gli1, sufren un procesamiento proteolítico similar al señalado anteriormente para Ci (48, 49, 50). La presencia de Shh evita el procesamiento de la proteína Gli3 de 190kD a una forma corta de 83 kD que corresponde con el extremo N-terminal y que es un potente represor transcripcional. Por lo tanto, dentro de los dominios de expresión de *Gli3*, los mayores niveles de la forma represora corresponden con los niveles más bajos de Shh. Es interesante notar que las diferentes funciones reguladoras de Ci en *Drosophila* se reparten en mamíferos entre las tres proteínas Gli.

Recientemente, un estudio mutagénico en ratón permitió identificar que mutaciones de los genes homólogos de las proteínas de transporte intraflagelar (IFT, de su nombre en inglés Intraflagellar Transport) (51) presentaban fenotipos característicos de pérdida de función de *Shh* (52). Estudios subsecuentes pudieron demostrar que las proteínas IFT juegan un papel importante en la vía de Shh downstream de Ptc y Smo pero upstream de Gli y que en su ausencia tanto las actividades represoras como activadoras de Gli3 se hallan afectadas (53, 54, 55). Estos estudios sugieren que los cilios son organelas celulares esenciales para la transducción de la señalización de Shh y, en este sentido, conviene destacar que varios componentes de la vía de señalización se localizan en los cilios incluyendo Smo y las tres proteínas Gli (53, 56, 57).

En resumen, la activación de la vía de Hh conduce a la producción de factores de transcripción activadores pero también inhibe la formación de factores de transcripción represores. Es la proporción entre las formas activadoras y represoras de Ci/Gli en el núcleo, lo que se ha dado en llamar el código Gli (47), lo que controla la expresión de los genes dianas de Shh mediante una combinación de activación y derepresión.

Las dianas reguladas por la vía de Hh varían según especie y tipo celular y sólo se conocen parcialmente. Algunas de las dianas mejor establecidas y más universales son componentes importantes de la misma vía de señalización como *Ptc*, *Hip* y *Gli1*. La expresión de estos genes, particularmente de *Gli1* y *Ptc* se utiliza como marcador de células que están activamente transduciendo la señal de Hh.

El hecho de que la función de los factores de transcripción Ci/Gli sea específico de tejido, estadio y especie puede depender de su capacidad de formar complejos entre ellos y con otros factores de transcripción que modifican su actividad (47). En este sentido debe mencionarse que se sabe que las proteínas Gli interactúan físicamente con las proteínas *Zic1* y *Zic 2* y con los productos de los genes *Hoxd*. Como dianas del código Gli relativamente generalizadas se pueden citar *Ciclina D1*, *N-myc*, *Bcl2*, *Bmi* y *Snail* (47).

## HH EN EL DESARROLLO EMBRIONARIO

La vía de señalización de Hh es esencial en embriogénesis ya que está implicada en el desarrollo de múltiples órganos donde controla aspectos tan importantes como la especificación de los distintos tipos celulares, la proliferación o la supervivencia celular.

El desarrollo de muchos órganos depende de las interacciones intercelulares que se establecen entre sus componentes. Los estudios clásicos de embriología experimental llevados a cabo a mediados del pasado siglo proporcionaron mucha información acerca de la localización y modo de acción de los centros señalizadores y de las interacciones celulares más importantes en el desarrollo de los vertebrados. Estos estudios permitieron la rápida interpretación e integración de los estudios moleculares posteriores. Una observación sorprendente fue la constatación de que son unas pocas vías de señalización las que se usan de manera repetitiva en diferentes momentos y lugares del desarrollo y además que estas señales están evolutivamente muy conservadas. Sin embargo, es importante destacar que el resultado de una misma vía de señalización no es siempre el mismo sino que depende del contexto en el que se esté utilizando y del estado de las células (historia celular) que reciben esta señalización.

La vía de Hh es una de las vías de señalización más importantes durante el desarrollo embrionario. Cuando se clonaron los homólogos de Hh en vertebrados (4, 5, 6) llamó poderosamente la atención el hecho de que los dominios de expresión de uno de sus miembros, *Shh*, coincidían exactamente con la localización de algunos de los centros de señalización mejor caracterizados del

