Aus der Abteilung Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie (Prof. Dr. med. Dr. med. dent. H. Schliephake) im Zentrum Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Regulation von Connexinen als Gap-Junction-Strukturprotein in der sequenziellen Karzinogenese des DMBA-induzierten Wangentaschenkarzinoms des Hamsters

> INAUGURAL – DISSERTATION zur Erlangung des Doktorgrades der Medizinischen Fakultät der Georg-August-Universität zu Göttingen

> > vorgelegt von Rebekka Simone Hillebrand aus Rinteln

> > > Göttingen 2013

Dekan:	Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer
Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Dr. med. dent. FJ. Kramer
Berichterstatter/-in:	PrivDoz. Dr. med. C. S. Seitz
Berichterstatter/-in:	Prof. Dr. med. dent. R. F. Mausberg
Tag der mündlichen Prüfung:	07.08.2013

Inhaltsverzeichnis

1. Einleit	ung 1
1.1. Ka	rzinome der Mundhöhle 1
1.1.1.	Epidemiologie1
1.1.2.	Ätiologie und Risikofaktoren1
1.1.3.	Diagnostik und Klassifikation2
1.1.4.	Therapie und Prognose4
1.2. Ka	rzinogenese5
1.2.1.	Krebsentstehung5
1.2.2.	Invasion und Metastasierung8
1.3. Co	nnexine und GJIC 10
1.3.1.	Gap-Junctions10
1.3.2.	Connexine11
1.4. Co	nnexine und Karzinogenese 13
1.4.1.	Connexine und Karzinogenese13
1.4.2.	Connexin 26, 43, 45 und das orale Plattenepithelkarzinom19
1.5. Fra	gestellung
2. Materi	al und Methoden 21
2.1. Tie	rversuch21
2.1.1.	Versuchstiere
2.1.2.	Tiermodell21
2.1.3.	Probenentnahme und Probenlagerung23
2.1.4.	Tierversuchsantrag23
2.2. Ma	terial
2.2.1.	Geräte23
2.2.2.	Enzyme/Kits24
2.2.3.	Lösungen24

	2.2	.4.	Nukleotidquellen	.24
	2.3.	Kar	zinogenitätsprüfung	24
	2.3	.1.	Erfassung und Beurteilung des karzinogenen Effektes	.24
	2.3	.2.	Kontrolluntersuchung der kontralateralen Wangentaschen	.25
	2.4.	RN	A-Isolierung und cDNA-Generierung	25
	2.4	.1.	Gewebehomogenisierung	.25
	2.4	.2.	Isolation	.26
	2.4	.3.	Quantifizierung und Qualitätskontrolle	.26
	2.4	.4.	Reverse Transkription	.26
	2.5.	Rea	al-time PCR	27
	2.5	.1.	Primer	.27
	2.5	.2.	Schmelztemperatur	.27
	2.5	.3.	Real-time PCR	.28
	2.5	.4.	Auswertung der real-time PCR	.30
3	. Erę	gebr	nisse	32
	3.1.	Ma	kroskopie	32
	3.2.	His	tologie	33
	3.3.	Infla	ammation	35
	3.4.	Kor	relation der Connexinexpression mit dem histologischen Grading	36
	3.5.	Kor	relation der Connexinexpression mit dem Behandlungsregime und der	
		Beł	nandlungsdauer	37
4	. Dis	skus	sion	40
	4.1.	Tie	rmodell	40
	4.2.	Qua	antitative real-time PCR	42
	4.2	.1.	Nachweis auf mRNA-Ebene	42
	4.2	.2.	Detektion und Quantifizierung der DNA im PCR-Produkt	.42
	4.2	.3.	Spezifitätsprüfung von SYBR-Green durch Schmelzkurzenanalyse und Gelelektrophorese	43

	4.2.4.	Einschränkungen44
4	.3. Ma	akroskopie, Histologie und Inflammation 44
4	.4. Co	onnexinexpressionsmuster 45
	4.4.1.	Korrelation der Expression mit Grading, Behandlungsregimen und Behandlungsdauer46
	4.4.2.	Connexin 2647
	4.4.3.	Connexin 4348
	4.4.4.	Connexin 4550
5.	Zusar	nmenfassung
6.	Abkü	r zungen
7.	Litera	turverzeichnis
8.	Anha	ng64
8	.1. Ar	hang A: Versuchstiere
	8.1.1.	Regime A: Opferung nach 10-wöchiger Behandlung am 17.08.200964
	8.1.2.	Regime B: Opferung nach 14-wöchiger Behandlung am 14.09.200965
	8.1.3.	Regime C: Opferung nach 14-wöchiger Behandlung mit anschließendem 5- wöchigem Tumorwachstum am 19.10.200966
8	.2. Ar	hang B: Qualitätskontrolle der zu analysierenden RNA
	8.2.1.	Regime A68
	8.2.2.	Regime B71
	8.2.3.	Regime C74
8	.3. Ar	hang C: Etablierung der Primer78

1. Einleitung

1.1. Karzinome der Mundhöhle

1.1.1. Epidemiologie

Bei den in der Mundhöhle auftretenden malignen Erkrankungen handelt es sich in ihrer überwiegenden Mehrzahl um orale Plattenepithelkarzinome (RIEDE und SCHAEFER 1999). Dabei sind Männer häufiger betroffen als Frauen. Unter ihnen stellt das orale Plattenepithelkarzinom mit 141.200 Neuerkrankungen im Jahr 1990 die achthäufigste maligne Tumorerkrankung dar. Ein Häufungsgipfel zeigt sich in der 7. Lebensdekade (GREENLEE et al. 2000).

Die Prävalenz des Mundhöhlenmalignoms weist große geographische Unterschiede auf. Vorherrschend ist diese Art von Krebserkrankung in Süd- und Westeuropa, Südasien, Südafrika, Australien und Neuseeland (PARKIN et al. 1999). In Entwicklungsländern ist das Mundhöhlenkarzinom unter den malignen Neoplasien überrepräsentiert. So ist es beispielsweise in Indien mit einem Anteil von 40% die häufigste Tumorentität (AHLUWALIA 2005). Die weltweit durchschnittliche Prävalenz beträgt hingegen lediglich 3% (RIEDE und SCHAEFER 1999).

1.1.2. Ätiologie und Risikofaktoren

Die geographischen Prävalenzunterschiede des Mundhöhlenkarzinoms sind meist mit regional typischen Lebensgewohnheiten in Verbindung zu bringen. Nikotin- und Alkoholabusus sind in den Industrienationen nachgewiesene Risikofaktoren, wobei Alkohol laut einigen Autoren das potentere Karzinogen darstellt (TALAMINI et al. 1990, WYNDER et al. 1957). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass der simultane Missbrauch beider Noxen zu einer 13-fachen Potenzierung des Erkrankungsrisikos führt (BLOT et al. 1988, McCOY und WYNDER 1979, CASTELLSAGUE et al. 2004). Zusätzlich gilt mangelnde Mundhygiene als Risikofaktor (ROSENQUIST et al. 2005). Für Erkrankungsfälle, die nicht auf eine Noxenexposition zurückgeführt werden können, wird eine Infektion mit dem humanen Papillomavirus (HPV, Subtypen 16 und 18) als ursächlich diskutiert. Sie scheint vor allem Karzinome des lymphatischen Gewebes, insbesondere der Gaumen- sowie Zungentonsillen, zu induzieren (FAKHRY und GILLISON 2006, RITCHIE et al. 2003).

Malignome können de novo aus gesunder Mundschleimhaut entstehen. Meist jedoch gehen ihnen klinisch Schleimhautveränderungen voraus, die je nach Entartungsrisiko als fakultative oder als obligate Präkanzerose bezeichnet und entsprechend ihrer histologischen Dysplasiegrade nach WHO in drei "squamöse intraepitheliale Neoplasiegrade" (SIN) eingeteilt werden (GALE et al. 2005).

Die klinisch am häufigsten beobachtete fakultative Präkanzerose ist die Leukoplakie. Sie ist definiert als weißes, nicht abwischbares Schleimhautareal und imponiert histologisch als Para- oder Hyperkeratose. Diese sind bei Rauchern sechsmal häufiger vorzufinden als bei Nichtrauchern, können aber unter Nikotin- und auch Alkoholkarenz abheilen (JONES 1994, SCHANTZ und OSTROFF 1997). Als eine obligate Präkanzerose gilt die Erythroplasie Queyrat, eine Sonderform des oralen Carcinoma in situ (REICHART und PHILIPSEN 2005).

1.1.3. Diagnostik und Klassifikation

In seinem initialen Verlauf verursacht das Plattenepithelkarzinom keine, bis latente Beschwerden. In fortschreitenden Stadien kann es zu unspezifischen Symptomen kommen, wie Gewichtsverlust, Leistungsabfall, Schmerzen, Mundschleimhautulzerationen und einen ausgeprägten Foetor ex ore. Durch Verdrängung anatomisch umliegender Strukturen sind Sprechbehinderungen und Probleme bei der Flüssigkeits- und Nahrungsaufnahme möglich.

Bei Verdacht auf ein Mundhöhlenkarzinom ist ein schneller Therapiebeginn von entscheidendem Vorteil, zumal die Krankheit häufig erst in fortgeschrittenen Stadien diagnostiziert wird (GOY et al. 2009) und eine lymphogene Streuung vergleichsweise früh erfolgt (KLIGERMAN et al. 1994). So sind beispielsweise bei 50% aller Erstdiagnosen Metastasen in den regionären Halslymphknoten nachweisbar.

Eine endgültige Verdachtsbestätigung ermöglicht nur eine Probeexzision mit pathologischer Begutachtung.

Nach Diagnosestellung ist ein Staging der Tumorerkrankung obligat, da sich hiernach Therapieverfahren orientieren und prognostische Aussagen treffen lassen. Zur Bestimmung der lokalen Ausdehnung kommen bildgebende Verfahren, wie Computertomographie, Sonographie oder Magnetresonanztomographie (MRT), zur Anwendung, wobei eine Ausbreitung auf die lokoregionären Lymphabflussgebiete meist sonographisch untersucht wird. Zum Nachweis möglicher Fernmetastasen, welche bevorzugt in Lunge, Leber, mediastinale und abdominale Lymphknoten, sowie Skelett streuen (KOTWALL et al. 1987), dienen ebenfalls bildgebende Verfahren, wie Röntgen-Thorax, MRT, Abdomensonographie und Skelettszintigraphie.

