

# Zur Rolle der Hedgehog-Signalkaskade bei der Tumorentstehung

Roland Kappler

Institut für Humangenetik  
Universität Göttingen



## Zur Person

Roland Kappler, geb. 1968 in Landstuhl. 1989–1995 Studium der Biologie an der Universität Kaiserslautern. 1995 Diplom im Fach Biologie, Fachrichtung Humanbiologie und Humangenetik; Thema der Diplomarbeit: „Darstellung expressionsaktiver Genomregionen mittels genomischer cDNA-Fluoreszenz in situ Hybridisierung“. 1995–1998 Dissertation über das Thema: „Charakterisierung genomischer und genetischer Veränderungen in neuroepithelialen Tumoren der Ratte“ in der Abteilung für Humanbiologie und Humangenetik der Universität Kaiserslautern (Prof. Dr. Dr. H. Zankl). 1998 Promotion zum Dr. rer. nat.; 1998–1999 wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Abteilung Humanbiologie und Humangenetik der Universität Kaiserslautern. 1999–2001 wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Pathologie des Forschungszentrums für Umwelt und Gesundheit Neuherberg (Prof. Dr. H. Höfler). 2001–2005 wissenschaftlicher Assistent (C1) am Institut für Humangenetik der Universität Göttingen (Prof. Dr. W. Engel). 2005 Habilitation für das Fach Molekulare Humangenetik mit dem Thema: „Zur Rolle der Hedgehog-Signalkaskade bei der Tumorentstehung“ in der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen. Seit 2005 Leiter der Kinderchirurgischen Forschungslaboratorien am Dr. von Haunerschen Kinderspital der Ludwig-Maximilians-Universität München (Prof. Dr. D. von Schweinitz).

## Zusammenfassung der Habilitation

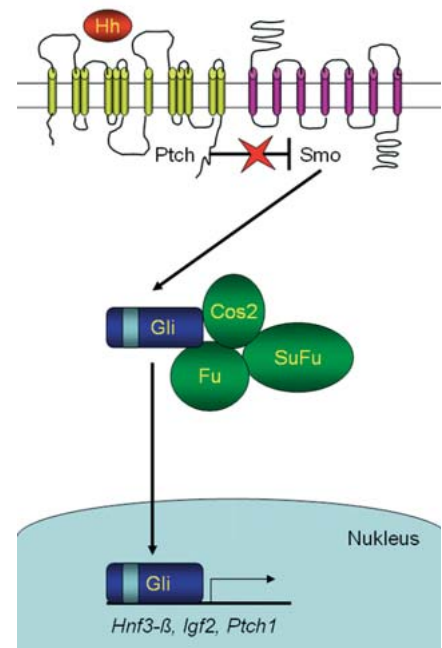
Der Hedgehog-Signalweg spielt eine wichtige Rolle in der embryonalen Entwicklung verschiedener Organe wie der Haut, des Gehirns und der Lunge. Eine pathologische Aktivierung dieses Signalwegs hingegen führt zu Krebserkrankungen, wie Basalzellkarzinomen, Medulloblastomen und kleinzelligen Lungenkarzinomen. Wir haben uns mit der Entstehung von Tumoren in Abhängigkeit einer konstitutiven Aktivierung des Hedgehog-Signalwegs und der Aufklärung ihrer genetischen Ursachen beschäftigt. Dabei konnten wir

- a) die Funktion der bereits bekannten Zielgene des Hedgehog-Signalwegs *Ptch1* und *Igf2* im Mausmodell beschreiben,
- b) neue Komponenten des Hedgehog-Signalwegs wie *Gadd45a*, *Foxf1* und *Bcl2* mittels der Mikroarray-Technologie identifizieren,
- c) eine molekulare Taxonomie Hedgehog-abhängiger und unabhängiger Rhabdomyosarkome anhand von Expressionsprofilen aufstellen, sowie
- d) die Aktivierung des Hedgehog-Signalwegs infolge *PTCH1*-Mutationen bei humanen Rhabdomyosarkomen und ovariellen Dermoidzysten ausschließen.