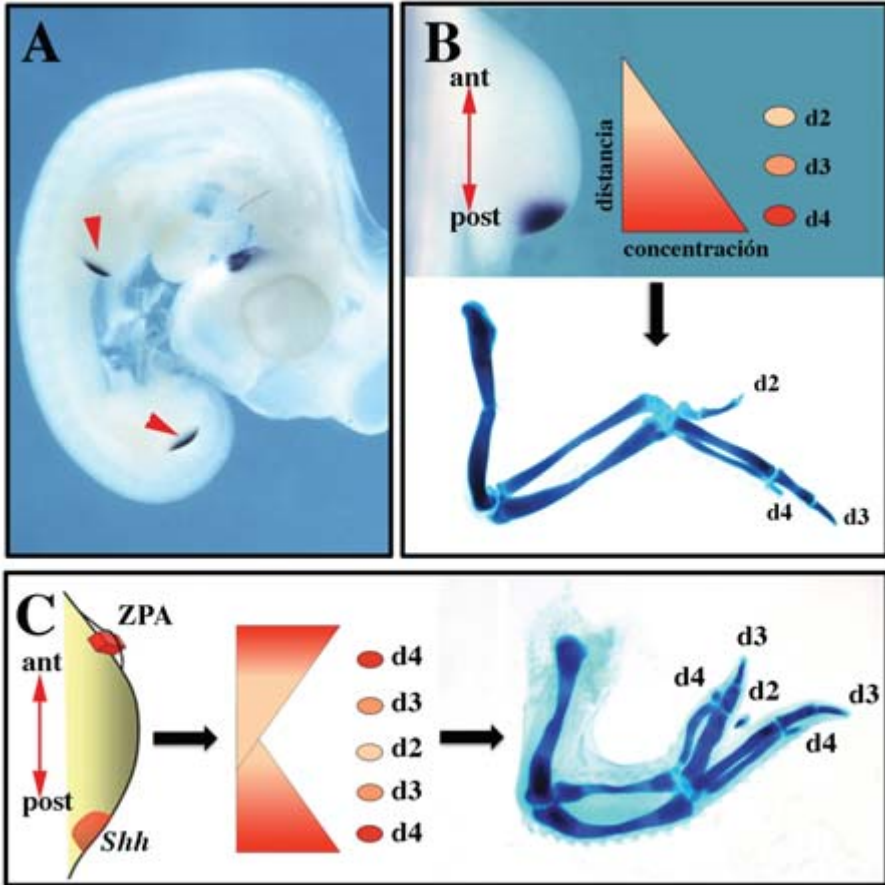


FIGURA 3. (A) Patrón de expresión de Shh en un embrión de pollo de aproximadamente 4 días de incubación. La expresión de Shh en la ZPA del ala y pata está indicada por cabezas de flecha. (B) La expresión normal de Shh en la ZPA de un ala de embrión de pollo se acompaña del esquema del modelo de su difusión en gradiente a lo largo del eje antero-posterior y del patrón esquelético normal del ala de pollo. El ala de los pájaros presenta solamente 3 dedos que se consideran dedo 2 (d2), 3 (d3) y 4 (d4). El tipo de dedo que se forma depende del nivel de morfógeno al que hayan estado sometidas sus células precursoras durante el desarrollo. (C) Cuando por causas naturales o experimentales surge otra fuente de Shh a nivel anterior, en el esbozo de extremidad se generan dos gradientes que, dependiendo de su geometría, pueden llegar a superponerse en la zona central de la extremidad como está representado en el esquema. Esta configuración da lugar a duplicaciones especulares de los dedos como el caso que se muestra (d4-d3-d2-d3-d4).

desarrollo como la notocorda y la zona de actividad polarizadora de la extremidad (Fig. 3). Esto sugeriría que Shh podría ser la molécula responsable de las funciones de estos centros señalizadores y cuya identificación había sido objeto del estudio de los embriólogos durante mucho tiempo (9).



Uno de los modelos más usados para explicar la formación de patrón durante el desarrollo de los órganos es el del gradiente de morfógeno (literalmente molécula generadora de forma; 58). El morfógeno es una molécula que emanando de su fuente productora, los llamados centros señalizadores, es capaz de difundir y establecer un gradiente de concentración a través de un campo morfogenético (agrupación de los precursores de un órgano). El modelo propone que la concentración del morfógeno proporciona a las células un *valor posicional* acorde con su situación en el gradiente. El valor posicional determina el destino celular de manera que la generación de un patrón o morfología apropiado depende del establecimiento de un gradiente correcto del morfógeno. Puede considerarse que el gradiente del morfógeno prefigura el patrón final del órgano o tejido. En varios sistemas de desarrollo, como el desarrollo de la extremidad y del sistema nervioso central, se considera que las proteínas Hh actúan como morfógenos (7, 9, 59). A continuación vamos a considerar brevemente estos dos sistemas sin dejar de resaltar que la señalización por Shh interviene también de manera relevante en el desarrollo de multitud de otros órganos entre los que se encuentra el corazón, los vasos sanguíneos, las gónadas, el intestino y el riñón. En *Drosophila*, además del papel de la señalización de Hh en la segmentación del embrión, que fue la causa de su descubrimiento, también interviene en la morfogénesis de los discos imaginales de ala, pata, ojo y disco genital. Durante el desarrollo las proteínas Hh son también importantes mitógenos y factores de supervivencia celular.

### **Hh y el desarrollo de la extremidad**

En el desarrollo de las extremidades Shh juega un papel fundamental controlando el número y la identidad de los dedos. La parte distal de las extremidades de los amniotas se caracteriza por la presencia de los dedos que son elementos esenciales para su función. Los dedos pueden considerarse como estructuras en serie a lo largo del eje antero-posterior (pulgares-meñiques) de la mano aunque cada uno de ellos presenta una clara identidad (Fig. 3). Los modelos actuales proponen que Shh es el responsable de la polaridad anteroposterior de la extremidad, es decir, de la diferente morfología de los dedos.

La primera información sobre cómo se generaba la asimetría anteroposterior de la extremidad la proporcionó el descubrimiento de la zona de actividad polarizadora (ZPA), un pequeño agrupamiento de células mesodérmicas situado en el borde posterior de la extremidad en desarrollo (Fig. 3). Esta región fue identificada y definida gracias a las asombrosas duplicaciones especulares de



los dedos que causaba cuando se transplantaba al borde anterior de otra extremidad (Fig. 3). Estos y otros muchos experimentos demostraron que la ZPA era la responsable del patrón anteroposterior de la extremidad (9). Se interpretó que las células de la ZPA producían un morfógeno capaz de difundir y establecer un gradiente de concentración en el eje antero-posterior de la extremidad (58). Niveles altos del morfógeno darían lugar a dedos con identidad posterior (meñique) mientras que niveles bajos producirían dedos con identidad anterior (índice) siendo el parámetro más relevante en este modelo la concentración del morfógeno (Fig. 3). El descubrimiento de que *Shh* era la molécula secretada por las células de la ZPA centró la atención en ella como el presunto morfógeno responsable de las capacidades organizativas de largo alcance mostradas por la ZPA lo que no tardó en demostrarse (6, 60, 61). Recientemente los resultados de multitud de experimentos modificando tanto genética como farmacológicamente la duración y concentración del gradiente de *Shh* en la extremidad, han propiciado la revisión del modelo principalmente para enfatizar el papel de *Shh* como mitógeno controlando el número de células precursoras de los dedos, además de la especificación antero-posterior (62).

## **Hh y el desarrollo del Sistema Nervioso Central**

Durante el desarrollo del sistema nervioso central, *Shh* se expresa en la placa precordal, en la notocorda y en la placa del suelo donde juega un papel fundamental en la especificación de los distintos tipos celulares ventrales. Su función ha sido profundamente estudiada en la médula espinal utilizando embriones de pollo y de ratón (63). En el tubo neural, que es el precursor de la médula espinal, las diferentes poblaciones de precursores neuronales se especifican según su posición y cada población viene definida por la expresión de una combinación específica de reguladores transcripcionales. Por ejemplo, los precursores de las motoneuronas se sitúan en una posición muy ventral y se caracterizan por la expresión de una combinación específica de factores de transcripción (*Islet1*, *Islet2* y *HB9*) (63, 64, 65).