Mit der von der UICC (*Union internationale contre le cancer*) und dem AJCC (*American Joint committee on cancer*) eingeführten TNM-Klassifikation, welche die drei Hauptdimensionen Primärtumorausdehnung (T), lokoregionärer Lymphknotenbefall (N) sowie Fernmetastasen (M) beschreibt (WITTEKIND et al. 2002), lässt sich der fortschreitende Krankheitsverlauf jedes Patienten individuell erfassen und einordnen. Zahlreiche Nebendeterminanten, wie histologischer Differenzierungsgrad (Grading G), Lymphgefäß- und Veneninvasion (L, V), Residualtumor (R) oder Befundsicherheit (Certainty C) ergänzen die TNM-Einteilung.

Klassifikation des oralen Plattenepithelkarzinoms nach UICC und AJCC:

T Primärtumor

- Tx Keine Beurteilung möglich
- T0 Kein Primärtumor nachweisbar
- Tis Carcinoma in situ
- T1 Tumordurchmesser maximal 2 cm
- T2 Tumordurchmesser 2 bis 4 cm
- T3 Tumordurchmesser mindestens 4 cm
- T4aLippenkarzinom: Infiltration durch kortikalen Knochen in N. alveolaris inferior, in
Mundboden oder in Haut von Kinn oder Nase
Mundhöhlenkarzinom: Infiltration durch kortikalen Knochen in äußere
Zungenmuskulatur, Kieferhöhle oder Gesichtshaut
- T4b Infiltration in das Spatium masticatoricum, Processus pterygoideus oder Schädelbasis, Umschließen der A. carotis interna

N Lymphknotenbefall

- Nx Keine Beurteilung möglich
- N0 Keine regionalen Lymphknotenmetastasen
- N1 Solitäre Metastase in ipsilateralen Lymphknoten, maximal 3 cm Durchmesser
- N2a Solitäre Metastase in ipsilateralen Lymphknoten, 3 bis 6 cm Durchmesser
- N2b Multiple Metastasen in ipsilateralen Lymphknoten, maximal 6 cm Durchmesser
- N2c Metastase(n) in kontralateralem/n Lymphknoten, maximal 6 cm Durchmesser
- N3 Zervikale Lymphknotenmetastase mit Durchmesser über 6 cm

M <u>Fernmetastasen</u>

- Mx Keine Beurteilung möglich
- M0 Keine Fernmetastasen nachweisbar
- M1 Fernmetastasen nachweisbar

Um das TNM-Klassifikationssystem des oralen Plattenepithelkarzinoms mit seinen 168 denkbaren Kombinationsmöglichkeiten übersichtlicher zu gestalten, werden fünf definierte Hauptstadien mit unterschiedlichen TNM-Parametern, aber vergleichbarer klinischer Krankheitsprogression zusammengefasst.

Stadium	т	Ν	Μ
0	is	0	0
I	1	0	0
II	2	0	0
111	1-2	1	0
	3	0-1	0
IVa	1-3	2	0
	4a	0-2	0
IVb	0-4b	3	0
	4b	0-3	0
IVc	0-4b	0-3	1

Stadieneinteilung oraler Plattenepithelkarzinome nach UICC und AJCC:

1.1.4. Therapie und Prognose

Der Therapieerfolg ist vor allem abhängig von Tumorstadium, chirurgischer Tumorresektabilität und bestehenden Komorbiditäten und setzt sich zusammen aus interdisziplinären und multimodalen Therapiekonzepten. Meist werden der Primarius und die regionalen Lymphknoten chirurgisch entfernt und adjuvant mit kombinierter Radiochemotherapie nachbehandelt. Fernmetastasen erfordern eine systemische Chemotherapie (FORASTIERE et al. 2006). Im Fall einer palliativen Therapieintention zur Verbesserung der Lebensqualität sind die chirurgische die Tumormassenreduktion, sowie Bestrahlung von Primärtumor und Lymphabflussgebieten häufig Mittel der Wahl (LIAO et al. 2006).

Der weitest gehende Funktionserhalt aller oraler Strukturen beziehungsweise ihre ausreichende Rekonstruktion spielen eine wichtige Rolle innerhalb der oft aggressiven Therapieregime, da die Funktionsfähigkeit der Kau- und Schluckorgane deutlich beeinträchtigt werden kann und so die Motivation der Patienten am gesellschaftlichen Leben teilzuhaben herabgesetzt ist (ROSENTHAL et al. 2006). Ein prognostisch wichtiger Faktor ist das Vorhandensein von Halslymphknotenmetastasen und deren Kapselüberschreitung (SNOW et al. 1982). Weiterhin können die Größe und Lokalisation des Primarius, dessen Resezierbarkeit (WOOLGAR et al. 1995), das Tumorstadium nach UICC/AJCC und die perineurale Invasion (PARSONS et al. 1997) von Bedeutung sein.

	1-Jahresüberleben	2-JÜR	5-JÜR
Insgesamt (n=123)	84%	69%	65%
Ohne LK-Metastasen	95%	86%	86%
Mit LK-Metastasen	71%	52%	44%
Tab. 1: 1-, 2-, 5-Jahresü	berlebensrate (JÜR) +/-	Lymphknotenmetastasen	(nach WOOLGAR et al.
1995).			

1.2. Karzinogenese

1.2.1. Krebsentstehung

Im Rahmen der komplexen Umwandlung einer gesunden Zelle in eine invasive, metastasierende Tumorzelle wird davon ausgegangen, dass diese Zelle durch eine Reihe somatischer Mutationen, teils in Verbindung mit erblicher Prädisposition, gegenüber allen anderen Zellen des Organismus einen entscheidenden Selektionsvorteil erlangt. Dafür müssen proliferative Signale aufrecht erhalten, Wachstumssuppressoren umgangen, Zelltod verhindert, replikative Immortalität ermöglicht, Angiogenese induziert und Invasion und Metastasierung aktiviert werden (HANAHAN und WEINBERG 2011). Als Resultat dieser malignen Transformation erwächst ein unkontrolliert proliferierender und sich invasiv ausbreitender Tumor.

Daraus ergibt sich für den Gesamtorganismus ein Selektionsnachteil. Diesem wirken Abwehrmechanismen entgegen, welche die letale Schädigung, zumindest vor Erreichen des reproduktiven Alters, verhindern. Solche sogenannten *Tumorsuppressoren* unterbinden die maligne Entartung einer Zelle. Allerdings stehen ihnen als Antagonisten *Onkogene* gegenüber, welche Initiation und Progression maligner Prozesse fördern (STRACHAN und READ 2005).

Es wird vermutet, dass Connexine die wechselseitigen Interaktionen zwischen Tumorsuppressor- und Onkogenen beeinflussen (MESNIL 2002, CRONIER et al. 2009). Auf die näheren Zusammenhänge soll im Verlauf dieser Arbeit eingegangen werden.

1.2.1.1. Onkogene

Onkogene codieren Proteine, die in gesunden Zellen in Form von inaktivierten Proto-Onkogenen die Zellproliferation und -differenzierung auf verschiedenen Wegen kontrollieren und steuern. Anhand dieser physiologischen Funktionen können fünf Gruppen unterschieden werden:

- sezernierte Wachstumsfaktoren (z. B. SIS, LIU et al. 2006),
- sarkolemmale Rezeptoren (z. B. ErbB2, DE BONO und ROWINSKY 2002, KALLIONIEMI et al. 1992),
- intrazelluläre Komponenten der Signaltransduktion (z. B. RAS, ABL, CHISSOE et al. 1995, LOWY und WILLUMSEN 1993),
- Transkriptionsfaktoren (z. B. MYC, EVAN und LITTLEWOOD 1993) und
- den Zellzyklus beeinflussende Komponenten (z. B. Cycline, MDM2, POMERANTZ et al. 1998).

Die Aktivierung eines Proto-Onkogens zum Onkogen geschieht durch Mutation. Bei einem dominant vererbten Proto-Onkogen reicht die Mutation eines Allels. Bei rezessiv vererbten Proto-Onkogenen bedarf es der Mutation beider Allele, um den Übergang in ein Onkogen zu gewährleisten. Diese Aktivierung kann von quantitativer oder qualitativer Natur sein. So bleibt entweder die Form des Produkts als solches erhalten und es steigt nur die Produktionsrate oder es entsteht ein geringfügig verändertes Produkt mit höherer Aktivität (STRACHAN und READ 2005).

Eine Möglichkeit der quantitativen Aktivierung ist die *Amplifikation*, durch die mehrfach Kopien von Onkogenen physiologischer Struktur entstehen. Beispiele sind das in Brustkrebs häufig amplifizierte ErbB2-Gen (KALLIONIEMI et al. 1992), das im Neuroblastom amplifizierte c-myc-Gen (SCHWAB et al. 1983) und das im Rhabdomyosarkom amplifizierte N-myc-Gen (DRIMAN et al. 1994). Die zusätzlichen Kopien können als kleine separate Chromosomen oder als Insertion innerhalb normaler Chromosomen auftreten (STRACHAN und READ 2005).

Durch *Punktmutation* kann ein Onkogen einen qualitativen Funktionsgewinn erfahren, wie am Beispiel der RAS-Proteinfamilie berichtet wird. RAS-Proteine sind an der Signaltransduktionskaskade von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren beteiligt. Die GTP-inaktivierende, intrinsische GTPase-Aktivität ist bei mutiertem RAS vermindert aktiv. Es resultiert eine verlängerte Signaltransduktion (LOWY und WILLUMSEN 1993). Mutationen dieser Art können bei ca. 30% aller Tumoren nachgewiesen werden (VAN DER WEYDEN und ADAMS 2007). Ein weiterer Proto-Onkogen-aktivierender Mechanismus stellt die Translokation von Genabschnitten dar. Dabei kann ein Proto-Onkogen in eine transkriptorisch aktivere Genregion transloziert werden. Dieser für hämatologische Tumoren und Sarkome nachgewiesene Mechanismus kann am Beispiel des Philadelphia-Chromosoms veranschaulicht werden. Durch die Fusion des ABL-Onkogens und des Bcr-Gens (breakpoint cluster region) entsteht eine konstitutionell aktive Tyrosinkinase, welche die vorherrschende Ursache chronisch myeloischer Leukämien ist (CHISSOE et al. 1995). Die Translokation in eine Chromatinregion mit aktiver Transkription ist beispielsweise beim Burkitt-Lymphom ätiologisch. Dabei kommt es nach Translokation in die Nähe eines in B-Zellen aktiv transkribierten Immunglobulin-Lokus zur Aktivierung des MYC-Onkogens. Die durch die Translokation fehlende stromaufwärts liegende Kontrollregion führt hier zu der nicht-physiologisch hohen Expressionsrate des MYC-Gens (SANCHEZ-GARCIA 1997).

1.2.1.2. Tumorsuppressorgene

Tumorsuppressorgene und deren Produkte inhibieren karzinogene Einflüsse. Werden sie aber durch eine bi-allele Mutation ausgeschaltet, kommt ihre Aktivität zum Erliegen. Diese Mutationen ermöglichen es der Tumorzelle, sich unbegrenzt zu teilen.