## Die Hedgehog-Signalkaskade

Die Embryogenese wird durch eine Vielzahl komplexer Signalkaskaden reguliert, die von zentraler Bedeutung für eine normale Entwicklung sind. An oberster Stelle einer solchen Signal-

kaskade steht das Hedgehog Protein, nach dem der entsprechende Signalübertragungsweg benannt ist. Wie so viele interessante Gene wurde Hedgehog bei einer systematischen Analyse embryonal lethaler Mutanten der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* entdeckt. Diese grundlegende Arbeit wurde bereits im Jahre 1980 von der Nobelpreisträgerin Christiane Nüsslein-Volhard beschrieben und deutete früh auf die essentielle Rolle dieses Proteins bei der Embryonalentwicklung hin. In den folgenden Jahren konnte die Funktion des Hedgehog-Signalwegs näher aufgeklärt und erste Modelle der Signaltransduktion aufgestellt werden (siehe Abb. 1). Nach heutigem Kenntnisstand besteht der Hedgehog-Signalweg im Wesentlichen aus dem Liganden Hedgehog [bei Vertebraten drei Homologe: *Sonic hedgehog (Shh)*, *Desert hedgehog (Dhh)* und *Indian hedgehog (Ihh)*] und einem Rezeptor namens Patched [bei Vertebraten zwei Homologe: *Patched1 (Ptch1)* und *Patched2 (Ptch2)*], wobei Patched eine inhibierende Wirkung auf ein Protein namens Smoothened (Smo) besitzt. Durch die Bindung des Liganden an den Rezeptor wird die Repression von Smo aufgehoben, wodurch der Signalweg aktiviert wird, was über bislang noch weitestgehend unbekannte Mechanismen in der Dissoziation eines Multiproteinkomplexes von den Mikrotubuli resultiert. Dabei wird bei Vertebraten ein Zinkfinger-Transkriptionsfaktor namens Gli [bei Vertebraten drei Homologe: *Gli1*, *Gli2* und *Gli3*] in seine Aktivatorform überführt, gelangt anschließend in den Kern und



**Abb 1 Die Hedgehog-Signalkaskade**

In Abwesenheit des Liganden Hedgehog (Hh) verhindert der transmembrane Rezeptor Patched (Ptch) die Aktivierung der Signaltransduktion durch das Protein Smoothened (Smo). Durch die Bindung von Hh an Ptch wird diese Repression aufgehoben, wodurch der Signalweg aktiviert wird. Der Transkriptionsfaktor Gli wandert in den Nucleus und reguliert durch Bindung an die entsprechenden Promotoren die Expression verschiedener Zielgene wie *Hnf3-β*, *Igf2* und *Ptch1* selbst, wodurch ein negativer Rückkopplungsmechanismus ausgelöst wird.

reguliert dort die Expression verschiedener Zielgene, wie *Hepatocyte nuclear factor 3β*, *Insulin-like growth factor 2* und *Ptch1* selbst.