Se ha podido constatar que *Shh*, secretado por las células de la notocorda y de la placa del suelo, difunde y establece un gradiente de concentración a través del eje dorso ventral del tubo neural con niveles máximos a nivel ventral (64, 65). La función de este gradiente de *Shh* es especificar de una manera directa y dependiente de concentración los distintos tipos celulares de la región ventral del tubo neural del embrión y de esta manera conformar un patrón dorsoventral adecuado de diferenciación celular. Se sabe que estos efectos están fi-

nalmente mediados por la actividad combinada de los tres factores de transcripción Gli (66) lo que conduce a la activación o represión de determinados factores de transcripción en los progenitores ventrales del tubo neural que son los que al fin y al cabo dirigen la diferenciación celular.

Como en el caso de la extremidad, en el tubo neural Shh no sólo controla la especificación sino que regula también la proliferación y supervivencia celular a través de la regulación del ciclo celular y de la expresión de genes antiapoptóticos (67, 68). Además, el crecimiento del neocórtex, cerebelo y tectum dependen también de la actividad mitogénica de Shh. Recientemente se le ha atribuido un papel en la guía axonal (69, 70) y en el mantenimiento de nichos de células madre en el adulto (8, 71).

## **FENOTIPOS HUMANOS RELACIONADOS CON LA PÉRDIDA DE FUNCIÓN DE SHH**

Como corresponde a las importantes funciones de los genes Hh durante el desarrollo, sus mutaciones, o bien mutaciones en genes implicados en regular o mediar su actividad, producen importantes malformaciones todas ellas reflejadas en la patología humanas (revisado en 9, 72).

En humanos la haploinsuficiencia de *Shh* produce holoprosencefalia (OMIM 142945; 18, 73, 74, 75). Se trata de una malformación severa consecuencia de la división defectuosa del prosencéfalo en los dos hemisferios cerebrales. Se presenta con muy diferentes grados de severidad nerviosa que se asocian con alteraciones proporcionales del cráneo y cara. Los casos más severos son incompatibles con la vida y se parecen mucho al fenotipo del ratón mutante para *Shh* que se caracteriza por un cerebro unilobulado, ciclopia y proboscide (Fig. 4; 16).

Además, el ratón mutante de *Shh* presenta múltiples defectos en la línea media como corresponde con el alto nivel de expresión de *Shh* a este nivel (16). Estos defectos incluyen degeneración de la notocorda, falta de formación de la placa del suelo y alteraciones en la simetría izquierda-derecha con isomerismo pulmonar izquierdo (76, 77).

La extremidad que se forma en ausencia de *Shh* presenta graves déficits a partir del codo/rodilla con graves alteraciones del zeugopodio (antebrazo/pierna) y formación de un único dedo, caracterizado como dedo 1, en la extremidad inferior (Fig. 4). Este hecho hace que el dedo 1 (pulgar/dedo gordo) se considere que no requiere Shh para su formación (Fig. 4).

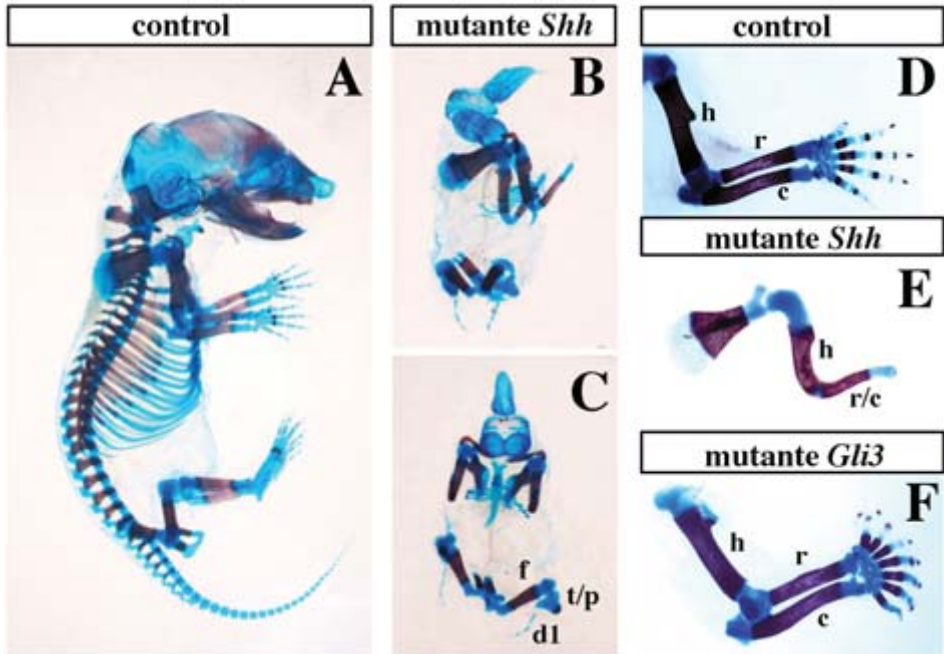


FIGURA 4. (A) Patrón esquelético de un feto de ratón casi a término. (B) y (C) muestra el patrón esquelético de un feto de la misma camada mutante para *Shh* en una visión lateral (B) y anterior (C). Nótese las graves alteraciones de la cabeza con probóscide y de las extremidades, entre otras. (D) Patrón esquelético de la extremidad anterior de ratón para comparación con la extremidad del mutante de *Shh* (E) que carece de dedos y con la del mutante de *Gli3* que presenta polidactilia (F). Abreviaturas: h: húmero; r: radio; c: cúbito; f: fémur; t/p: tibia/peroné.