Das erste Tumorsuppressorgen wurde im Rahmen einer Analyse von familiären und sporadisch auftretenden Retinoblastomfällen entdeckt (KNUDSON 1971), für welche die bi-allele Deletion des Rb-Genes auf Chromosom 13 als Ursache beschrieben wird. Im Falle der hereditären Form ist die Mutation eines Allels bereits vererbt. Die sporadische Form setzt hingegen bei zwei gesunden Allelen eine homozygote Mutation voraus. Sie ist somit weitaus seltener (CAVENEE et al. 1983).

Auch kann eine Methylierung des Tumorsuppressorgen-Promotors dessen Funktionsverlust bewirken. In humanen oralen Plattenepithelkarzinomen führt die Methylierung vom p16/CDKN2-Gen-Promotor zu dessen verminderter Transkription (YAKUSHIJI et al. 2001). Im Falle der Connexine führt die Methylierung vom Cx43-Gen-Promotor zu einer verminderten Expression von Cx43-mRNA bis hin zur Cx43mRNA-Abwesenheit in kleinzelligen Lungenkarzinomen (CHEN JT et al. 2003).

Das Modell von Onkogenen und Tumorsuppressoren dient zur Veranschaulichung der initialen Phase der Karzinogenese. Der mehrstufige Weg einer physiologischen, somatischen Zelle zur unkontrolliert proliferierenden Tumorzelle und deren Disseminierung ist noch längst nicht als Ganzes verstanden und nachvollziehbar. Allgemein dass die Zelle gegenüber anerkannt ist. einzelne äußeren. wachstumshemmenden und wachstumsfördernden Signalen unabhängig werden muss. Weitere wichtige Voraussetzungen sind unbegrenzte Teilungsfähigkeit, die Umgehung der Apoptose, das Erlangen von Anschluss an die Blutbahn und die Fähigkeit zu metastasieren (HANAHAN und WEINBERG 2000). Hier können Connexine regulatorisch in die Initiation und Progression von Tumoren eingreifen (CRONIER et al. 2009). Unter 1.4 soll hierzu Bezug genommen werden.

1.2.2. Invasion und Metastasierung

Der Prozess der Metastasierung bedingt mehrere aufeinanderfolgende Vorgänge (LÖFFLER und PETRIDES 2006):

- die Loslösung der Tumorzelle aus dem Primärtumor,
- das Eindringen in die Lymph- bzw. Blutzirkulation,
- das Verlassen der Gefäßbahnen,
- das Eindringen in entfernt gelegene Gewebe zum Kolonisieren,
- Anschluss an das Gefäßsystem durch Angiogenese.

Voraussetzung hierfür sind genetische, Mutation hervorgerufene durch Veränderungen in den Tumorzellen, die Invasion und Metastasierung ermöglichen (LIOTTA und STETLER-STEVENSON 1991). Durch diese wird eine Kaskade von Prozessen initiiert, die die Wechselwirkung zwischen Tumorzelle und Wirt zur Folge binden beispielsweise die aus dem Tumorkonglomerat gelösten hat. So Malignomzellen über Oberflächenrezeptoren an Glykoproteine der Basallamina und der extrazellulären Matrix, wie Laminin, Typ-IV-Kollagen und Fibronectin (LÖFFLER und PETRIDES 2006). Um die Basalmembran und andere Barrieren zu überwinden und das benachbarte Gewebe zu infiltrieren, werden Proteasen wie Metallo-, Serinund Cysteinproteasen vermehrt sezerniert (LIOTTA und STETLER-STEVENSON 1990, PARISH et al. 1992).

Die Motilität, mit der sich die Tumorzellen frei im benachbarten Stroma bewegen können, wird durch Pseudopodien ermöglicht, die in Richtung der Migration an die Zelloberfläche gebracht und über autokrine Motilitätsfaktoren reguliert werden (LIOTTA et al. 1991). Weiterhin können migrierende Tumorzellen chemotaktisch von Mediatoren beeinflusst werden, die, wie beispielsweise der insulinähnliche Wachstumsfaktor (IGF) der Leber, von Stromazellen metastasentypischer Organe produziert werden (KOHN et al. 1990).

Für die Größenzunahme des Primärtumors und dessen Metastasen stellt die Neoangiogenese und so der Anschluss an das Gefäßsystem eine wichtige Voraussetzung dar. Bei einem Durchmesser von mehr als 2 mm kommt es im Hypoxie (BATTEGAY 1995). Infolgedessen Tumorgewebe zur werden angiogenesefördernde Zytokine, wie der transformierende-Wachstumsfaktor-ß (TGFβ), der Fibroblastin-Wachstumsfaktor (FGF) und Angiogenin, freigesetzt. Weiterhin kommt es über den Hypoxie-induzierten Faktor (HIF) zur Expression des vaskulärendothelialen Wachstumsfaktors (VEGF), der ebenso die Neovaskularisation stimuliert (MAZURE et al. 1997, RISAU 1990, DIAZ-FLORES et al. 1994). Für die neugebildeten Gefäßwände wird eine vermehrte Durchlässigkeit beschrieben, die den Einbruch in die Blutbahn und somit die Metastasierung erleichtert (ALBERTS et al. 2005).

Verschiedene, vereinfachende Modelle sollen zu einem besseren Verständnis der Tumorgenese verhelfen.

Das "klassische", biologische Dreistufenmodell beschreibt die maligne Transformation als Initiation, Promotion und Progression und somit die Phase der Mutation von Zellzyklus-regulierenden Genen, die Phase des unbegrenzten Wachstumsstimulus durch Mutation und die Phase der Tumorausdehnung (HANAHAN und WEINBERG 2000). Ein zweites Konzept beschreibt die drei histologischen Stufen des Primärtumors, invasiven Tumors und metastasierenden Tumors (CRONIER et al. 2009). Die TNM-Klassifikation (siehe oben) als drittes Konzept der Tumorgenese erfasst den Krankheitsverlauf unter klinischen Gesichtspunkten anhand der drei Hauptdimensionen Primärtumorausdehnung (T), lokoregionärer Lymphknotenbefall (N) sowie Fernmetastasen (M).

3-Stufen Modell	Initiation Promotion P	rogression \rightarrow	
CRONIER	Primärtumor	Invasiver Tumor	Metastasierender Tumor
TNM- Klassifikation	T _{is} , N ₀ , M ₀	T ₁ -T ₄ , N ₀ , M ₀	T_x , N_{1-3} oder T_x , M_1
Abb. 1: Übersicht der 3 Modelle zur Karzinogenese (BRODMANN 2012)			

Zur Veranschaulichung der Rolle von Connexinen innerhalb karzinogener Prozesse wird im Folgenden das Modell von Cronier verwendet.

1.3. Connexine und GJIC

1.3.1. Gap-Junctions

Gap-Junctions sind kanalbildende, aus Connexinen bestehende Proteinkomplexe der Zellmembran, die zwischen den Innenräumen angrenzender Zellen als Transportwege von einheitlich etwa 3,5 nm Durchmesser dienen und als Hauptaufgabe die Gap-Junction-vermittelte interzelluläre Kommunikation (GJIC) ermöglichen (STRYER et al. 2007). Sie kommen in nahezu allen Geweben vor (GOODENOUGH et al. 1996, SAEZ et al. 2003) und sind als interzytoplasmatische Kanäle an interzellulärer Kommunikation, Metabolismus, Zellentwicklung und Zelldifferenzierung beteiligt (LAIRD 2006). Sie können in Form von Plagues imponieren, die aus vielen, in der Zellmembran nebeneinander angeordneten Gap-Junctions bestehen (CASPAR et al. 1977). Im Elektronenmikroskop sind diese Bereiche optisch vergleichbar mit Bienenwaben von etwa 8,5 nm Durchmesser (CASPAR et al. 1977). Als sehr dynamische Strukturen befinden sich Gap-Junction-Plaques in einer ständigen Umstrukturierung und einem ständigen Auf- und Abbau. Die Halbwertzeit ihrer Grundbausteine, den Connexonen und Connexinen (siehe unten), beträgt nur wenige Stunden (FALLON und GOODENOUGH 1981).

Benachbarte Zellen tauschen über die zentrale Öffnung von 2 nm Durchmesser kleine, polare Moleküle von bis zu circa 1 kDa Molekulargewicht und 1,5 nm Moleküldurchmesser aus (BENNETT und VERSELIS 1992, SOSINSKY und NICHOLSON 2005). Dieser Molekültransport ermöglicht Zellverbänden die Kommunikation über Spannungsgradienten oder den Austausch von Nährstoffen und Signalmolekülen für Metabolismus, Zellteilung und –wachstum (LAIRD 2006). Über Gap-Junctions können anorganische Ionen, die meisten Metaboliten, wie Zucker, Aminosäuren, Vitamine und Nukleotide, und interzelluläre Mediatoren, wie zyklisches AMP und Inositol-Triphosphat, ausgetauscht werden. Dagegen sind Proteine, Nukleinsäuren und Polysaccharide zu groß, um die Kanäle zu passieren (ALBERTS et al. 2005).

An den Zellen *elektrisch erregbarer Gewebe*, wie dem Herzmuskel, werden zur synchronisierten und verzögerungsfreien Weiterleitung von Aktionspotentialen Spannungsgradienten über Gap-Junctions aufgebaut (BERNSTEIN und MORLEY 2006). In den glatten Muskelzellen des Darms sind sie an der Koordination der Darmperistaltik beteiligt (HUIZINGA et al. 1992), wie auch an der Kontraktion des

Myometriums, wobei gezeigt werden konnte, dass die Zahl der Gap-Junctions zum Zeitpunkt der Geburt stark zunimmt (SIMS et al. 1982).

Im Sinne der nicht-gradientenabhängigen Kommunikation können Gap-Junctions in *elektrisch nicht-erregbaren Geweben* ebenso Zellen koordinieren. In der Leber beispielsweise können individuelle Zellen ihre Aktivität auf benachbarte Zellen abstimmen (McCUSKEY 2004). Die physiologische Reifung ovarialer Follikel ist von der Gap-Junction-vermittelten interzellulären Kommunikation abhängig (GILULA et al. 1978). Eine Mutation innerhalb des kanalbildenden Proteins Connexin 37 bewirkt eine Entkopplung der Follikel- und Granulosazellen und führt zu Infertilität (SIMON et al. 1997). Mutationen der Gap-Junction-bildenden Strukturproteine können Ursache einer Reihe von Erkrankungen darstellen. Ein Beispiel ist die Mutation von Connexin 26, die zum Untergang von Zellen des Corti-Organs führt und die häufigste aller genetischen Ursachen für kongenitale Taubheit ist (COHEN-SALMON et al. 2002). Neben dem Aufbau von Spannungsgradienten und dem Stoffaustausch verfügen

Gap-Junctions über einen Mechanismus, der dem Selbstschutz von Zellverbänden dient. Bei Zellschädigung werden über den sinkenden pH-Wert alle Gap-Junctions verschlossen. So isoliert sich die jeweilige gestörte Zelle, um ein Ausbreiten auf die umliegenden Zellen zu verhindern. Durch Einströmen von Kalzium wird ein Apoptosereiz ausgelöst und vernichtet die betroffene Zelle (BENNETT et al. 1982, LAIRD 2006).