#### Die Rolle der Hedgehog-Signalkaskade bei der Entstehung von Krebs

Bereits im Jahre 1988 wurde eine Amplifikation des *GLI1*-Gens in humanen Gliomen identifiziert. Aber erst die Beschreibung von inaktivierenden Keimbahnmutationen im *PTCH1*-Gen bei der erblichen Form des Basalzellarzinoms (BCC) und bei Patienten mit Basalzellnävus- oder Gorlin-Syndrom (NBCCS) haben eindeutige Beweise für die Beteiligung des Hedgehog-Signalwegs bei der Entstehung von Krebs erbracht. Dieses seltene, autosomal-dominant vererbte Syndrom ist gekennzeichnet durch eine Prädisposition für eine Vielzahl von Tumorerkrankungen wie dem BCC, dem Medulloblastom (MB), dem Ovarialfibrom, dem Meningiom, dem Fibrosarkom und dem Rhabdomyosarkom (RMS). Zusätzlich können Rippenanomalien, Poly- und Syndaktylien, Großwuchs, multiple Zysten und eine progressive intrakranielle Kalzifikation auftreten, die auf eine Haploinsuffizienz des *PTCH1*-Gens während der Embryonalentwicklung zurückzuführen sind. Bei der Entstehung von BCC kommt es bei NBCCS-Patienten zusätzlich zu einem Verlust des zweiten *PTCH1*-Allels infolge Verlust der Heterozygotie (LOH) oder Mutation, was für *PTCH1* eine Funktion als Tumorsuppressorgen nahe legte. In sporadischen BCC konnten in 12% bis 38% aller Fälle *PTCH1*-Mutatio-

nen nachgewiesen werden. In Analogie zu der bekannten Funktion des APC Gens als „gatekeeper“ bei der kolorektalen Krebsentstehung scheinen Mutationen im *PCTH1*-Gen während der Hauttumorgenese das entscheidende Ereignis für die Progression eines bestimmten Zelltyps in den neoplastischen Zustand zu sein. Seit der Beschreibung des *PTCH1*-Gens in BCC von Patienten mit NBCCS und in nichtsyndromalen BCC konnten bislang Mutationen in desmoplastischen MB, Meningiomen, primitiven neuroektodermalen Tumoren, Brustkrebs, Ösophaguskarzinomen, Trichoepitheliomen und Blasenkarzinomen identifiziert werden. Mutationen im *PTCH2*-Gen konnten lediglich in BCC und MB nachgewiesen werden. Der Zusammenhang einer aberranten Aktivierung der Hedgehog-Signalkaskade mit der Entstehung von Krebs konnte auch für andere Komponenten des Signalwegs nachgewiesen werden. So wurden aktivierende Mutationen in den Genen *SHH* und *SMO* in einigen Fällen von BCC und MB beschrieben. *GLI1* als eine der am weitesten stromabwärts gelegenen Komponenten der Hedgehog-Signalkaskade zeigt in BCC eine starke Transkriptionsaktivität, und eine ektopische Überexpression von *GLI1* in *Xenopus*-Embryonen führt zur Entwicklung von BCC-ähnlichen epidermalen Tumoren.

#### Mausmodelle Hedgehog-assoziiierter Krebserkrankungen

Die Modellierung genetischer Veränderungen in der Maus durch die konstitutive bzw. ektopische Expression eines Transgens oder durch die Inak-

tivierung eines Endogens stellt seit Jahren ein wichtiges Hilfsmittel bei der Erforschung molekularer Mechanismen der Tumorentstehung dar. Bereits ein Jahr nach der Entdeckung der ursächlichen Rolle des konstitutiv aktivierten Hedgehog-Signalwegs bei der Tumorentstehung konnten Mausmodelle für BCC, RMS und MB beschrieben werden. So führt die hautspezifische Überexpression des Gens *Shh* unter der Kontrolle des Keratin 14 Promotors zur Entwicklung von BCC-ähnlichen epidermalen Proliferationen und darüber hinaus zu Extremitätenanomalien wie Polydaktylie. Während die Überexpression von Wildtyp *Smo* in der Maus keinen Tumorphänotyp auslöst, resultiert die ektopische Expression eines aktivierten *Smo*-Gens unter der Kontrolle des Keratin 5 Promotors in der Bildung von BCC. Auch die hautspezifische Überexpression von *Gli1* und *Gli2* führt in Mäusen zur Entstehung von Hauttumoren mit BCC Merkmalen. Das am Besten charakterisierte Tumormodell für eine mutierte Komponente des Hedgehog-Signalwegs ist die *Ptch1*-Knockout-Maus, bei der das *Ptch1*-Gen durch homologe Rekombination inaktiviert wurde. Während homozygot deletierte *Ptch1*-Mäuse am Embryonaltag 9.0 aufgrund schwerwiegender Entwicklungsstörungen wie Neuralrohrdefekte und Herzfehlbildungen *in utero* absterben, zeigen heterozygote *Ptch1*-Knockout-Mäuse einen dem humanen NBCCS vergleichbaren Phänotyp in Form von Großwuchs, Polydaktylie, Rippenanomalien und Zysten. Darüber hinaus entwickeln diese Tiere je

