

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

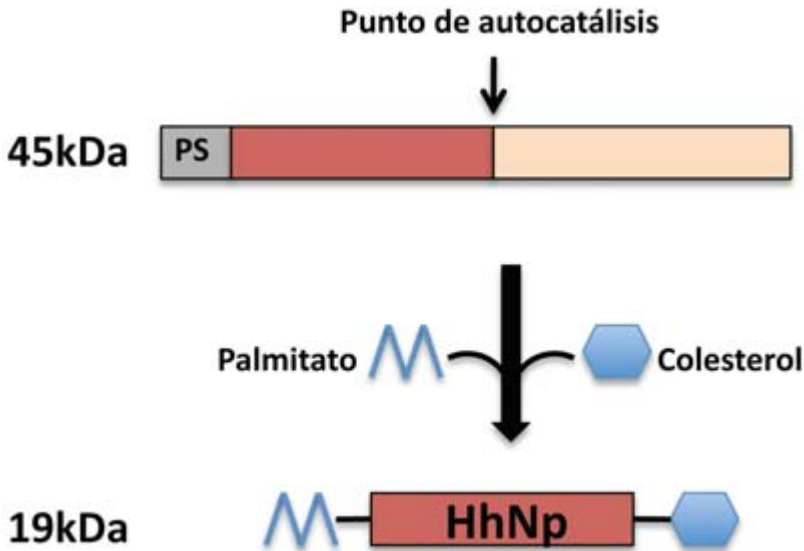


FIGURA 1. Esquema que muestra el procesamiento de las proteínas Hh. Primero se sintetiza un precursor de 45 kDa que sufre una autocatálisis dependiente del fragmento C-terminal para generar el péptido activo que es el fragmento N-terminal de 19 kDa al que se le añaden colesterol y ácido palmítico. Abreviaturas: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

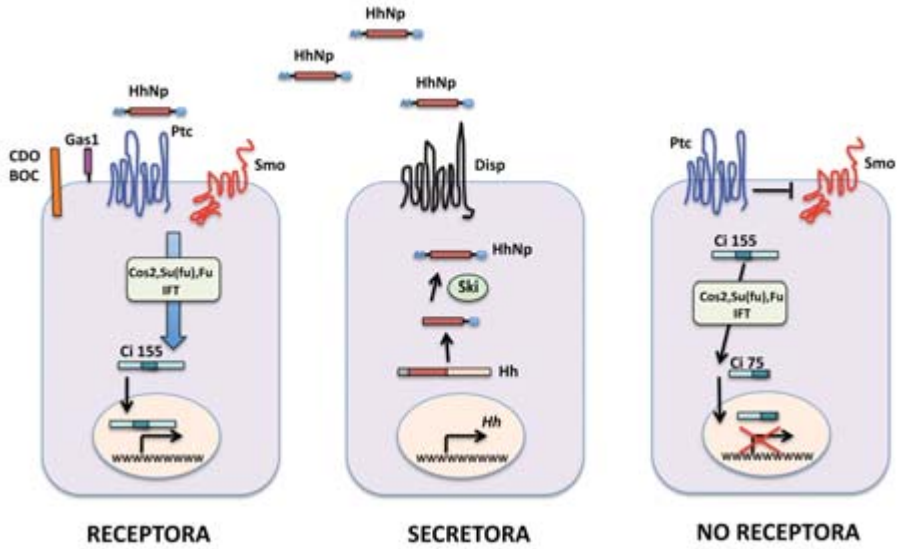


FIGURA 2. Esquema que muestra la señalización de Hh. La célula secretora (central) necesita de Disp para liberarlo al medio extracelular. En la célula receptora (izquierda) Hh se une con su receptor Ptc lo cual libera a Smo e impide el procesamiento proteolítico de Ci, el transductor transcripcional 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 glicotransferasas 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 lipoproteícos 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

