

SEBBM DIVULGACIÓN

ACÉRCATE A NUESTROS CIENTÍFICOS

La cara y cruz de la vía SHH en el desarrollo de las extremidades.

Javier López-Ríos Moreno

Centro Andaluz de Biología del Desarrollo (CABD), Sevilla



Biografía

Javier López-Ríos Moreno estudió Biología en la Universidad Autónoma de Madrid (UAM). Obtuvo su doctorado (UAM, 2002) bajo la supervisión de Paola Bovolenta en el Instituto Cajal-CSIC. A continuación, realizó una etapa postdoctoral con Rolf Zeller, en la Universidad de Basilea (Suiza), investigando las funciones de la vía de señalización SHH durante el desarrollo y evolución de la extremidad de vertebrados (Nature Methods 2010; Dev Cell 2012; Dev Cell 2014, Nature 2014; Cell, 2016). Tras una etapa corta en Suiza como investigador junior independiente, en 2017 se incorporó como científico titular al Centro Andaluz de Biología del Desarrollo (CABD-CSIC/UPO/JA), en Sevilla. Su grupo combina el sistema genético del ratón con el uso de herramientas de genómica funcional en grandes mamíferos, como el cerdo, para estudiar las redes de regulación génica que controlan la morfogénesis y evolución del esqueleto de la extremidad, así como los mecanismos de especificación de linajes celulares en el hueso (Nature 2018, Cell Reports 2020, PNAS 2021).

La vía de señalización Sonic Hedgehog (SHH) controla la identidad y el número de dedos que se forman en nuestras extremidades. Múltiples estudios están revelando cómo alteraciones cis-reguladoras en los paisajes genómicos de los componentes de esta vía han contribuido a la diversificación evolutiva de la extremidad de tetrápodos, pero también subyacen a la aparición de defectos congénitos de la misma.

Summary

The Sonic Hedgehog (SHH) signaling pathway controls digit number and identity. Several studies are revealing that cis-regulatory alterations in the genomic landscapes of components of the SHH pathway have contributed to the evolutionary diversification of the tetrapod limb, but can also underlie the appearance of congenital limb malformations.

En la maravillosa película “La princesa prometida”, el espadachín Íñigo Montoya buscaba incansablemente al hombre con seis dedos que había asesinado a su padre. Este tipo de malformaciones de la extremidad no son tan raras como pudiera parecer, llegando a afectar a 1 de cada 500 nacimientos, aunque con frecuencia se corrigen en la infancia mediante cirugía. Uno de los principales mecanismos moleculares implicados, de forma directa o indirecta, en el desarrollo de más de cinco dedos son aquellos mediados por la vía de señalización Sonic Hedgehog (SHH). Este ligando se produce en el mesénquima posterior de la extremidad embrionaria durante el desarrollo y controla tanto el número de dedos que se forman como su identidad a lo largo del eje antero-posterior (pulgares-meñiques). Así, ratones en los que el gen *Shh* está inactivado presentan extremidades truncadas, con fusiones de los huesos del antebrazo y ausencia de muñeca y dedos. La vía SHH tiene funciones pleotrópicas durante el desarrollo, por lo que estos mutantes también presentan malformaciones severas en múltiples tejidos, incluyendo el sistema nervioso central, y mueren durante la gestación. Por su parte, ratones que portan alelos de pérdida de función en el factor de transcripción *GLI3*, un regulador negativo de la vía SHH, mueren igualmente durante el periodo embrionario y presentan defectos variados, incluido la formación de entre 6 y 9 dedos. El eje SHH-*GLI3* es muy antiguo evolutivamente, y también opera durante el desarrollo de las aletas en peces. Recientemente, hemos demostrado que la inactivación del gen *gli3* en pez medaka lleva a la formación de aletas más grandes con múltiples huesos adicionales [1], lo que recuerda a la polidactilia que aparece en ratones deficientes en *Gli3* [2], o en pacientes que portan mutaciones en heterocigosis en *GLI3*. Tanto en ratón como en pez medaka, la pérdida de función de este gen lleva a la sobreexpresión de varias dianas transcripcionales de la vía SHH que codifican para reguladores de proliferación celular. Los peces no tienen dedos, pero estos resultados indican que existe una relación evolutiva muy profunda entre el esqueleto endocondral de los peces y la mano de los tetrápodos, y que ambos utilizan mecanismos similares para controlar su tamaño.