nach genetischem Hintergrund spontan MB oder RMS, als auch BCC nach UV-Bestrahlung.

### Ist *Patched* ein klassisches Tumorsuppressorgen?

Schon kurz nach der Erstbeschreibung von *PTCH1*-Mutationen bei Krebserkrankungen des Menschen wurde für das *PTCH1*-Gen eine Funktion als Tumorsuppressorgen postuliert. In der *Ptch1* heterozygoten Maus konnten wir jedoch zeigen, dass das *Ptch1*-Wildtyp-Allel in Tumorzellen von RMS erhalten und darüber hinaus intakt ist. Diese Feststellung beruht auf folgenden Ergebnissen: Zum einen konnte ein Verlust des Wildtyp-Allels auf DNA-Ebene mittels LOH-Analyse ausgeschlossen werden, zum anderen konnten Transkripte des Wildtyp-Allels nachgewiesen werden, die innerhalb der kodierenden Sequenz keine inaktivierenden Mutationen aufwiesen. Ein entsprechendes Ergebnis wurde bereits für murine MB beschrieben, einem weiteren häufig bei *Ptch1* heterozygoten Mäusen auftretenden Tumortyp. Demnach schienen für *Ptch1* die Kriterien eines klassischen Tumorsuppressorgens in der Maus nicht erfüllt zu sein. Die Analyse der Expression des *Ptch1*-Gens in RMS *Ptch1* heterozygoter Mäuse deutete jedoch auf einen möglichen alternativen Mechanismus hin. Zunächst war festzustellen, dass die *Ptch1*-Expression in den Tumoren fast ausschließlich durch Transkripte des mutierten Allels hervorgerufen wurde. Darüber hinaus konnten im Normalgewebe Transkripte des Wildtyp-Allels als auch des mutierten Allels in vergleichbaren Mengen nachgewiesen werden. Nimmt man eine vergleichbare Stabilität der beiden Transkripte an, konnte dies entweder durch eine Unterdrückung des Wildtyp-Allels oder durch eine gesteigerte Transkription des mutierten Allels zustande gekommen sein. Mittlerweile konnte von uns ersterer Mechanismus bestätigt werden. Diese Repression des *Ptch1*-Wildtyp-Allels könnte durch ein sog. epigenetisches „Silencing“ erklärt werden, wobei es zu einer allelspezifischen Methylierung der CpG-Inseln in den Promotorregionen der entsprechenden Gene kommt. Erste Hinweise auf die Rich-

tigkeit dieser Hypothese kommen aus einer *in vitro*-Studie, in der durch Gabe des DNA-Demethylierungsmittels 5-Azacytidin ein Anstieg der *Ptch1*-Expression in Zelllinien aus MB *Ptch1*-heterozygoter Mäuse erreicht werden konnte. Anhand der angeführten Arbeiten lässt sich bisher noch kein abschließendes Urteil darüber fällen, ob *Ptch1* als klassisches Tumorsuppressorgen angesehen werden kann oder ob alternativ hierzu eine *Ptch1*-Haploinsuffizienz für die Entstehung von RMS in der Maus ausreichend ist. Könnte für das Tumorsuppressorgen *Ptch1* eine epigenetische Inaktivierung bestätigt werden, so hätte dies durch die Interventionsmöglichkeit dieses molekularen Mechanismus mittels 5-Azacytidin eine hohe klinische Relevanz. Die Reaktivierung von *PTCH1* könnte somit die Entstehung *PTCH1*-assoziierter Tumoren des Menschen verhindern.