Como hemos indicado, *Shh* previene la formación de la forma represora corta de *Gli3* y por tanto el gradiente extracelular de *Shh* se convierte en un gradiente intracelular inverso de *Gli3* que es lo que realmente controla la formación de patrón de una manera que todavía no es completamente conocida. En humanos mutaciones del gen *Gli3* son responsables de varios síndromes autosómicos dominantes que asocian polidactilia (exceso en el número de dedos) con distintos fenotipos y son un claro reflejo de la complejidad de este factor de transcripción (78). La cefalopolisindactilia de Greig (OMIM 175700; 79, 80, 81) incluye polidactilia preaxial, sindactilia y dedos anormalmente anchos además de otras anomalías como hipertelorismo. El síndrome de Pallister-Hall (OMIM 146510; 82) cursa con polidactilia postaxial o central y sindactilia así como hamartoma hipotalámico, ano no perforado y ocasionalmente holoprosencefalia. Estas mutaciones causan truncamiento de la proteína que podría actuar como la forma represora de *Gli3* (83). La polidactilia es una de las malformaciones más

frecuentes en humanos y en su etiología muchas veces está implicada la activación anómala de *Shh* en el borde anterior de la extremidad (84).

Además de *Shh*, los otros dos genes de la familia también desempeñan funciones importantes en el desarrollo aunque mucho más localizadas. *Ihh* es fundamental en el proceso de osificación endocondral ya que participa en la diferenciación del cartílago (85, 86). En humanos, mutaciones en *Ihh* se han identificado como responsables de la braquidactilia tipo A-1, caracterizada por un acortamiento de los huesos largos y acortamiento o ausencia de las falanges medias (87).

*Dhh* está implicado en la proliferación de las células germinales y en las interacciones de las células de Schwann con las células nerviosas. *Dhh* induce la diferenciación de las células de Sertoli durante el desarrollo testicular y juega un papel esencial en la regulación del desarrollo de las células de la línea germinal (88, 89).

## **SHH Y LAS CÉLULAS MADRE EN EL ORGANISMO ADULTO**

*Shh* es activo en algunos grupos de células en órganos maduros donde parece participar en el mantenimiento del número de células madre. Esto ha sido estudiado principalmente en el sistema nervioso central. En el telencéfalo de los mamíferos se conocen dos áreas de neurogénesis postnatal que son el giro dentado del hipocampo y la zona subventricular de los ventrículos telencefálicos (90). Experimentos de ganancia y pérdida de función en ratón han resaltado la importancia de la señalización de *Shh* en el comportamiento de las células madre de estos nichos (71, 91). Las células quiescentes expresan bajos niveles de *Gli1*, marcador de las células que están respondiendo a *Shh*, pero la vía *Shh/Gli* se activa para regular la generación de nuevas neuronas. La cascada de señalización de *Shh* está también implicada en el mantenimiento de otros tipos de células madre adultas como las hematopoyéticas (92). Este campo de estudio se encuentra actualmente bajo intensa investigación ya que surge la posibilidad de que la manipulación experimental del código *Gli* permita controlar el número de células madre adultas (47).

## **SHH Y CARCINOGENÉISIS**

La señalización por *Hh* se ha implicado en el desarrollo de varios cánceres humanos incluyendo el carcinoma pulmonar de células pequeñas, los meduloblastomas, los carcinomas basocelulares y los tumores del tracto digestivo.

Como hemos explicado, en ausencia de Shh, Ptc inhibe la vía de señalización por lo que la pérdida de su actividad causa activación de la vía de Shh, independiente de la presencia del ligando. De acuerdo con ello, individuos con un alelo defectuoso de *Ptc1* presentan el síndrome de Gorlin que cursa con polidactilia preaxial, metacarpianos cortos y anomalías dentales (OMIM 109400; 93, 94, 95). Además, los pacientes con síndrome de Gorlin presentan una alta predisposición a ciertas formas de cáncer como carcinomas múltiples de células basales, meduloblastomas, fibromas ováricos y menos frecuentemente rhabdomyosarcomas, meningiomas, fibrosarcomas y fibromas cardíacos (93, 96). El carcinoma de células basales es una de las formas más comunes de cáncer humano, representando un tercio de todos los tumores diagnosticados (97). En este sentido Ptc se ha considerado como un gen supresor de tumores. Mutaciones en otros componentes de la vía como por ejemplo mutaciones de Smo que conlleven ganancia de función también se han encontrado en el carcinoma de células basales (98).

Una señalización aberrante de Hh se asocia también con una variedad de tumores del tracto gastrointestinal. La mayoría de los adenocarcinomas ductales de páncreas presentan activación de la vía de Shh y actualmente se piensa que este hecho constituye un factor esencial en los estadios tempranos del desarrollo del cáncer de páncreas (47, 99, 100, 101).

Además, un gran número de tumores, incluyendo todos los tumores cerebrales, de próstata y de piel, requieren de la vía de Hh para su progresión (47). Independientemente de las mutaciones en oncogenes y supresores de tumores específicos de cada tipo de tumor, esta observación sugiere que todos los factores oncogénicos pueden converger en la actividad Gli para promover la progresión tumoral (103) y coloca a la cascada de señalización de Hh en el foco de atención de un posible tratamiento para muchos tipos diferentes de cáncer (47, 102). Efectivamente, la vía de Hh puede ser manipulada mediante diversos compuestos químicos. Uno de los más importantes es un alcaloide esteroideo natural llamado ciclopamina al que debe su toxicidad la planta *Veratrum californicum*. La ciclopamina causa fetos cíclopes y holoprosencefálicos en el ganado que ha consumido dichas plantas y su efecto se debe a que bloquea la función de Smo. Se ha demostrado que el tratamiento con ciclopamina puede inhibir el crecimiento y supervivencia tumoral en líneas celulares y cultivos primarios (102, 104). Smo aparece pues como una diana atractiva para el tratamiento antitumoral puesto que regula muy eficientemente el código Gli y en este sentido se está trabajando activamente en el desarrollo de pequeñas moléculas antagonistas de su función que presenten buenas características farmacocinéticas.