1.3.2. Connexine

Connexine sind Transmembranproteine, die aneinander gekoppelt die interzytoplasmatischen Kanäle der zuvor beschriebenen Gap-Junctions bilden oder auch solitär im Zytosol vorliegen können (STRYER et al. 2007). Das menschliche Genom codiert 21 unterschiedliche Connexine, wobei sich die Nummerierung auf ihr Gewicht in Kilodalton (kDa) bezieht (SOHL und WILLECKE 2004). Gewebespezifisch werden ein oder mehrere Connexin-Subtypen kombiniert exprimiert (LAIRD 2006). Die Connexine aller Subtypen bestehen aus vier membrandurchspannenden Helices. Drei dieser Domänen sind hydrophob. Die amphiphile vierte Domäne bildet mit ihrem hydrophilen Anteil und den hydrophilen Anteilen fünf weiterer Connexine den passierbaren Teil des Kanals (KUMAR und GILULA 1996). Das C-terminale und das

N-terminale Ende ragen ins Zytosol, wobei das C-terminale Ende Interaktionen mit

Proteinen zytosolischen eingehen kann (HERTZBERG et al. 1988, DANG et al. 2003, ZHANG YW et al. 2003). Zwei der drei Schleifen des Transmembranproteins befinden sich auf der extrazellulären der Zellmembran Seite und interagieren mit Connexinen benachbarter Zellen (KUMAR und GILULA 1996).

Sechs Connexine bilden zusammen einen Hemikanal, der als Connexon bezeichnet wird. Zwei



Connexone auf gegenüberliegenden Zellmembranen können sich über die zwei extrazellulären Schleifen der jeweiligen Connexine zu einem Kanal



Connexonen in der Zellmembran in Verbindung mit anderen homotypischen und heterotypischen Connexonen (LAIRD 2006, S.530). zusammenschließen und so einen Transportweg zwischen den Innenräumen zweier benachbarter Zellen schaffen (KUMAR und GILULA 1996).

Homomere Connexone bestehen aus sechs Connexinen gleichen Subtyps. In Abgrenzung dazu setzen sich heteromere Connexone aus unterschiedlichen Connexin-Subtypen zusammen und nach Kombination unterschiedliche weisen je

Permeabilitäten und Zielfunktionen auf. Die meisten Zelltypen exprimieren maximal zwei unterschiedliche Subtypen, deren Kombination gewebespezifisch ist (LAIRD 2006).

Connexone können homotypische oder heterotypische Kanäle bilden. Werden zwei identische homomere oder heteromere Connexone zusammengeschlossen, spricht

man von homotypischen Kanälen. Heterotypische Kanäle, wie zum Beispiel in Leber, Augenlinse und Cochlea, bestehen aus Connexonen unterschiedlicher



Zusammensetzung (SOSINSKY 1995, JIANG und GOODENOUGH 1996, HOPPERSTAD et al. 2000, SUN et al. 2005).

Die Kanäle der Gap-Junctions befinden sich in einem ständigen Auf- und Abbau. Durch Exozytose erreichen die Connexone die Zellmembran und driften in ihr, bis sie an weitere Connexone oder ein Gap-Junction-Plaque gelangen und hier festgehalten werden (LAIRD 2006). Ältere Hemikanäle befinden sich somit in der Mitte der Gap-Junction-Plaques (GAIETTA et al. 2002). Im Rahmen des Abbaus werden sie in Form von doppel-membranösen Vesikeln, den sogenannten annulären Gap-Junctions oder Connexosomen, internalisiert (LAIRD 2006). Diese Degradation umfasst zwei mögliche Abbauwege. Es wird angenommen, dass je nach Subtyp Connexine entweder ER-assoziiert über Proteasomen (LAING und BEYER 1995) oder alleinig über Lysosomen abgebaut werden (LAING et al. 1997). Die Connexonhalbwertzeit beträgt nur wenige Stunden (LAIRD et al. 1991).

Fall Connexone werden nicht in jedem zu interzellulären Kanälen zusammengeschlossen. Unter bestimmten physiologischen Bedingungen, wie bei Membrandepolarisation, unter Sauerstoffradikalen, Beisein von reaktiven extrazellulär niedriaer Kalziumkonzentration oder zvtoplasmatisch hoher Kalziumkonzentration (SAEZ et al. 2005) öffnen membranständige Hemikanäle, um kleine Moleküle zum Ausgleich aufzunehmen oder freizusetzen (CRONIER et al. 2009).

1.4. Connexine und Karzinogenese

1.4.1. Connexine und Karzinogenese

Veränderungen der Connexinexpression, sowie der Gap-Junction-vermittelten interzellulären Kommunikation (GJIC) wirken sich in unterschiedlicher Art und Weise auf die unter 1.2 beschriebene Karzinogenese aus.

Hierbei erscheint es sinnvoll, die Auswirkungen unter vier verschiedenen Betrachtungsebenen zu analysieren: Auf molekularbiologischer Ebene, auf Proteinebene der Connexine und Gap-Junctions, auf Ebene der interzellulären Kommunikation (GJIC), sowie auf Ebene der Connexinlokalisation innerhalb der Zelle.

Auf diesen vier Betrachtungsebenen können Connexine Einfluss auf die Entstehung des *Primärtumors*, die *Invasion* und die *Dissemination* von Krebszellen (siehe Tumormodell von Cronier) nehmen, indem sie unter anderem interzelluläre Kommunikation verändern, verschiedene Lokalisationen im Zytosol, im Nukleus oder in der Zellmembran einnehmen, mit anderen Proteinen interagieren oder Signaltransduktionswege modulieren (HUANG RP et al. 1998, DE FEIJTER et al. 1996, RETAMAL et al. 2007).

	Histologisches Stadium	Zellulärer Phänotyp	Zell-Zell- Kontakt	
Stadium I	Primärtumor in situ	Zellwachstum	GJIC	
	เก รแน			
	\downarrow	\downarrow	↓ Abnahme	
Stadium II	Invasiver Tumor	Zellloslösung ↓ Motilität) Sector	
↓ ↓ ↓ Zunahme				
Stadium	Dissemination	Einbruch	GJIC	
III	Ausbildung	in Blutgefäße	↓ Abnahme	
	von Filiae	Extravasion	↓ Zunahme GJIC	
Abb. 5: Überblick über die Zusammenhänge zwischen stadienabhängiger Tumorhistologie,				
Tumoreigenschaften und junktionalem Verhalten. (Modifiziert nach CRONIER et al. 2009, S.325)				

1.4.1.1. Stadium I: Tumorentstehung und – wachstum

Ein Zusammenhang zwischen Gap-Junctions und Tumorwachstum ist in der Literatur seit mehreren Jahrzehnten vielfach beschrieben. So wurde gezeigt, dass die Gap-Junction-vermittelte interzelluläre Kommunikation (GJIC) unter Einfluss karzinogener Noxen gehemmt werden kann. Weiterhin kann wiederum Tumorwachstum durch Re-Induktion von GJIC durch Connexin-cDNA-Transfektion gehemmt werden. Andere Modelle zeigen im Gegensatz dazu, dass Tumorwachstum weniger durch Gap-Junction-vermittelten Zell-Zell-Kontakt reguliert wird, sondern über die direkte Modulation von Genexpression durch Connexine selbst.

Ein GJIC-gekoppelter Mechanismus wurde in Zusammenhang mit Connexinen (Cx) und Zellzyklusregulation auf molekularbiologischer Ebene beschrieben. Nach Connexin 43 Transfektion von in Nierenzelllinien und anschließender Wiederherstellung der GJIC wurden verlängerte G1-Phase und S-Phase beobachtet. verlängerte Zellzyklus führte konsekutiv zu einer herabgesetzten Der Proliferationsrate der Zellen. Verantwortlich gemacht wurden die Zellzyklus regulierenden Gene Cyclin A, D1, D2 und CDK5 und 6, da deren Expression nach Cx43-Transfektion herabgesetzt war (CHEN SC et al. 1995). In Osteosarkomzellen wurde die nach Transfektion mit Connexin 43 verlängerte G1-Phase mit dem

verminderten Abbau des Tumorsuppressors p27 in Verbindung gebracht (ZHANG YW et al. 2001). Ähnliche Effekte konnten an Modellen mit Leber- und Lungenkarzinomzellen nachgewiesen werden (KOFFLER et al. 2000). In Astrozyten Cx43-defizienter Mäuse wurde die Genexpression von über 250 Genen als abhängig von der Höhe an Cx43-Expression beschrieben. Bei den betreffenden Sequenzen handelte es sich um Transkriptionsfaktoren und an Apoptose und Zellwachstum beteiligte Gene (IACOBAS et al. 2003, IACOBAS et al. 2004).

regulatorische Fähigkeiten wurden Direkte auf *Proteinebene* für einzelne Connexinbestandteile beobachtet. Es ist bekannt, dass jeder der 21 Connexinsubtypen über spezifische, zytoplasmatische Aminosäuretermini verfügt (WILLECKE et al. 2002), die Interaktionen mit zytosolischen Proteinen zulassen (HERVE et al. 2004). Durch diese Interaktionen können Connexine an der Kontrolle interzellulärer Permeabilität und Signaltransduktion beteiligt sein und auch auf diesem Weg Tumorwachstum beeinflussen. In Connexin-32-defizienten Hepatozyten wird aufgrund mangelnder Interaktion zwischen zytoplasmatischen Connexin-C-Termini und zytoplasmatischen Proteinen eine Translokation dieser Proteine in den Zellkern beschrieben, wo sie als Transkriptionsfaktoren am Zellwachstum beteiligt sind. Analoges wurde in Connexin-43-defizienten Gliom- und Chorionkarzinomzellen beobachtet (DUFFY et al. 2007, FU et al. 2004, GELLHAUS et al. 2004).

Weiterhin soll die Beteiligung der Connexine im Rahmen der Karzinogenese auf *Ebene der Interzellulären Kommunikation (GJIC)* erläutert werden. So kann der Kopplungszustand der Gap-Junctions einer Zelle deren Proliferation beeinflussen. In Brustkrebs- und Gliomzellen war bei Cx43-Defizienz und ausbleibender interzellulärer Kopplung eine Zunahme des Oberflächenproteins Lactadherin nachweisbar, welches auf apoptotischen Zellen exponiert wird, um Phagozytose zu ermöglichen. Nach Transfektion mit Connexin 43 und wiederhergestellter Zell-Zell-Kopplung zeigte sich ein Rückgang des Oberflächenproteins (GOLDBERG et al. 2000).