La expresión de *Shh* en la extremidad embrionaria de vertebrados está controlada por un elemento cis-regulador muy lejano denominado ZRS. La delección en homocigosis del ZRS en el ratón fenocopia únicamente la pérdida del esqueleto distal que se observa tras la inactivación constitutiva de *Shh*, sin otros defectos aparentes. En humanos existe una rara malformación autosómica recesiva denominada aqueiropodia caracterizada por el truncamiento distal del esqueleto de brazos y piernas, con aplasia completa de manos y pies, pero sin defectos en otros órganos. Se han descrito dos delecciones en pacientes con aqueiropodia: la primera, de 102 kb, incluye el ZRS humano; la segunda, de 12 kb, no afecta al ZRS, sino que la región eliminada contiene sitios de unión para CTCF y está implicada en el plegamiento de la cromatina, de manera que, en su ausencia, el elemento ZRS no puede interactuar con el promotor de *SHH* [3]. En contraposición,



Resumen

existen duplicaciones y múltiples mutaciones puntuales descritas en el ZRS humano (y de otras especies, incluidos los famosos gatos de Ernest Hemingway), pero estas típicamente dan lugar a fenotipos de ganancia de función y expresión ectópica de *Shh*, lo que produce polidactilias y/o pulgares con tres falanges [4].

El registro fósil nos indica que todas las morfologías presentes en los tetrápodos actuales derivan de la modificación de un patrón esquelético ancestral con cinco dedos. Dada la relevancia de la vía de SHH para el desarrollo de las extremidades, no resulta sorprendente que alteraciones en esta vía hayan contribuido a la diversificación evolutiva de las mismas. El caso más extremo es el de la pérdida de completa de extremidades, que ha ocurrido de forma convergente en múltiples linajes (serpientes, cecilidos, patas posteriores en cetáceos, etc.). Por ejemplo, *Shh* se expresa de forma muy residual en el primordio de la extremidad posterior de la serpiente pitón, lo que correlaciona con un esqueleto vestigial y la acumulación de mutaciones inactivantes en la secuencia ZRS de serpientes [5,6]. Otro caso paradigmático de evolución morfológica son las extremidades de artiodáctilos, como vacas o cerdos. Estos animales corren velozmente gracias a manos simétricas en las que sólo dos dedos centrales soportan el peso del animal, mientras que los otros dedos se han perdido o miniaturizado. Nuestros trabajos han revelado que la expresión de *Ptch1*, que codifica el receptor de SHH, se encuentra alterada en la extremidad embrionaria de vaca y cerdo en comparación con el ratón, y que las consecuencias en la activación de la vía SHH se correlacionan con la pérdida de asimetría en la mano de artiodáctilos y, de forma secundaria, con la reducción en el número/tamaño de dedos [7,8]. Además, identificamos que el enhancer LRM, que controla la expresión de *Ptch1* en la extremidad embrionaria, ha degenerado funcionalmente en el genoma de estos animales.

En su conjunto, estos estudios ilustran cómo alteraciones reguladoras proporcionan la plasticidad necesaria para que grandes redes de regulación morfogénica, con funciones pleiotrópicas y esenciales, acomoden cambios de expresión (niveles y/o espacio-temporales) que contribuyan a la aparición de novedades evolutivas, en este caso de la extremidad. Al mismo tiempo, mutaciones reguladoras en estos mismos paisajes genómicos pueden dar lugar a variantes alélicas que interfieren con el desarrollo embrionario en humanos, causando malformaciones congénitas de brazos y/o piernas.