## AGRADECIMIENTOS

Mi agradecimiento a todas las personas que en algún momento han formado parte de mi equipo, por su inestimable colaboración. Financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación (BFU2005-09309-CO2-01).

## ABREVIATURAS

Boi, brother of ihog; Ci, Cubitus interruptus; Dhh, Desert Hedgehog; Gas, Growth arrest; Hh, Hedgehog; HhNp, Forma activa de Hh; Ihh, Indian hedgehog; Ihog, interferente hedgehog; Ptc, Patched; Shh, Sonic hedgehog; Ski, Skinny hedgehog; Smo, Smoothened; ZPA, Zona de actividad polarizadora.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Nusslein-Volhard C, Wieschaus E (1980) Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* **287**, 795-801.
2. Lee JJ, Kessler DP, Parks S, Beachy PA (1992) Secretion and localized transcription suggest a role in positional signaling for products of the segmentation gene hedgehog *Cell* **71**, 33-50.
3. Tabata T, Eaton S, Kronberg TB (1992) The *Drosophila hedgehog* gene is expressed specifically in posterior compartment cells and is a target of engrailed regulation. *Genes Dev.* **6**, 2635-2645.
4. Echelard Y, Epstein DJ, St-Jaques B, Shen L, Moler J, Mc Mahon JA y Mc Mahon AP (1993) Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity. *Cell* **75**,1417-1423.
5. Krauss S, Concordet JP, Ingham PW (1993) A functionally conserved homolog of the *Drosophila* segment polarity gene hh is expressed in tissues with polarizing activity in zebrafish embryos. *Cell* **31**,1431-1444.
6. Riddle RD, Johnson RL, Laufer E y Tabin C (1993) Sonic hedgehog mediates the polarizing activity of the ZPA. *Cell* **75**,1401-1416.
7. Ingham PW y Mc Mahon AP (2001) Hedgehog signaling in animal development: Paradigms and principles. *Genes Dev* **15**, 3059-3087.
8. Lai K, Kaspar BK, Gage FH, Schaffer DV (2003) Sonic hedgehog regulates adult neural progenitor proliferation in vitro and in vivo. *Nat Neurosci* **6**,21-27.
9. Mc Mahon AP, Ingham PW, Tabin CJ (2003) Developmental roles and clinical significance of hedgehog signaling. *Curr Top Dev Biol* **53**, 1-114.
10. Palma V y Ruiz i Altaba A (2004) Hedgehog-GLI signaling regulates the behavior of cells with stem cell properties in the developing neocortex. *Development* **131**,337-45.

11. Hopper JE y Scott MP (2005) Communicating with Hedgehogs. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 306-317.
12. Torroja C, Gorfinkiel N, Guerrero I (2005) Mechanisms of Hedgehog gradient formation and interpretation. *J Neurobiol* **64**,334-356.
13. Porter JA, Young KE, Beachy PA (1996) Cholesterol modification of hedgehog signaling proteins in animal development. *Science* **274**, 255-259.
14. Pepinsky RB, Zeng C, Wen D, Rayhorn P, Baker DP, Williams KP, Bixler SA, Ambrose CM, Garber EA, Miatkowski K, Taylor FR, Wang EA, Galdes A (1998) Identification of a palmitic acid-modified form of human Sonic hedgehog. *J Biol Chem* **273**,14037-14045.
15. Taylor FR, Wen D, Garber EA, Carmillo AN, Baker DP, Arduini RM, Williams KP, Weinreb PH, Rayhorn P, Hronowski X, Whitty A, Day ES, Boriack-Sjodin A, Shapiro RI, Galdes A, Pepinsky RB (2001) Enhanced potency of human Sonic hedgehog by hydrophobic modification. *Biochemistry* **40**,4359-4371.
16. Chiang C, Litingtung Y, Lee E, Young K E, Corden J L, Westphal H y Beachy P A (1996) Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function. *Nature* **383**, 407-413.
17. Kelley RL, Roessler E, Hennekam RC, Feldman GL, Kosaki K, Jones MC, Palumbos JC, Muenke M (1996) Holoprosencephaly in RSH/Smith-Lemli-Opitz syndrome: does abnormal cholesterol metabolism affect the function of Sonic Hedgehog? *Am J Med Genet* **66**, 478-484.
18. Roessler E, Belloni E, Gaudenz K, Jay P, Berta P, Scherer SW, Tsui LC, Muenke M (1996) Mutations in the human Sonic Hedgehog gene cause holoprosencephaly. *Nat Genet* **14**,357-360.
19. Roux C, Aubry M (1996) Teratogenic action in the rat of an inhibitor of cholesterol synthesis, AY 9944 *C R Seances Soc Biol Fil.* **160**,1353-1357.
20. Torroja C, Gorfinkiel N, Guerrero I (2004) Patched controls the Hedgehog gradient by endocytosis in a dynamin-dependent manner, but this internalization does not play a major role in signal transduction. *Development* **131**,2395-2408.
21. Lewis PM, Dunn MP, McMahon JA, Logan M, Martin JF, St- Jacques B, McMahon AP (2001) Cholesterol modification of Sonic hedgehog is required for long-range signaling activity and effective modulation of signaling by Ptc1. *Cell* **105**, 599-612.
22. Gritli-Linde A, Lewis P, McMahon AP, Linde A (2001) The whereabouts of a morphogen: direct evidence for short- and graded longrange activity of hedgehog signaling peptides. *Dev Biol* **236**,364-386.
23. Guerrero I, Chiang C (2006) A conserved mechanism of Hedgehog gradient formation by lipid modifications *Trends Cell Biol* **17**,1-5.