### Zur Bedeutung der IGF2-Signalkaskade in *Ptch1*-assozierten Tumoren

Der Insulin-ähnliche Wachstumsfaktor IGF2 wird in einer Vielzahl humaner Tumoren und transformierter Zelllinien stark exprimiert und spielt eine entscheidende Rolle bei der Stimulierung der Zellproliferation als auch der Verhinderung der Apoptose. In humanen embryonalen RMS kommt es häufig durch einen sogenannten *loss of imprinting* (LOI) des maternalen Allels zur biallelischen Expression des *IGF2*-Gens und somit zur Überexpression. Auch RMS des *Ptch1*-Mausmodells weisen eine starke *Igf2*-Überexpression auf, wobei der zugrunde liegende Mechanismus dieser aberranten Expression weitestgehend unverstanden ist. In unseren Arbeiten konnten wir zeigen, dass die *Igf2*-Überexpression in diesen Tumoren weder durch LOI noch durch uniparentale Disomie oder Inaktivierung von H19 verursacht wird. Auch eine DNA-Amplifikation sowie eine Polyploidisierung als Ursache der Überexpression konnten ausgeschlossen werden. Diese Ergebnisse deuteten auf eine direkte Regulierung des *Igf2*-Gens durch den aktivierten Hedgehog-Signalweg hin. Diese Hypothese konnte durch eine Expressionsanalyse an *Ptch1*-mutanten Embryonen er-

härtert werden, deren Zellen in Abhängigkeit vom *Ptch1*-Status (Wildtyp, heterozygot oder homozygot deletiert) eine zunehmende Aktivierung der Hedgehog-Signalkaskade aufwiesen und dementsprechend eine zunehmende *Igf2*-Expression zeigten. Interessanterweise weisen die regulatorischen Einheiten des *Igf2*-Gens der Maus DNA-Bindungsstellen für den Transkriptionsfaktor Gli1 auf. Eine direkte Interaktion zwischen Gli1 und den entsprechenden Sequenzen des *Igf2*-Lokus wird derzeit untersucht. Weiterhin konnten wir zeigen, dass *Igf2* unerlässlich für die Tumorentstehung in *Ptch1*-heterozygoten Mäusen ist. Durch eine Einkreuzung auf einen *Igf2*-defizienten Hintergrund konnte die Entwicklung von Tumoren in *Ptch1*-heterozygoten Mäusen verhindert werden. Aus diesen Daten lässt sich ableiten, dass die Inhibierung des *Igf2*-Signalwegs ein aussichtsreicher Ansatzpunkt für therapeutische Ansätze darstellt.

### Identifizierung neuer Zielgene der Hedgehog-Signalkaskade

Eine geeignete Methode zur Identifizierung von Kandidatengenen des aktivierten Hedgehog-Signalwegs stellt die Mikroarray-Technologie dar. Hierbei kann durch Applikation von RNA-Proben aus Tumorgewebe auf spezielle genabbildende Chips die Expression einer Vielzahl von Genen in nur einem Experiment untersucht werden. Durch die Generierung eigener cDNA-Mikroarrays, die 1000 Gene der Bereiche Signaltransduktion, Zellzyklus und Krebs beinhalteten, konnten von uns bei RMS und MB *Ptch1*-heterozygoter Mäuse zahlreiche Kandidatengene identifiziert werden, die im Vergleich zu den entsprechenden Normalgeweben eine gesteigerte Expression in den Tumoren zeigten. Ein Gen, das in beiden untersuchten *Ptch1*-assozierten Tumorarten eine starke Überexpression zeigte, war das *Gadd45a*-Gen. Die Expression dieses Gens wird durch eine Vielzahl verschiedener Stimuli wie Stress, Hypoxie, ionisierende und UV-Strahlung als auch genotoxische Wirkstoffe induziert und bewirkt den Proliferationsarrest sowie die Apoptose der Zellen, meist aufgrund einer Aktivierung des Tumorsuppressors *p53*. Ob-