Bibliografía:

1. Letelier, J., Naranjo, S., Sospedra-Arrufat, I., Martínez-Morales, J.R., López-Ríos, J., Shubin, N., and Gómez-Skarmeta, J.L. (2021). The *Shh/Gli3* gene regulatory network precedes the origin of paired fins and reveals the deep homology between distal fins and digits. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 118, e2100575118.
2. López-Ríos, J., Speziale, D., Robay, D., Scotti, M., Osterwalder, M., Nusspaumer, G., Galli, A., Holländer, G.A., Kmita, M., and Zeller, R. (2012). *GLI3* constrains digit number by controlling both progenitor proliferation and BMP-dependent exit to chondrogenesis. *Dev. Cell* 22, 837–848.
3. Ushiki, A., Zhang, Y., Xiong, C., Zhao, J., Georgakopoulos-Soares, I., Kane, L., Jamieson, K., Bamshad, M.J., Nickerson, D.A., University of Washington Center for Mendelian Genomics, Shen, Y., Lettice, L.A., Silveira-Lucas, E.L., Petit, F., and Ahituv N. (2021). Deletion of CTCF sites in the SHH locus alters enhancer-promoter interactions and leads to acheiropodia. *Nat Commun.* 12, 2282.
4. Anderson, E., Peluso, S., Lettice, L.A., and Hill, R.E. (2012). Human limb abnormalities caused by disruption of hedgehog signaling. *Trends Genet.* 28, 364-73.
5. Kvon, E.Z., Kamneva, O.K., Melo, U.S., Barozzi, I., Osterwalder, M., Mannion, B.J., Tissières, V., Pickle, C.S., Plajzer-Frick, I., Lee, E.A., Kato, M., Garvin, T.H., Akiyama, J.A., Afzal, V., López-Ríos, J., Rubin, E.M., Dickel, D.E., Pennacchio, L.A., and Visel A. (2016). Progressive Loss of Function in a Limb Enhancer during Snake Evolution. *Cell* 167, 633-642.
6. Leal, F., and Cohn MJ. (2016). Loss and re-emergence of legs in snakes by modular evolution of Sonic hedgehog and HOXD enhancers. *Curr Biol* 26, 2966-2973.
7. López-Ríos, J., Duchesne, A., Speziale, D., Andrey, G., Peterson, K.A., Germann, P., Unal, E., Liu, J., Floriot, S., Barbey, S., et al. (2014). Attenuated sensing of SHH by *Ptch1* underlies evolution of bovine limbs. *Nature* 511, 46–51.
8. Tissières, V., Geier, F., Kessler, B., Wolf, E., Zeller, R., and López-Ríos, J. (2020). Gene regulatory and expression differences between mouse and pig limb buds provide insights into the evolutionary emergence of artiodactyl traits. *Cell Rep.* 31, 107490.

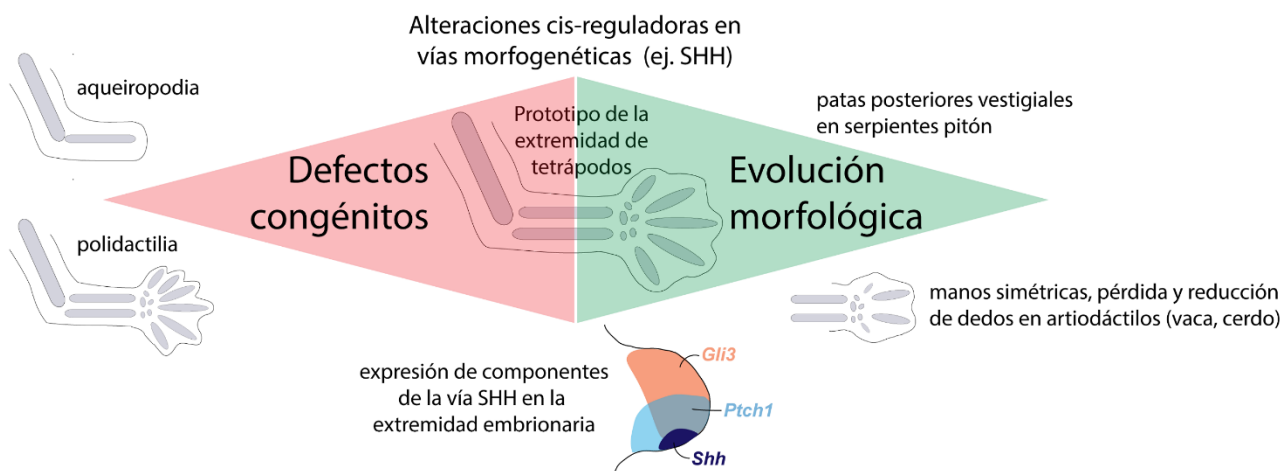


Figura 1. Alteraciones cis-reguladoras en vías morfogénicas de la extremidad de tetrápodos