Abschließend soll unter der *Betrachtungsebene der Connexinlokalisation* der Einfluss von Connexinen an der Tumorgenese am Beispiel von Glioblastomzelllinien erläutert werden. Bei einer Lokalisation des Connexin 43 im Zytoplasma und Nukleus sank die Proliferationsrate, verglichen mit membranständigen Connexin-43-Zellen. So wird angenommen, dass Connexin 43 im Nukleus direkt Einfluss auf die Genexpression

nehmen kann (HUANG RP et al. 1998, DE FEIJTER et al. 1996). Durch Transfektion lediglich des C-terminalen Endes von Connexin 43 (CT-Cx43) konnte diese Annahme untermauert werden, indem man nach Transfektion ein vermindertes Zellwachstum beobachtete und das CT-Cx43-Molekül im Nukleus der Zellen wiederfand (DANG et al. 2003, ZHANG YW et al. 2003).

1.4.1.2. Stadium II: Invasion und Migration

Im Rahmen der Invasion und Migration zeigen sich andersartige molekulare Einflüsse und Gap-Junction-vermittelte Kopplungsverhältnisse.

So scheint beispielsweise auf *molekularer Ebene* die Anwesenheit von Connexinen die Tumorprogression zu begünstigen. In Connexin-43-transfizierten Gliomzellen stehen unter dem Beisein von Astrozyten mehr Metalloproteinasen zur Verfügung, die als proteolytische Enzyme die Tumormotilität verbessern (ZHANG W et al. 2003). Dieser Prozess scheint von GJIC unabhängig, da die Zellen auch nach alleiniger Transfektion des Cx43-C-Terminus eine erhöhte Menge an Metalloproteinasen zeigten (BATES et al. 2007).

Auf *Proteinebene* wurde festgestellt, dass nach Transfektion mit verschiedenen Connexinsubtypen HeLa-Zelllinien eine stärkere Invasivität aufwiesen. Dieser Effekt wurde vor allem für Connexin 43, weniger für Connexin 40, Connexin 31 und nicht transfizierte Zellen, nachgewiesen. Die GJIC, die Zellproliferation und somit das Tumorwachstum blieben unverändert (GRAEBER und HULSER 1998).

An Gliomzellen konnte eine Korrelation zwischen dem Umfang der Connexinexpression und der Tumorzellmotilität beobachtet werden. Je mehr Connexin 43 exprimiert wurde, desto migrationsfreudiger wurden die Gliomzellen (BATES et al. 2007). Auch verbesserte eine erhöhte Cx43-Expression die Adhäsions- und Aggregationsfähigkeit, welches die Invasivität von Gliomzellen zu verstärken schien (LIN et al. 2002). Abgesehen von der Untersuchung von Tumorzellen wurde an dem nicht-pathologischen Prozess der Neuralrohrbildung in Mäusen gezeigt, dass Connexin 43 eine Interaktion mit dem Aktin-Zytoskelett eingeht. So kann Connexin 43 die gerichtete Migration der Neuralrohrzellen dynamisch regulieren (XU et al. 2006).

Auf *Ebene der interzellulären Kommunikation* betrachtet, können nicht-pathologische Prozesse genutzt werden, um Parallelen zwischen interzellulärer Kopplung und Tumormotilität und –invasivität herzustellen. So ist bei der entwicklungsbedingten Migration von neokortikalen Nervenzellen bei Nagetieren und von Neuralrohrzellen in Mäusen die Expression von Connexin 26 und Connexin 43 und ihre GJIC höher als in nicht migrierenden Neuronen (ELIAS et al. 2007, FUSHIKI et al. 2003, HUANG GY et al. 1998).

Eine Bedeutung der Connexinlokalisation wird für pulmonale Plattenepithelkarzinomzellen (ITO et al. 2006) und Prostatakrebszellen (TATE et al. 2006) angenommen. Hier wird die Membranständigkeit von Connexin 26 mit der Migration der jeweiligen Tumorzelle assoziiert. Bevor Tumoren aber in die invasive und migrationsfreudige Form übergehen, wurde beobachtet, dass Connexine vermehrt im Zytoplasma akkumulieren. Dieses an verschiedenen Modellen erfasste Verhalten kann als prädikativ invasiv verstanden werden. In humanen colorektalen Karzinomzellen beispielsweise ist die zytolasmatische Konzentration von Connexin 26 präinvasiv erhöht und abnehmend bei Invasion. In der entsprechenden Tumorvorläuferläsion, dem colorektalen Adenom, ist Connexin 26 im Zytosol nur sehr niedrig konzentriert (KANCZUGA-KODA et al. 2005). Eine Verallgemeinerung ist aber schwierig, da in humanen Leberkarzinom-Zelllinien erst im Stadium der Invasion Connexin 32 als im Zytoplasma vermehrt angereichert beobachtet wurde (LI et al. 2007, OMORI et al. 2007).

1.4.1.3. Stadium III: Dissemination/ Metastasierung

Im Rahmen der Dissemination und Metastasierung konnte für Connexin 26 und 43 eine Beteiligung an der Neoangiogenese festgestellt werden. Ferner wurde beobachtet, dass Tumorzellen über die GJIC Interaktionen mit Endothelzellen eingehen können.

Für das progressive Wachstum von Tumoren und deren Metastasen ist die Einsprossung von Kapillaren in den Tumor eine wichtige Voraussetzung. Die Regulation der Neovaskularisierung ist abhängig von einer Reihe von Wachstumsfaktoren und Zytokinen, die teils von Tumoren selbst sezerniert werden und den Prozess fördern, aber auch hemmen können.

Auf *Proteinebene* wurde beobachtet, dass Connexine Einfluss auf einige dieser Faktoren nehmen können und hier eine für den Organismus protektive Rolle einzunehmen scheinen. In Brustkrebszellen war bei Cx43-Unterexpression eine verminderte Expression des angiogenesehemmenden Proteins Thrombospondin-1 (IRUELA-ARISPE et al. 1999) beobachtet worden. Gleichzeitig zeigte sich eine vermehrte Expression des vaskulär-endothelialen-Wachstumsfaktors (VEGF) (SHAO et al. 2005), welcher als Schlüsselprotein die Angiogenese stimuliert (FERRARA und GERBER 2001). Als weiteres angiogeneseförderndes Signalprotein wird der Connective-Tissue-Growth-Faktor (CTGF) bei Cx26- und Cx43-Überexpression als vermindert und die Konzentration als von der Höhe der Connexinexpression abhängig nachgewiesen (QIN et al. 2003). Des Weiteren konnte für die gleichen Connexine ein stimulierender Effekt auf die Sekretion von Faktoren gezeigt werden, die die endotheliale Tubulogenese und die Migration von Endothelzellen verhindern. Eine Connexinüberexpression zeigt somit eine angiogeneseinhibierende Wirkung, die als für den Organismus protektiv verstanden werden kann (McLACHLAN et al. 2006). Im Gegensatz hierzu wird der GJIC eine angiogenesefördernde Wirkung zugeschrieben. So wurde in connexindefizienten, humanen, umbilikalen Endothelzellen unter ausbleibender GJIC eine Abnahme kapillarer Gefäßformationen gezeigt (GARTNER et al. 2011).

Ferner wurde auf *Ebene der interzellulären Kommunikation (GJIC)* gezeigt, dass die Connexinexpression in späten Tumorstadien zunimmt und über die Wiederherstellung von Gap-Junctions Interaktionen mit Endothelien möglich sind. Humane Brustkrebszellen, deren Tumorzellen Cx26- und Cx43-negativ waren, zeigten in Lymphknotenmetastasen eine deutliche Expression dieser Connexine (KANCZUGA-KODA et al. 2006). Ähnliches konnte für Connexin 26 in Versuchen an Melanomen von Mäusen beobachtet werden (KAMIBAYASHI et al. 1995).

Es ist bekannt, dass Endothelzellen selbst Connexine, wie beispielsweise Connexin 37, Connexin 40 und Conexin 43, exprimieren können (REED et al. 1993, VIS et al. 1998, PEPPER et al. 1992). Es wurde anhand von Untersuchungen an Gliomen (ZHANG W et al. 2003), Melanomen (ITO et al. 2000, SAITO-KATSURAGI et al. 2007) und Mammakarzinomen (POLLMANN et al. 2005) eine Ausbildung von GJIC zwischen Endothelien und den jeweiligen Tumorzellen beobachtet. Versuche an metastasierten Melanomzellen zeigten, dass die Menge an endothelständigem Connexin 26 direkt mit der metastatischen Kapazität des Tumors korreliert und somit von einer direkten Interaktion ausgegangen werden kann (ITO et al. 2000). Ferner weist das Plattenepithelkarzinom in Gegenwart von Connexin 26 eine deutlich schlechtere Prognose auf, da die Tumorzellen eine verstärkte Invasivität und Disseminationstendenz zeigten (ITO et al. 2006). Es gibt Ansätze, durch Cx26Inhibition die Tumorprogression zu verlangsamen und die Prognose des Patienten zu verbessern (ITO et al. 2004).

Neben der endothelialen Connexininteraktion ist für die Ausbildung von Fernmetastasen die Diapedese durch Endothelbarrieren eine wichtige Voraussetzung. Hier wurde an Mammakarzinomen für die interzelluläre Kopplung über Gap-Junctions ein diapedesefördernder Effekt gezeigt, indem durch Induktion von Connexin 43 die Diapedeserate verdoppelt werden konnte. Die Inhibition der GJIC minderte wiederum die Diapedeseaktivität (POLLMANN et al. 2005).

1.4.2. Connexin 26, 43, 45 und das orale Plattenepithelkarzinom

Bislang wurden keine einheitlichen Untersuchungen zur Connexinexpression in oralen Mundhöhlenkarzinomen veröffentlicht. Die wenigen in-vivo-Studien führten zu sehr unterschiedlichen und sogar widersprüchlichen Ergebnissen.