24. Zak BM, Crawford BE, Esko JD (2002) Hereditary multiple exostoses and heparan sulfate polymerization. *Biochim Biophys Acta* **1573**,346-55.
25. Koziel L, Kunath M, Kelly OG, Vortkamp A (2004) Ext-dependent heparan sulfate regulates the range of Ihh signaling during endochondral ossification. *Dev Cell* **6**,801-813.
26. Zeng X, Goetz JA, Suber LM, Scott WJ Jr, Schreiner CM, Robbins DJ (2001) A freely diffusible form of Sonic hedgehog mediates long-range signaling. *Nature* **411**,716-720.
27. Chen MH, Li YJ, Kawakami T, Xu SM, Chuang PT (2004) Palmitoylation is required for the production of a soluble multimeric Hedgehog protein complex and long-range signaling in vertebrates. *Genes Dev* **18**, 641-659.
28. Gallet A, Ruel L, Staccini-Lavenant L, Therond PP (2006) Cholesterol modification is necessary for controlled planar long-range activity of Hedgehog in *Drosophila* epithelia. *Development* **133**, 407-418.
29. Panakova D, Sprong H, Marois E, Thiele C, Eaton S (2005) Lipoprotein particles are required for Hedgehog and Wingless signaling. *Nature* **435**,58-65.
30. Eugster C, Panakova D, Mahmoud A, Eaton S (2007) Lipoprotein-heparan sulfate interactions in the Hh pathway. *Dev Cell* **1**, 57-71.
31. Callejo A, Culi J, Guerrero I (2008) Patched, the receptor of Hedgehog, is a lipoprotein receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**,912-917.
32. Marigo V y Tabin CJ (1996) Regulation of patched by sonic hedgehog in the developing neural tube. *Proc Natl Acad Sci U S A* **3**,9346-9351.
33. Carpenter D, Stone DM, Brush J, Ryan A, Armanini M, Frantz G, Rosenthal A, de Sauvage FJ (1998) Characterization of two patched receptors for the vertebrate hedgehog protein family. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**,13630-13634.
34. Rahnema F, Toftgard R, Zaphiropoulos PG (2004) Distinct roles of PTCH2 splice variants in Hedgehog signaling. *Biochem J* **378**, 325-334.
35. Torroja C, Gorfinkiel N, Guerrero I (2004) Patched controls the Hedgehog gradient by endocytosis in a dynamin-dependent manner, but this internalization does not play a major role in signal transduction. *Development* **131**,2395-2408.
36. Gallet A y Therond PP (2005) Temporal modulation of the Hedgehog morphogen gradient by a patched-dependent targeting to lysosomal compartment. *Dev Biol* **277**, 51-62.
37. Chuang PT y McMahon AP (1999) Vertebrate Hedgehog signaling modulated by induction of a Hedgehog-binding protein. *Nature* **397**,617-621.
38. Kang JS, Zhang W, Krauss RS (2007) Hedgehog signaling: cooking with Gas1. *Sci STKE* **403**, pe50.



39. Fisher CE, Howie SE (2006) The role of megalin (LRP-2/Gp330) during development. *Dev Biol* **296**, 279-297.
40. Lum L, Yao S, Mozer B, Rovescalli A, Von Kessler D, Nirenberg M, Beachy PA. 2003 Identification of Hedgehog pathway components by RNAi in *Drosophila* cultured cells. *Science* **299**, 2039-45.
41. Tenzen T, Allen BL, Cole F, Kang JS, Krauss RS, McMahon AP (2006) The cell surface membrane proteins Cdo and Boc are components and targets of the Hedgehog signaling pathway and feedback network in mice. *Dev Cell* **10**,647-50.
42. Zhang W, Kang JS, Cole F, Yi MJ, Krauss RS (2006) Cdo functions at multiple points in the Sonic Hedgehog pathway, and Cdo-deficient mice accurately model human holoprosencephaly. *Dev Cell* **10**,657-665.
43. Akiyama H, Shigeno C, Hiraki Y, Shukunami C, Kohno H, Akagi M, Konishi J, Nakamura T (1997) Cloning of a mouse smoothed cDNA and expression patterns of hedgehog signalling molecules during chondrogenesis and cartilage differentiation in clonal mouse EC cells, ATDC5. *Biochem Biophys Res Commun* **235**, 142-147.
44. Lee SK, Malpeli M, Cancedda R, Utani A, Yamada Y, Kleinman HK (1997) Laminin Ca $\alpha$ n expression by chick chondrocytes and mouse cartilaginous tissues in vivo and in vitro. *Exp Cell Res* **236**, 212-222.
45. Ruiz i, Altaba A (1998) Combinatorial Gli gene function plate and neuronal inductions by Sonic hedgehog. *Development* **125**,2203-2212.
46. Zhang W, Zhao Y, Tong C, Wang G, Wang B, Jia J, Jiang J (2005) Hedgehog-regulated Costal2-kinase complexes control phosphorylation and proteolytic processing of Cubitus interruptus. *Dev Cell* **8**,267-78.
47. Ruiz i, Altaba A, Mas C, Stecca B 2007 The Gli code: an information nexus regulating cell fate, stemness and cancer. *TRENDS in Cell Biology* **17**, 438-447.
48. Dai P, Akimaru H, Tanaka Y, Maekawa T, Nakafuku M y Ishii S (1999) Sonic hedgehog-induced activation of the Gli 1 promoter is mediated by Gli3. *J Biol Chem* **274**,8143-8152.
49. Aza-Blanc P, Lin H Y, Ruiz i Altaba A y Kornberg TB (2000) Expression of the vertebrate Gli proteins in *Drosophila* reveals a distribution of activator and repressor activities. *Development* **127**, 4293-4301.
50. Wang B, Fallon JF, Beachy PA(2000) Hedgehog-regulated processing of Gli3 produces an anterior/posterior repressor gradient in the developing vertebrate limb *Cell* **100**,423-434.
51. Rosenbaum, J. L. y Witman, G. B (2002) Intraflagellar transport. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 813-825.