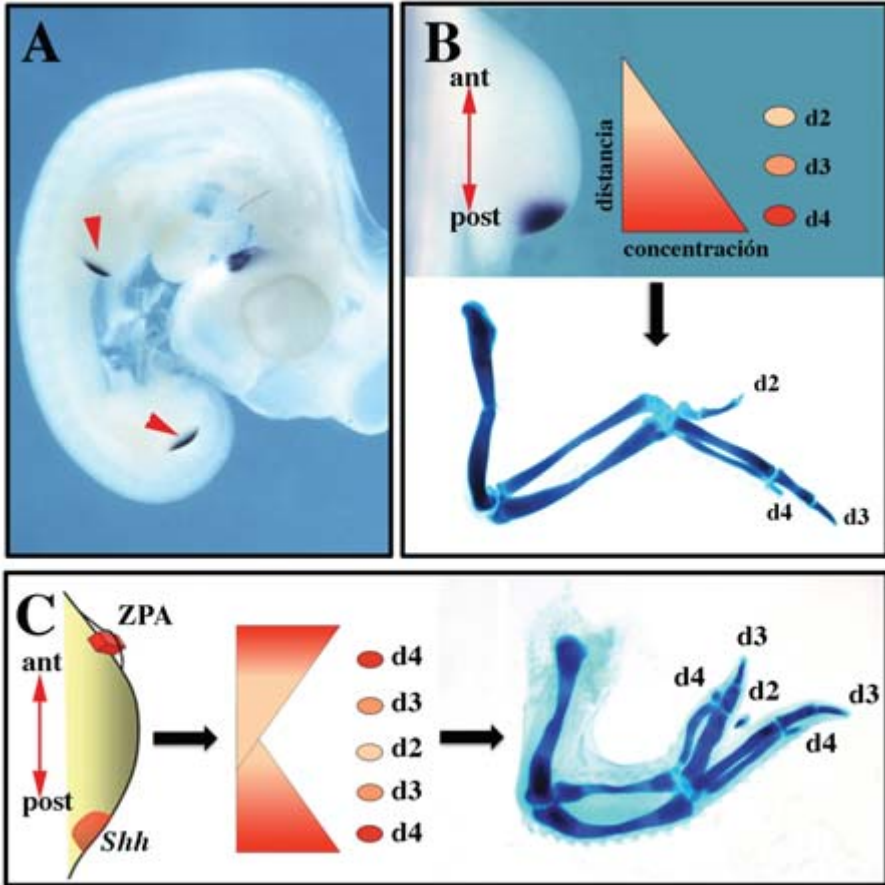


FIGURA 3. (A) Patrón de expresión de Shh en un embrión de pollo de aproximadamente 4 días de incubación. La expresión de Shh en la ZPA del ala y pata está indicada por cabezas de flecha. (B) La expresión normal de Shh en la ZPA de un ala de embrión de pollo se acompaña del esquema del modelo de su difusión 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 (pulgar-meñique) 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 neocortex, 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 (pulgár/dedo gordo) se considere que no requiere Shh para su formación (Fig. 4).

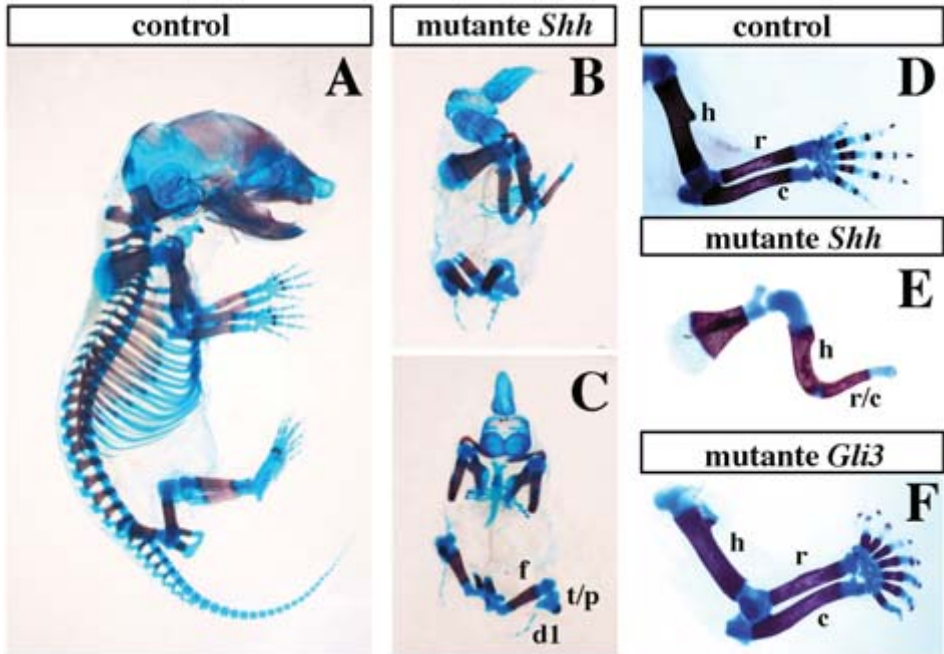


FIGURA 4. (A) Patrón esquelético de un feto de ratón casi a término. (B) y (C) muestra el patrón esquelético de un feto de la misma camada mutante para *Shh* en una visión lateral (B) y anterior (C). Nótese las graves alteraciones de la cabeza con probóscide y de las extremidades, entre otras. (D) Patrón 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: tibial/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 α 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, Rütther 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* **24**,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.