gleich in MB *Ptch1*-heterozygoter Mäuse eine starke *p53*-Expression gefunden wurde, wiesen die hohen *Gadd45a*-Expressionslevel in *Ptch1*-defizienten Embryonen und in Shh-stimulierten embryonalen Mausfibroblasten jedoch auf eine direkte Regulation des *Gadd45a*-Gens durch den Shh Signalweg hin. Ein möglicher wachstumshemmender Effekt durch *Gadd45a* spiegelt sich auch im histologischen Bild der murinen RMS wider, die durch gut differenzierte myogene Zellen und eine geringe Proliferationsrate gekennzeichnet sind. Somit scheint *Gadd45a* als ein Zielgen des Shh-Signalwegs für das tumorbiologische Verhalten von RMS und MB verantwortlich zu sein. Ein weiteres Gen unseres Kandidatengenscreens kodiert für den *forkhead box*-Transkriptionsfaktor *Foxf1*. Mehrere Studien legten die Vermutung nahe, dass dieser Transkriptionsfaktor die gewebsspezifische Vermittlung von Signalen des Shh-Signaltransduktionswegs bei der Lungenentwicklung übernimmt. Wir selbst konnten zeigen, dass *Foxf1* in *Ptch1*-assoziierten RMS der Maus im Vergleich zu normalem Muskelgewebe stark überexprimiert vorlag. Erste Versuche mit einer humanen RMS-Zelllinie sowie BCC, die einen pathologisch aktivierten Shh-Signaltransduktionsweg aufwiesen, zeigten ebenfalls eine stark erhöhte *FOXF1*- als auch *GLI1*-Expression. Diese Ergebnisse deuten auf eine transkriptionelle Aktivierung des *FOXF1*-Gens durch die Shh-Signalkaskade unterhalb von *GLI1* hin. Weiterhin konnten wir für *Ptch1*-assoziierte RMS der Maus die Hypothese aufstellen, dass die Tumorentwicklung durch die Fähigkeit der Tumorzellen, dem programmierten Zelltod zu widerstehen, verursacht wird. Diese Aussage beruhte mitunter auf der Beobachtung, dass das anti-apoptotisch wirkende Protein *Bcl2* in hohem Maße in den Tumorzellen exprimiert wird. Ein entsprechendes Ergebnis wurde bereits für humane BCC beschrieben. Auch humane Keratinozyten zeigen eine erhöhte *BCL2*-Expression, die durch die Verhinderung der Apoptose zum malignen Phänotyp beiträgt. Diese Ergebnisse dokumentieren eindrucksvoll das onkogene Potential des anti-apoptotischen Proteins *Bcl2*.

Da in einer aktuellen Studie eine direkte transkriptionelle Regulierung des *Bcl2*-Gens durch *Gli1* und *Gli3* nachgewiesen werden konnte, kann für *Bcl2* eine Funktion als Mediator der Shh-induzierten Tumorentstehung postuliert werden, die auf einer verminderten Apoptose beruht.