Unter der komplementären Anwendung von DNA-Subtraktion und Microarray-Analyse wurden die Malignome von 12 Patienten mit heterogenen Kopf-Hals-Tumoren untersucht und Connexin 26 als überexprimiert beschrieben (VILLARET et al. 2000). Es handelte sich um verschieden weit fortgeschrittene Tumoren, von welchen einige radiotherapeutisch vorbehandelt waren. Auf Proteinebene wurde die Cx26-Expression anhand immunhistochemischer Verfahren in 13 weiteren Kopf-Hals-Tumoren einer Patientengruppe untersucht. die teils neoadjuvant chemotherapeutisch, teils radiotherapeutisch behandelt worden war. Die Expression wurde als unverändert beschrieben. Die parallel untersuchte Cx30-Expression zeigte sich im Vergleich zur gesunden Mundschleimhaut deutlich erniedrigt (OZAWA et al. 2007). In einer Arbeit an oralen Plattenepithelkarzinomzelllinien war wiederum keine Cx26-Expression nachweisbar. Eine GJIC konnte nur für Connexin 43 gezeigt werden (FRANK et al. 2006). Daten unserer Arbeitsgruppe zeigen in humanen Mundhöhlenkarzinombiopsaten eine signifikante Cx45–Überexpression mit deutlich vermindertem Cx45/Cx43-Quotienten. Connexin 26 war funktionell, aber nicht signifikant, unterexprimiert (BRODMANN 2012).

1.5. Fragestellung

Vorliegende in-vivo-Studien an humanen, oralen Plattenepithelkarzinomen führten zu zum Teil widersprüchlichen Expressionsdaten bezüglich Connexin 26, 43 und 45. Dies kann auf die sehr heterogenen Patientenkollektive, auf unterschiedliche Nachweisverfahren und auf eine interindividuelle Variabilität zurückzuführen sein. Ziel der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung des DMBA-induzierten Wangentaschenkarzinoms des Hamsters im Hinblick auf die Eignung für weiterführende in-vivo-Untersuchungen von Connexinen und Gap-Junctionvermittelter interzellulärer Kommunikation in einem kontrollierbaren in-vivo-Modell.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden folgende Fragestellungen untersucht:

- 1- Geht die Ausbildung von oralen Plattenepithelkarzinomen des Hamsters mit Änderungen der Cx26-, Cx43- und Cx45-Expression einher?
- 2- Korreliert die Tumorprogression mit der Genexpression der oben genannten Connexine?
- 3- Ergeben sich mit humanen Daten vergleichbare, differenzielle Expressionsmuster?

2. Material und Methoden

2.1. Tierversuch

2.1.1. Versuchstiere

Als Versuchstier wurde der syrische Goldhamster (Mesocricetus auratus) eingesetzt. Die Tiefe seiner mit der Mundhöhle kommunizierenden Wangentaschen von 2,5-3,5 cm garantiert eine lange Verweildauer einer dort applizierten Noxe. Zusätzlich kann die Wangentaschenschleimhaut zur intraexperimentellen Begutachtung herausgezogen und invertiert werden.

Insgesamt 90 männliche Tiere im Alter von 5-6 Wochen, kommerziell erhältlich bei Charles River Laboratories International Inc., wurden eingesetzt. Ihr Alter zu Beginn der Behandlung betrug einheitlich acht Wochen.

2.1.2. Tiermodell

Die Behandlung der Versuchstiere folgte einer zweiwöchigen Akklimatisierung und wurde nach dem Applikationsschema von Salley (SALLEY 1954) durchgeführt. Somit

wurde bei den entsprechenden Tieren unter Anwendung eines Feinhaarpinsels (Gr. 4) die jeweilige Testsubstanz in die rechte Wangentasche eingebracht. Die Applikation fand dreimal wöchentlich (montags, mittwochs, freitags) statt. Je nach Gruppenzugehörigkeit wurde 9,10-Dimethyl-1,2-Benzanthrazen (DMBA)



(0,5% ig gelöst in U. S. P. Mineralöl), Mineralöl alleine oder als Kontrolle nichts in die rechte Wangentasche eingeführt. Eine Sedierung der Tiere während der Behandlung war nicht notwendig. Die einzig notwendige Hilfestellung war das Abhalten der Wange und das Öffnen der Wangentasche mit einem Metallspatel durch eine helfende Person.

Es wurde bewusst nur die rechte Wangentasche behandelt, um bei Tumorprogression und –ausbreitung eine natürliche Nahrungsaufnahme zu gewährleisten. Das Gewicht der jeweiligen Tier wurde zur Verlaufskontrolle des Allgemeinzustandes wöchentlich ermittelt und dokumentiert.

Die Versuchstiere wurden drei Gruppen fest zugeteilt und je nach Zugehörigkeit einem Behandlungsschema unterzogen. Somit erhielten 10 Tiere eine Behandlung mit DMBA, 10 weitere Tiere als Kontrolle eine Behandlung mit Mineralöl (um einen möglichen Effekt des Mineralöls auf die Mundschleimhaut und Tumorinduktion ausschließen zu können) und an 10 Tieren, als weitere Kontrollgruppe, wurde keine Behandlung durchgeführt (vgl. Tab. 2).

Gruppeneinteilung Die wurde SO gewählt, dass substanzabhängige Reaktionsunterschiede und die Karzinogenese im zeitlichen Verlauf untersucht werden konnten. So wurden die 90 Tiere in drei Gruppen à 30 Versuchstiere aufgeteilt. Gruppe A wurde über 10 Wochen behandelt, Gruppe B über 14 Wochen und Gruppe C über 14 Wochen mit anschließend 5 weiteren Wochen Beobachtung ohne Behandlung (vgl. Tab. 2). Innerhalb der drei Gruppen A-C wurden abermals drei Gruppen á 10 Versuchstiere gebildet, die jeweils nach den genannten Applikationsschemata behandelt wurden. Nach vollends abgeschlossener Behandlung folgte die Gewebeentnahme (siehe 2.1.3).

Zwei Versuchstiere, *Mineralöl 10* aus Regime B und *DMBA 10* aus Regime C, mussten wegen frühzeitigem Versterben vom Versuch ausgeschlossen werden.

Aus Regime C musste nach bereits 16-wöchiger (14+2) Versuchsdauer ein Versuchstier, *DMBA 1*, wegen starker Gewichtsabnahme und zunehmend sich verschlechterndem Allgemeinzustand verfrüht geopfert und untersucht werden.

Durch die anschließende Gewebeentnahme und histologische Untersuchung konnte die Entstehung von Plattenepithelkarzinomen verifiziert werden.

Behandlungsschema:

	Anzahl der	verwendeten	Tiere	
Gruppe	Regime A	Regime B	Regime C	Appl. Substanz
DMBA	10	10	10	DMBA 0,5% in Mineralöl
Kontrolle 2	10	10	10	Mineralöl
Kontrolle 1	10	10	10	leer
Tab. 2: Regime A: 10 Wochen lokale Applikation, im direkten Anschluss Gewebeentnahme. Regime B: 14				
Wochen lokale Applikation, im direkten Anschluss Gewebeentnahme. Regime C: 14 Wochen lokale Applikation,				
dann 5 Wochen ohne Behandlung und nur Tumorwachstum, anschließend Gewebeentnahme.				

2.1.3. Probenentnahme und Probenlagerung

Die Entnahme von Tumor- und Kontrollgewebe erfolgte nach Opferung der Tiere durch CO₂- Narkose und anschließender intrapulmonaler T61-Injektion.

Die Schleimhaut aus rechter und linker Wangentasche wurde exzidiert. Nahrungsreste wurden entfernt und das Gewebe nach Zerkleinerung umgehend in 1,5 ml vorgekühltes RNAlater überführt.

Unter Eröffnen von Abdomen und Thorax wurden Herz und Teile der Leber für die Methodenetablierung entnommen. Auch diese Gewebe wurden umgehend in 1,5 ml RNAlater gebracht.

Anschließend an die eintägige Inkubation in RNAlater bei -4 °C wurden die Proben in frischem RNAlater gewaschen und in 1,5 ml frischem RNAlater bei -20 °C asserviert.

2.1.4. Tierversuchsantrag

Die Durchführung des Tierversuchs wurde von dem Niedersächsischen Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit unter der Antragsnummer AZ 33.14.42502-04-066/08 geprüft und am 17.9.2008 genehmigt.

2.2. Material

2.2.1. Geräte

Waage, Mettler PM460 Delta Range, Mettler Instruments GMBH, Gießen
Skalpelle, techno cut, HMD Healthcare Ltd., Hereford, UK
NanoDrop, Peqlab ND 1000, Erlangen
2100 Bioanalyzer, Agilent Technologies Sales & Services GmbH & Co. KG, Waldbronn
Homogenisator Ultra-Turrax T10 basic, IKA-Werke
Mastercycler gradient, Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Peltier Thermal Cycler 200, MJ Research, Burladingen
MyiQ5 real-time PCR Detection System, Bio-Rad Laboratories, Hercules (USA)
Tischzentrifuge 5415 R, Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Mikrozentrifugen 5815 R und 5417C, Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Vortex-VELP scientifica, Starlab, Ahrensburg
Biochip-Scanner G2505B, Agilent Technologies, Böblingen
Elektrophoresekammer MIDI 1, Carl Roth, Karlsruhe Spannungserzeuger Power Pac Basic Supply, Bio-Rad Laboratories, Hercules (USA) Thermoblock, Eppendorf, Wesseling-Berzdorf Megafuge 1.0, Heraeus Holding GMBH, Hanau

2.2.2. Enzyme/Kits

Qiagen RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit (74704), Qiagen GmbH, Hilden Qiagen RNase-Free DNase Set (79254), Qiagen GmbH, Hilden iScript cDNA Synthesis Kit (170-8890), Bio-Rad Laboratories, Hercules (USA) iQ SYBR-Green Supermix (170-8882), Bio-Rad Laboratories, Hercules (USA) 1 kb DNA-Ladder (15615-024), Invitrogen GmbH, Karlsruhe Agar-Agar (2266.1), Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

2.2.3. Lösungen

DEPC-Wasser 1 ml Diethylpyrocarbonat ad 1000 l Aqua bidest Qiagen Nuclease-Free Water (129114), Qiagen GmbH, Hilden Qiagen RNAlater RNA Stabilisation Reagent (76106), Qiagen GmbH, Hilden

2.2.4. Nukleotidquellen

PrimerBlast: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/ GenBank: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/ Metabion: http://www.metabion.de

2.3. Karzinogenitätsprüfung

2.3.1. Erfassung und Beurteilung des karzinogenen Effektes

Die mit DMBA behandelten Wangentaschen wurden nach Exzision makroskopisch und mikroskopisch mittels HE-Färbung untersucht, um den karzinogenen Effekt durch DMBA analysieren zu können. Die Veränderungen der jeweiligen Proben wurden untereinander verglichen, auf zeitliche Zusammenhänge untersucht und Ähnlichkeiten dokumentiert.

2. Material und Methoden

Zur Objektivierung der histologischen Ergebnisse wurden die karzinogenen Veränderungen einem selbstdefinierten, stetigen Grading zugeordnet. So wurden vordefinierte histologische Ausprägungen einer Skala von 0-6 zugewiesen (Tab. 3).