52. Huangfu D, Liu A, Rakeman AS, Murcia NS, Niswander L y Anderson KV (2003) Hedgehog signalling in the mouse requires intraflagellar transport proteins. *Nature* **426**, 83-87.
53. Haycraft CJ, Banizs B, Aydin-Son Y, Zhang Q, Michaud EJ y Yoder BK (2005) Gli2 and gli3 localize to cilia and require the intraflagellar transport protein polaris for processing and function. *PLoS Genet* **1**, e53.
54. Huangfu D y Anderson KV (2005) Signaling from Smo to Ci/Gli: conservation and divergence of Hedgehog pathways from *Drosophila* to vertebrates. *Development* **133**, 314.
55. Liu A, Wang B y Niswander L A (2005) Mouse intraflagellar transport proteins regulate both the activator and repressor functions of Gli transcription factors. *Development* **132**, 3103-3111.
56. Corbit KC, Aanstad P, Singla V, Norman AR, Stainier DY y Reiter JF (2005) Vertebrate Smoothed functions at the primary cilium. *Nature* **437**, 1018-1021.
57. May S R, Ashique A M, Karlen M, Wang B, Shen Y, Zerbatis K, Reiter J, Ericson J y Peterson A S (2005) Loss of the retrograde motor for IFT disrupts localization of Smo to cilia and prevents the expression of both activator and repressor functions of Gli. *Dev Biol* **287**, 378-89.
58. Wolpert L (1969) Positional information and the spatial pattern of cellular differentiation. *J Theor Biol* **25**, 1-47.
59. Ingham PW y Placzek M (2006) Orchestrating ontogenesis: variations on a theme by sonic hedgehog. *Nat Rev Genet* **7**, 841-850.
60. Saunders JW, Gasseling MT (1968) Ectodermal —mesenchymal interactions in the origin of limb symmetry. In *Epithelial— Mesenchymal Interactions*. Edited by Fleischmayer R, Billingham RE. *Williams & Wilkins*, 78-97.
61. Tickle C (2002) The early history of the polarizing region: from classical embryology to molecular biology. *Int J Dev Biol* **46**, 847-852.
62. Bastida MF, Ros MA (2008) How do we get a perfect complement of digits? *Curr Opin Genet Dev*. **522**: 1-7.
63. Briscoe J, Ericson J (2001) Specification of neuronal fates in the ventral neural tube. *Curr Opin Neurobiol* **11**, 43-49.
64. Jessell TM (2000) Neuronal specification in the spinal cord: inductive signals and transcriptional codes. *Nat Rev Genet* **1**, 20-29.
65. Marti E y Bovolenta P (2002) Sonic hedgehog in CNS development: one signal, multiple outputs. *Trends Neurosci* **25**, 89-96.
66. Bai CB, Stephen D y Joyner AL (2004) All mouse ventral spinal cord patterning by hedgehog is Gli dependent and involves an activator function of Gli3. *Dev Cell* **6**, 103-115.

67. Lobjois V, Benazeraf B, Bertrand N, Medevielle F, Pituello F (2004) Specific regulation of cyclins D1 and D2 by FGF and Shh signaling coordinates cell cycle progression, patterning, and differentiation during early steps of spinal cord development. *Dev Biol* **15**,195-209.
68. Cayuso J, Ulloa F, Cox B, Briscoe J, Martí E (2006) The Sonic hedgehog pathway independently controls the patterning, proliferation and survival of neuroepithelial cells by regulating Gli activity. *Development* **133**,517-528.
69. Charron F, Stein E, Jeong J, McMahon AP, Tessier-Lavigne M (2003) The morphogen sonic hedgehog is an axonal chemoattractant that collaborates with netrin-1 in midline axon guidance. *Cell* **113**, 11-23.
70. Bourikas D, Pekarik V, Baeriswyl T, Grunditz A, Sadhu R, Nardó M, Stoeckli ET (2005) Sonic hedgehog guides commissural axons along the longitudinal axis of the spinal cord. *Nat Neurosci* **8**,297-304.
71. Palma V, Lim DA, Dahmane N, Sánchez P, Brionne TC, Herzberg CD, Gitton Y, Carleton A, Alvarez-Buylla A, Ruiz i Altaba A (2005) Sonic hedgehog controls stem cell behavior in the postnatal and adult brain. *Development* **132**,335-344.
72. Nieuwenhuis E y Hui C C (2005) Hedgehog signaling and congenital malformations. *Clin Genet* **67**, 193-208.
73. Belloni E, Muenke M, Roessler E, Traverso G, Siegel-Bartelt J, Frumkin A, Mitchell HF, Donis-Keller H, Helms C, Hing AV, Heng HH, Koop B, Martindale D, Rommens JM, Tsui LC, Scherer SW (1996) Identification of Sonic hedgehog as a candidate gene responsible for holoprosencephaly. *Nat Genet* **14**,353-356.
74. Roessler E, Ward DE, Gaudenz K, Belloni E, Scherer SW, Donnai D, Siegel-Bartelt J, Tsui LC, Muenke M (1997) Cytogenetic rearrangements involving the loss of the Sonic Hedgehog gene at 7q36 cause holoprosencephaly. *Hum Genet* **100**,172-181.
75. Nanni L, Ming JE, Bocian M, Steinhaus K, Bianchi DW, Die-Smulders C, Giannotti A, Imaizumi K, Jones KL, Campo MD, Martin RA, Meinecke P, Pierpont ME, Robin NH, Young ID, Roessler E, Muenke M (1999) The mutational spectrum of the sonic hedgehog gene in holoprosencephaly: SHH mutations cause a significant proportion of autosomal dominant holoprosencephaly. *Hum Mol Genet* **8**,2479-2488.
76. Litingtung Y, Lei L, Westphal H, Chiang C (1998) Sonic hedgehog is essential to foregut development. *Nat Genet* **20**, 58-61.
77. Motoyama J, Liu J, Mo R, Ding Q, Post M, Hui CC. 1998 Essential function of Gli2 and Gli3 in the formation of lung, trachea and oesophagus. *Nat Genet.* **20**: 54-7.
78. Johnston JJ, Olivos-Glander I, Killoran C, Elson E, Turner JT, et al. (2005). Molecular and clinical analyses of Greig cephalopolysyndactyly and Pallister-Hall syndromes: robust phenotype prediction from the type and position of GLI3 mutations. *Am J Hum Genet* **76**: 609-22.