#### **Erstellung einer molekularen Taxonomie für Rhabdomyosarkome**

In den letzten Jahren wurde mehrfach die Erstellung von sogenannten Expressionsprofilen mittels Mikroarrays für eine molekulare Typisierung humaner Tumoren herangezogen, um eine distinkte Tumorklassifizierung vornehmen zu können, die durch traditionelle histopathologische Methoden nicht erreicht werden kann. Die Hoffnung, klinische Entscheidungen und Strategien im Hinblick auf eine Behandlung von Krebspatienten entscheidend zu verbessern, wird durch das enorme Potential dieser Technologie genährt. Um charakteristische molekulare Signaturen prognostisch unterschiedlicher RMS-Subtypen untersuchen zu können, wurden Tumoren aus *Ptch1*- und *p53*-heterozygoten Mäusen auf transkriptioneller Ebene mittels Mikroarrays analysiert. Diese Tumoren unterschieden sich erheblich in ihrer Inzidenz, ihrem zeitlichen Auftreten, ihrem Differenzierungsgrad sowie ihrem Proliferationsverhalten. Beiden RMS-Subtypen gemeinsam war das Vorhandensein von RMS-Markern wie *Desmin* und *Bcl2* sowie das Auftreten der Tumoren im Rumpf und in den Extremitäten der Tiere. Interessanterweise zeigten beide murinen RMS-Subtypen extreme Unterschiede in ihren Expressionsprofilen, wobei die spezifische Signatur der Subtypen wie folgt zusammengefasst werden kann:

- (i) RMS *Ptch1*-heterozygoter Mäuse zeigten einen hohen Transkriptlevel an bekannten myogenen Differenzierungsmarkern;
- (ii) *p53*-abhängige RMS zeigten eine stärkere Expression an Zellzyklus-abhängigen Genen;
- (iii) Gene des aktivierten Hedgehog-Signalwegs wurden stark in RMS heterozygoter *Ptch1*-Mäuse exprimiert.

Obgleich entsprechende Expressionsprofile in den spezifischen Formen humaner RMS noch untersucht werden müssen, ließe sich anhand der Ergebnisse folgende molekulare Taxonomie für RMS ableiten:

- i) Der hohe Differenzierungsgrad *Ptch1*-assoziiierter RMS, eine die Normalmuskulatur widerspiegelnde Histologie, die Expression myogener Differenzierungsmarker, das frühe Auftreten der Tumorerkrankung sowie die starke *Igf2*-Überexpression sprechen für eine Assoziation mit dem humanen Subtyp des embryonalen RMS.
- ii) Der weniger gut differenzierte, *p53*-assoziierte, klein- und blauzellige Phänotyp, mit einer hohen Expression an Zellzyklus-assoziierten Genen und dem Auftreten im Erwachsenenalter spiegelt den humanen Subtyp des alveolären RMS wider.

#### **Relevanz der Hedgehog-Signalkaskade in humanen Rhabdomyosarkomen und ovariellen Dermoidzysten**

Wie bereits beschrieben, kann der Verlust eines *Ptch1*-Allels in entsprechenden Knockout-Mäusen neben BCC und MB auch zur Entwicklung von RMS führen. Dies ist in besonderem Maße interessant, da für das NBCCS in seltenen Fällen das Auftreten von myogenen Tumoren beschrieben wurde. Aus diesem Grund stellte sich die Frage nach der Relevanz von *PTCH1*-Mutationen in humanen RMS. Unsere Analyse humaner RMS zeigte jedoch keine *PTCH1*-Mutationen für diesen Tumortyp. Jedoch belegt eine neuere Studie die Amplifikation und subsequente Überexpression des *GLI1*-Gens in über der Hälfte aller untersuchten embryonalen und alveolären RMS. Unter Berücksichtigung der oben diskutierten Aktivierung des *Igf2*-Signalwegs durch *Gli1* könnte eine pathologische Aktivierung des Hedgehog-Signalwegs als Ursache für die Entstehung derjenigen RMS angenommen werden, die eine gesteigerte *IGF2*-Expression aufweisen. Ein weiteres Charakteristikum des NBCCS ist das gehäufte Auftreten von odontogenen Keratozysten (OKC). Mittlerweile konnten für syndromale OKC als auch für sporadi-