Grading	Histologische Ausprägung
0	Keine Veränderung
1	Hyperkeratose
2	Hyperplasie
3	Dysplasie
4	Mikroinvasives Karzinom
5	Gut differenziertes Karzinom
6	Mäßig differenziertes Karzinom
Tab. 3: Grading.	

Parallel zu der histologischen Untersuchung wurde der Inflammationsgrad als Ausmaß der gewebeeigenen Reaktion auf die karzinogene Noxe bestimmt. In den Präparaten wurden Leukozyten identifiziert und entweder als fehlend (0), mäßig (+) oder gehäuft (++) vorhanden eingestuft.

2.3.2. Kontrolluntersuchung der kontralateralen Wangentaschen

Weiterhin wurden die kontralateralen, nicht behandelten Wangentaschen von 5 Präparaten aus Regime A und 8 Präparaten aus Regime C histologisch auf Schleimhautveränderungen untersucht. Anhand der Ergebnisse sollte eine mögliche Generalisation der DMBA-Wirkung erfasst und eine Aussage über die Qualität der Methodik gemacht werden können.

2.4. RNA-Isolierung und cDNA-Generierung

Gewebehomogenisierung und RNA-Isolation wurden nach Herstellerangaben des Qiagen RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit (QIAGEN 2006) durchgeführt.

2.4.1. Gewebehomogenisierung

Je nach Probenart und Tumorgröße wurden 10-30 mg der jeweiligen Probe in β-Mercaptoethanol und RLT-Puffer mit dem Turraxer T10 homogenisiert. Das Homogenisat wurde 3 min bei 4000 rpm zentrifugiert und der Überstand in ein frisches Probengefäß überführt. In Qiagen nuklease-freiem Wasser mit Qiagen Proteinase K wurde der Überstand bei 55 °C für 10 min inkubiert, um verbleibende intakte Zellen endgültig aufzuschließen. Darauffolgend wurde das Gemisch für 3 min bei 11.000 rpm zentrifugiert und der Überstand in ein frisches Cup überführt.

2.4.2. Isolation

Der Überstand aus 2.3.1 wurde mit 70%-Ethanol vermengt und das Gemisch auf eine RNEasy-Säule überführt. Um die RNA an die Silica-Membran der RNEasy-Säule zu binden, wurde die Säule für 15 sec bei 12.000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde die RNA zweimalig mit RW1-Puffer gewaschen. Der DNAse-I-Verdau erfolgte nach dem Qiagen-Protokoll hier zwischengeschaltet als Inkubation auf der Säule. Letztendlich wurde die RNA mit RPE-Puffer gewaschen und in 60 µl Nuklease-freiem Wasser eluiert.

2.4.3. Quantifizierung und Qualitätskontrolle

Die Menge bzw. Konzentration der unter 2.3.2 gewonnenen RNA wurde anhand 2 µl Eluat am NanoDrop-Messstand quantifiziert. Ziel war eine Konzentration von mindestens 20 ng/µl.

Die Qualitätskontrolle aller RNA-Proben erfolgte am Bioanalyzer-Messstand. Eingesetzt wurde die vom Hersteller empfohlene Menge RNA. Proben mit einer RNA Integrity Number (RIN) von <8 wurden ausgeschlossen.

2.4.4. Reverse Transkription

Die Reverse Transkription schloss sich der Qualitätskontrolle an. Jeweils 200 ng RNA aller zu analysierenden Tumor- und Mundschleimhautbiopsien wurden mit dem iScript cDNA Synthesis Kit in cDNA umgeschrieben:

4 μl 5x iScript Reaction Mix 1 μl iScript Reverse Transkriptase 200 ng RNA-Probe ad 20 μl H₂Onukleasefrei

20 µl Gesamtvolumen

Zur Etablierung und Optimierung der real-time PCR wurden vier Ansätze doppelt angesetzt und die vier daraus resultierenden cDNA-Proben gepoolt.

2.5. Real-time PCR

2.5.1. Primer

Die goldhamsterspezifischen Gensequenzen der Connexine 26-, 43-, 45-cDNA und der GAPDH-cDNA stehen zum Design spezifischer Primer zur Verfügung (CRUCIANI et al. 2004). GAPDH ist von zellregulatorsichen Prozessen unabhängig und wird ubiquitär, konstitutiv exprimiert. Aus diesen Gründen wurde GAPDH als *house-keeping gene* gewählt, um die Connexin-cDNA auf dieses zu normieren und relativ quantifizieren zu können. Mit dem Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) vom National Center of Biotechnology Information (NCBI) wurden die Primer nach den der NCBI Genbank entnommenen Gensequenzen gewählt:

Can	Drime reveriebtung und eeguenz	Lincon onoto. Dro duiktiön av	
Gen	Primerausrichtung und -sequenz	Umspannie Produkliange	
<u>Cx 26</u>	fwd 5'-CAGCCGGGATGTAAGAATGT-3'		
	rev 5'-TACGGACCTTCTGGGTTTTG-3'	214 Dasenpadie	
<u>Cx 43</u>	fwd 5'-TCACGTGGACTGCTTCCTCT-3'	204 Pasannaara	
	rev 5'-GAGCCACAGTCTTTTGAGGG-3'	204 Dasenpaare	
<u>Cx 45</u>	fwd 5'-AGGACTGTGTTTGAGGTGGG-3'	222 Pagannaara	
	rev 5'-TGGTCCCAAACCCTAAATGA-3'	223 Dasenpaare	
<u>GAPDH</u>	fwd 5'-AACTTTGGCATTGTGGAAGG-3'	245 Pasannaara	
	rev 5'-CGACATGTGAGATCCACGAC-3'	245 Basenpaare	
Tab. 4: Die für den Versuch gewählten Primersequenzen und Basenpaarlängen. Cx=Connexin			

Es wurden jeweils unmodifizierte lyophilisierte Primer à 0,02 µmol von Metabion, Deutschland (www.metabion.de) bezogen. Die in Probengefäßen gelieferten Oligonukleotide wurden in Stammlösungen à 100 µM H₂O bei Raumtemperatur gelöst. Aus diesen Stammlösungen wurden 10-fach verdünnte Aliquots á 10 µM hergestellt und für die Experimente verwendet. Die Lagerung der gelösten Primer erfolgte bei -20°C.

2.5.2. Schmelztemperatur

Die errechnete Schmelztemperatur aller Primer wurde mittels real-time PCR verifiziert, die real-time PCR mit dem iQ-SYBR-Green-Kit durchgeführt:

<u>Pipett</u>	Pipettierschema:				
30 µl iQ-		iQ-SYBR-Green-Supermix			
0,8µl		Primer (fwd)			
0,8 µl		Primer (rev)			
17,9 µ	I	H ₂ Odest.			
<u>0,5 µl</u>		<u>cDNA (Poolprobe)</u> .			
50 µl		Gesamtvolumen			
PCR-	Programm:				
1 x	98,0°C	0'30"			
40 x	94,0°C	0'10"			
	60,0-63,3°C	0'15" Temperaturgradient über Probentriplet			
	72,0°C	0'20" Echtzeitanalyse			
1 x	94,0°C	0'15"			
1 x	60,063,3°C	0'30" Temperaturgradient über Probentriplet			
85 x	50,0-92,0°C	0'10" Jede Wiederholung mit Erhöhung der			
		Temperatur um 0,5°C, Echtzeitanalyse			

Die höchste Effizienz der PCR-Reaktion lag in Übereinstimmung mit der errechneten Schmelztemperatur bei allen Primern bei 60°C.

Durch eine auf 1,5% Agarosegel durchgeführte Gelelektrophorese konnte für alle oben genannten Primerpaare ausgeschlossen werden, dass ein Produkt entstand, welches nicht der erwarteten Basenpaarlänge entsprach (siehe Anhang C).

2.5.3. Real-time PCR

Die jeweiligen Reaktionsansätze der real-time PCR wurden wie folgt hergestellt: <u>Pipettierschema</u>:

20 µl	<u>Mastermix</u> :				
	12,5	µl iQ-SYBR-Green-Supermix			
	6,7	µI H₂Odest.			
	0,4	µl Primer (fwd)			
	0,4	µl Primer (rev)			
<u>5 µl</u>	Template (cDNA) .				
25 µl	Gesamtvolur	men			

Die verwendeten PCR-Platten enthielten 96 Wells und konnten mit einer Versiegelungsfolie verschlossen werden. Um Konzentrationsunterschiede in den einzelnen Reaktionsansätzen besser vermeiden zu können, wurden Mastermixe für je zwei Platten angesetzt und erst in den Vertiefungen mit der cDNA der zu untersuchenden Probe versetzt.

In Vorversuchen konnte das folgende zeitoptimierte Programm am Bio-Rad MyiQ real-time detection system etabliert werden:

PCR-Programm:

1 x	98°C	0'30"
45 x	94°C	0'01"
	60°C	0'15"
	72°C	0'10" Echtzeitanalyse
1 x	94°C	0'15"
1 x	60°C	0'30"
75 x	55°-92°C	0,5°C/0'10" Fluoreszenzmessung

Anhand der zuvor etablierten Primerpaare für Connexin 26, 43, 45 und GAPDH (*house-keeping-gene*) konnten pro PCR-Platte sechs Hamsterproben jeweils als Dreifachansatz analysiert werden (Tab. 5). In den Zeilen B-D und E-G wurden die unverdünnten Standards gemessen und der jeweilige c_T -Wert (*threshold cycle*) abgelesen. In den Zeilen A und H wurden die Standards der Verdünnungsreihe der zuvor angefertigten Poolprobe (=10-fach verdünntes Gemisch aus cDNA aller 90 Proben, siehe 2.4.4) über drei Zehnerpotenzen gemessen, um die jeweiligen Effizienzen für die anschließende Quantifizierung der Proben bestimmen zu können. Für die Negativkontrolle – *no template control* (NTC) – jedes Versuches wurde statt Hamsterproben-cDNA 5µL steriles Wasser eingesetzt. So sollte eine mögliche DNA-Kontamination des Mastermixes erkannt und ausgeschlossen werden können.