79. Vortkamp A, Gessler M, Grzeschik KH (1991) GLI3 zinc-finger gene interrupted by translocations in Greig syndrome families. *Nature* **8**,539-540.
80. Wild A, Kalff-Suske M, Vortkamp A, Bornholdt D, König R y Grzeschik K H (1997) Point mutations in human GLI3 cause Greig syndrome. *Hum Mol Genet* **6**, 1979-1984.
81. Kalff-Suske M, Wild A, Topp J, Wessling M, Jacobsen E M, Bornholdt, D, Engel H, Heuer H, Aalfs C M, Ausems M G, Barone R, Herzog A, Heutink P, Homfray T, Gillessen-Kaesbach G, König R, Kunze, J, Meinecke P, Müller D, Rizzo R, Strenge S, Superti-Furga A y Grzeschik KH (1999) Point mutations throughout the GLI3 gene cause Greig cephalopolysyndactyly syndrome. *Hum Mol Genet* **8**, 1769-1777.
82. Kang S, Graham JM, Jr Olney AH y Biesecker LG (1997) GLI3 frameshift mutations cause autosomal dominant Pallister-Hall syndrome. *Nat Genet* **15**, 266-268.
83. Böse J, Grotewold L, Rüther U(2002) Pallister-Hall syndrome phenotype in mice mutant for Gli3. *Hum Mol Genet* **11**,1129-1135.
84. Talamillo A, Bastida MF, Fernandez-Teran M, Ros MA(2005)The developing limb and the control of the number of digits. *Clin Genet* **67**,143-53.
85. Vortkamp A, Lee K, Lanske B, Segre GV, Kronenberg HM, Tabin CJ (1996) Regulation of rate of cartilage differentiation by Indian hedgehog and PTH-related protein. *Science* **2**,613-622.
86. St-Jacques B, Hammerschmidt M, McMahon AP (1999) Indian hedgehog signaling regulates proliferation and differentiation of chondrocytes and is essential for bone formation. *Genes Dev* **15**, 2072-2086.
87. Gao B, Guo J, She C, Shu A, Yang M, Tan Z, Yang X, Guo S, Feng G y He L (2001) Mutations in IHH, encoding Indian hedgehog, cause brachydactyly type A-1. *Nat Genet* **28**, 386-388.
88. Bitgood MJ, Shen L, McMahon AP (1996) Sertoli cell signaling by Desert hedgehog regulates the male germline. *Curr Biol* **6**,298-304.
89. Umehara F, Tate G, Itoh K, Yamaguchi N, Douchi T, Mitsuya T, Osame M (2000) A novel mutation of desert hedgehog in a patient with 46,XY partial gonadal dysgenesis accompanied by minifascicular neuropathy. *Am J Hum Genet* **67**,1302-5.
90. Doetsch F, Caillé I, Lim DA, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. 1999 Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell* **97**, 703-16.
91. Machold R, Hayashi S, Rutlin M, Muzumdar MD, Nery S, Corbin JG, Gritli-Linde A, Dellovade T, Porter JA, Rubin LL, Dudek H, McMahon AP, Fishell G. 2003 Sonic hedgehog is required for progenitor cell maintenance in telencephalic stem cell niches. *Neuron* **39**:937-5.

92. Trowbridge JJ, Scott MP, Bhatia M. 2006 Hedgehog modulates cell cycle regulators in stem cells to control hematopoietic regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **103**, 14134-9.
93. Gorlin R J (1995) Nevoid basal cell carcinoma syndrome. *Dermatol Clin* **13**, 113-125.
94. Hahn H, Christiansen J, Wicking C, Zaphiropoulos PG, Chidambaram A, Gerrard B, Vorechovsky I, Bale AE, Toftgard R, Dean M, Wainwright B (1996) A mammalian patched homolog is expressed in target tissues of sonic hedgehog and maps to a region associated with developmental abnormalities. *J Biol Chem* **271**, 12125-12128.
95. Johnson R L, Rothman A L, Xie J, Goodrich L V, Bare J W, Bonifas J. M, Quinn A G, Myers R M, Cox D R, Epstein E H, Jr y Scott M P. (1996) Human homolog of patched, a candidate gene for the basal cell nevus syndrome. *Science* **272**, 1668-1671.
96. Kimonis V E, Goldstein A M, Pastakia B, Yang M L, Kase R, DiGiovanna. J J, Bale A E y Bale S J (1997) Clinical manifestations in 105 persons with nevoid basal cell carcinoma syndrome. *Am J Med Genet* **69**, 299-308.
97. Landis S H, Murray T, Bolden S y Wingo P A (1998) Cancer statistics. *CA Cancer J Clin* **48**, 6-29.
98. Xie J, Murone M, Luoh SM, Ryan A, Gu Q, Zhang C, Bonifas JM, Lam CW, Hynes M, Goddard A, Rosenthal A, Epstein EH Jr, de Sauvage FJ. 1998 Activating Smoothed mutations in sporadic basal-cell carcinoma. *Nature* **391**, 90-2.
99. Morton JP, Lewis BC 2007 Shh signaling and pancreatic cancer. *Cell Cycle* **6**, 1553-1557.
100. King PJ, Guasti L, Laufer E 2008 Hedgehog signalling in endocrine development and disease. *Journal Endocrinology* **198**, 439-450.
101. Parkin CA, Ingham PW 2007 The adventures of Sonic Hedgehog in development and repair. I. Hedgehog signaling in gastrointestinal development and disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **294**, G363-G367.
102. Clement V, Sanchez P, de Tribolet N, Radovanovic I, Ruiz i Altaba A. 2007 HEDGEHOG-GLI1 signaling regulates human glioma growth, cancer stem cell self-renewal, and tumorigenicity. *Curr Biol*. **17**, 165-72.
103. Ruiz i Altaba A, Stecca B, Sánchez P. 2004 Hedgehog—Gli signaling in brain tumors: stem cells and paradevelopmental programs in cancer. *Cancer Lett*. **204**, 145-57.
104. Sanchez P, Hernández AM, Stecca B, Kahler AJ, DeGueme AM, Barrett A, Beyna M, Datta MW, Datta S, Ruiz i Altaba A. 2004 Inhibition of prostate cancer proliferation by interference with SONIC HEDGEHOG-GLI1 signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **101**, 12561-6.