sche OKC und follikuläre Zysten, die beide nicht mit dem NBCCS assoziiert werden, eine Verbindung mit dem aktivierten Hedgehog-Signalweg hergestellt werden. Für eine weitere Zystenart, die ovarielle Dermoidzyste, konnten wir zwar in 20% aller Fälle ein LOH am *PTCH1*-Lokus nachweisen, jedoch zeigte eine anschließende Mutationsanalyse des *PTCH1*-Gens sowie die Erstellung eines Expressionsprofils für Zielgene des Hedgehog-Signalwegs mittels cDNA-Mikroarrays keine Assoziation des Hedgehog-Signalwegs mit dieser Zystenart. Daher ist es fraglich, ob dem Hedgehog-Signalweg eine bedeutende Rolle bei der Entstehung nichtsyndromaler Zysten beigemessen werden kann.

**Ausblick**

Eine klinische Relevanz der Beteiligung der Hedgehog-Signalkaskade an der Entstehung einer stets wachsenden Zahl humaner Krebserkrankungen erwächst durch neuere Studien in Mäusen, in denen das Wachstum verschiedener Hedgehog-assoziiierter Tumoren durch die Gabe

des für den Signalweg spezifischen Inhibitors Cyclopamin vermindert werden konnte. Der Inhibitor wirkt dabei direkt auf das im Rezeptorkomplex enthaltene Smo Protein, sodass sowohl Liganden- als auch Rezeptor-assoziierte Tumoren gezielt angegangen werden können. Diese Intervention stellt somit einen aussichtsreichen therapeutischen Ansatz zur Behandlung Hedgehog-assoziiierter Krebserkrankungen dar.

**Literatur**

Kappler R., Bauer R., Calzada-Wack J., Rosemann M., Hemmerlein B., Hahn H. (2004) Profiling the molecular difference between Patched- and p53-dependent rhabdomyosarcoma. *Oncogene* 23, 8785-8795

Levanat S., Kappler R., Hemmerlein B., Döring P., Musani V., Komar A., Oreskovic S., Hahn H. (2004) Analysis of the PTCH1 signaling pathway in ovarian dermoids. *Int. J. Mol. Med.* 14, 793-799

Kappler R., Heß I., Schlegel J., Hahn H. (2004) Transcriptional up-regulation of Gadd45a in Patched-associated medulloblastoma. *Int. J. Oncol.* 25: 113-120

Kappler R., Calzada-Wack J., Schnitzbauer U., Koleva M., Herwig A., Piontek G., Graedler F., Adamski J., Heinzmann U., Schlegel J., Hem-

merlein B., Quintanilla-Martinez L., Hahn H. (2003) Molecular characterisation of Patched-associated rhabdomyosarcoma. *J. Pathol.* 200: 348-356

Calzada-Wack J., Kappler R., Schnitzbauer U., Richter T., Nathrath M., Rosemann M., Wagner S.N., Hein R., Hahn H. (2002) Unbalanced overexpression of the mutant allele in murine Patched mutants. *Carcinogenesis* 23: 727-733

Calzada-Wack J., Schnitzbauer U., Walch A., Wurster K.-H., Kappler R., Nathrath M., Hahn H. (2002) Analysis of the PTCH coding region in human rhabdomyosarcoma. *Hum. Mutat.* 20: 233-234

Hahn H., Wojnowski L., Specht K., Kappler R., Calzada-Wack J., Potter D., Zimmer A., Müller U., Samson E., Quintanilla-Martinez L., Zimmer A. (2000) Patched target Igf2 is indispensable for the formation of medulloblastoma and rhabdomyosarcoma. *J. Biol. Chem.* 275: 28341-28344

**Korrespondenzadresse**

PD Dr. Roland Kappler  
 Kinderchirurgische Forschungslaboratorien  
 Dr. von Haunersches Kinderspital  
 Ludwig-Maximilians-Universität München  
 Lindwurmstr. 2a  
 80337 München  
 Tel. 089-5160-7810  
 Fax 089-5160-4726  
 Roland.Kappler@med.uni-muenchen.de