								1				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
А	NTC	10x	10x	10x	100x	100x	10x	10x	100x	100x	100x	NTC
В	DMBA1	DMBA2	MÖ1	MÖ2	K1	K2	DMBA1	DMBA2	MÖ1	MÖ2	K1	K2
С	DMBA1	DMBA2	MÖ1	MÖ2	K1	K2	DMBA1	DMBA2	MÖ1	MÖ2	K1	K2
D	DMBA1	DMBA2	MÖ1	MÖ2	K1	K2	DMBA1	DMBA2	MÖ1	MÖ2	K1	K2
E	DMBA1	DMBA2	MÖ1	MÖ2	K1	K2	DMBA1	DMBA2	MÖ1	MÖ2	K1	K2
F	DMBA1	DMBA2	MÖ1	MÖ2	K1	K2	DMBA1	DMBA2	MÖ1	MÖ2	K1	K2
G	DMBA1	DMBA2	MÖ1	MÖ2	K1	K2	DMBA1	DMBA2	MÖ1	MÖ2	K1	K2
Н	NTC	10x	10x	10x	100x	100x	10x	10x	10x	100x	100x	NTC
Tab. 5: Design der real-time PCR-Platte zur Bestimmung der quantitativen Genexpression von Connexin 26												
(pink), 43 (grün), 45 (dunkel blau) und GAPDH (house-keeping-gene) (hell blau) in der mit DMBA behandelten												
Mundschleimhaut (DMBA), der mit Mineralöl behandelten Mundschleimhaut (MÖ) und der nicht behandelten												
Mundschleimhaut der Kontrolltiere (K). NTC: no template control												

2.5.4. Auswertung der real-time PCR

Mit dem oben genannten Versuchsaufbau konnten die Effizienz der PCR-Reaktion für die zu untersuchenden Connexine und GAPDH sowie die c_T -Werte der einzelnen Tumorproben gemessen werden. Der c_T -Wert jeder Probe wurde dort abgelesen, wo bei halblogarithmischer Auftragung der arbiträren Fluoreszenzaktivität gegen die PCR-Zyklen der Beginn der exponentiellen Amplifikation des nachzuweisenden Nukleotids zu erkennen war.

Die Genepression der untersuchten Connexin wurde auf GAPDH normalisiert nach Pfaffl (PFAFFL 2001) relativ quantifiziert:

$$R = \frac{E_{GOI}^{\Delta CT_{GOI}(S \tan dard - \Pr obe)}}{E_{GAPDH}^{\Delta CT_{GAPDH}(S \tan dard - \Pr obe)}}$$

$$E_{GAPDH}^{E}$$

$$E_{GAPDH}^{E}$$

$$E_{GOI}^{E}$$

$$E_{GOI}^{CT}$$

$$E_{GOI}^{CT}$$

$$E_{GOI}^{CT}$$

$$E_{GOI}^{CT}$$

$$E_{GOI}^{CT}$$

Die auf GAPDH normalisierten Expressionswerte wurden log₂-transformiert, um sie einer Normalverteilung anzunähern. Mit einer 2-faktoriellen Varianzanalyse wurden mögliche Genexpressionsunterschiede zwischen den einzelnen Gruppen (DMBA,
Mineralöl und Kontrolle) sowie zwischen den unterschiedliche Behandlungszeiträume (10, 14 und 14+5 Wochen) je Gen untersucht. Mögliche Wechselwirkungen (Interaktionen) zwischen dem Gruppen- und dem Wochenfaktor wurden berücksichtigt. Weiterhin wurden je Gen die Expressionswerte der jeweiligen Behandlungszeiträume zusammengefasst und so die Gruppen A-C mittels 1-faktorieller Varianzanalyse verglichen. Unter Anwendung des log2 Fold Change war ein Expressionsabfall bei <0 angesetzt, eine Expressionssteigerung bei >0. Bei p-Werten unter 0,05 wurden signifikante Unterschiede angenommen.

3. Ergebnisse

3.1. Makroskopie

Durch die lokale DMBA-Applikation in der Wangentasche sollten Plattenepithelkarzinome wie die der oralen Mundhöhlenkarzinome des Menschen induziert werden. Im Folgenden werden die mit DMBA, Mineralöl oder nicht Wangentaschenschleimhäute makroskopisch behandelten beschrieben und verglichen. Es konnte insgesamt gezeigt werden, dass die Applikation von DMBA im Vergleich zu der Mineralöl- und Leekontrolle in Abhängigkeit von Behandlungsdauer makroskopisch einen deutlichen Effekt in Form von Rötung, Vergröberung und exophytischem Wachstum hatte.



Abb. 7: Wangentaschenschleimhaut nach 10-wöchiger DMBA-Behandlung.

Nach **10-wöchiger Behandlung**, Opferung und Exzision der Gewebe ließen die mit <u>DMBA</u> behandelten Wangentaschenschleimhäute aufgrund der deutlichen Rötung und Rauheit eine Präkanzerose vermuten. Die <u>Mineralöl-</u> sowie die <u>Leerkontrolle</u> zeigten keine Veränderungen.

Nach **14-wöchiger-Behandlung** zeigten die mit <u>DMBA</u> behandelten Wangentaschen eine flächige Vergröberung mit weiterhin anhaltender Rötung. Versuchstier DMBA 9B (Tier Nummer 9 aus Regime B) wies außerdem einen Knoten von 1-2 mm Durchmesser auf. Die mit Mineralöl und die nicht behandelten Mundschleimhäute der

Kontrolltiere zeigten keine Veränderung. Die nach 10 Wochen beschriebene Blässe der mit



Abb. 8: Wangentaschenschleimhaut nach 14-wöchiger DMBA-Behandlung.

Mineralöl behandelten Mundschleimhäute ließ sich nicht nachweisen.

14 Wochen Die Behandlung mit anschließendem 5-wöchigen von Tumorwachstum zeigte den schleimhautverändernden Effekt von DMBA im Vergleich zu den Kontrollen am deutlichsten. Fast allen mit DMBA behandelten Wangentaschenschleimhäuten waren multiple Tumoren von bis zu 6 mm Durchmesser aufliegend. Die Schleimhautoberflächen waren noch stärker vergröbert und flächig villös verändert. Versuchstier DMBA 9C zeigte keine Tumoren, dafür eine in sich verwachsene Wangentasche, wie auch metastasenähnliche Veränderungen in der Leber. Die Schleimhaut des nach bereits 16 Wochen (14+2) geopferten Tieres DMBA 1C war stark vergröbert und wies mehrere Knoten von bis zu 4 mm Durchmesser auf.



Die mit <u>Mineralöl</u> und die <u>nicht behandelten</u> Mundschleimhäute der Kontrolltiere zeigten keine Veränderung.

3.2. Histologie

Zur Objektivierung der karzinogenen Ausprägungen wurden Teile von einigen ausreichend dimensionierten Proben der mit DMBA behandelten Versuchstiere histologisch auf hyperplastische Veränderungen, wie Hyperkeratosen und Hyperplasien, sowie neoplastische Veränderungen, wie Dysplasien, Mikroinvasivität und gut bis mäßig differenzierte Plattenepithelkarzinome, untersucht.

Nach **10-wöchiger Behandlung** reichte der DMBA-Effekt von nicht (2/10 Tiere) bis maximal dysplastisch verändert (2/10 Tiere). Der Hauptanteil der Präparate (5/10

Tiere) wies maximal Hyperkeratosen auf. Der kleinste Anteil (1/10 Tiere) zeigte maximal Hyperplasien.

Im Vergleich hierzu wiesen die Präparate der **14-wöchigen Behandlung** deutlichere Veränderung auf, die von Hyperplasie (1/9 Tiere) bis zum mäßig differenzierten Karzinom (1/9 Tiere) reichten. Der Hauptanteil (4/9 Tiere) zeigte maximal mikroinvasive Karzinome, aber auch Veränderungen im Sinne von Dysplasien wurden nachgewiesen (3/9 Tiere).

Den deutlichsten und fortgeschrittensten Karzinogeneffekt zeigte Behandlungsregime C nach **14 Wochen Behandlung mit an-schließendem 5-wöchigen Tumorwachstum.** Die Ausprägungen reichten von dysplastisch (2/8 Tiere) bis mäßig

differenziertem Plattenepithelkarzinom (2/8 Tiere), mit einem Hauptanteil (3/8 Tiere) aus gut differenzierten Plattenepithelkarzinomen. Ein kleiner Anteil (1/8) zeigte maximal mikroinvasive Veränderungen.

Ausschluss Die für den eines in der Mundhöhle DMBAgeneralisierten Effektes untersuchten fünf Präparate aus Regime A (10-wöchige Behandlung) und acht Präparate aus Regime С (14-wöchige Behandlung plus 5 Wochen



Tumorwachstum) der kontralateralen, nicht behandelten Wangentasche zeigten keine histologischen Schleimhautveränderungen. Für jedes der 13 Präparate konnten karzinogene Veränderungen ausgeschlossen werden.

Das zur Objektivierung vorgenommene Grading (Tab. 6) der histologischen Ergebnisse korreliert signifikant mit der Länge der Behandlungsdauer (Abb. 11).



Grading	Histologische Ausprägung
0	Keine Veränderung
1	Hyperkeratose
2	Hyperplasie
3	Dysplasie
4	Mikroinvasives Karzinom
5	Gut differenziertes Karzinom
6	Mäßig differenziertes Karzinom
Tab. 6: Grading	

3.3. Inflammation

Histologisch wurde parallel zum Grading der Inflammationsgrad anhand des Vorliegens von Entzündungszellen bestimmt, um die Reaktion des lokalen Gewebes auf die Applikation des Karzinogens oder das Tumorwachstum beurteilen zu können. In den histologisch untersuchten Präparaten wurden Leukozyten identifiziert und entweder als fehlend (0), mäßig (+) oder gehäuft (++) vorhanden eingestuft.

Es fiel auf, dass mit zunehmender Behandlungsdauer die Zahl der Entzündungszellen anstieg. Nach **10-wöchiger Behandlung** waren unter den zehn untersuchten DMBA-behandelten Wangen-

DMBA	0	+	++
10	4	6	0
14	2	4	2
14+5	0	2	7

Tab. 7: Anzahl der Tiere bezogen auf Behandlungsdauer (10 - 14+5) und Inflammationsgrad (0 - ++).

taschen sechs Präparate, die eine mäßige Zahl an Entzündungszellen aufwiesen. Nach **14-wöchiger Behandlung** stieg die Zahl von Präparaten mit identifizierten Leukozyten auf sechs von acht untersuchten Wangentaschen, wobei in zwei von den sechs mehr Entzündungszellen gesehen wurden, als in den Präparaten zuvor. Die 14-wöchige Behandlung mit anschließenden 5 Wochen Tumorwachstum zeigte den deutlichsten inflammatorischen Effekt, da von neun Präparaten alle Entzündungszellen aufwiesen. Sieben von diesen zeigten eine sehr hohe Anzahl an Leukozyten.

Als Vergleich wurde von 15 DMBA-behandelten Versuchstieren die linke Wangentasche untersucht. Somit sollte ein generalisierter inflammatorischer Effekt ausgeschlossen werden. Die untersuchten Wangentaschenschleimhäute wiesen bis auf eine mit einer geringen Leukozytenanzahl keine Entzündungszellen auf.

Die Ergebnisse dieser Untersuchung zeigen einen lokalisierten und zeitabhängig deutlichen inflammatorischen Effekt im Rahmen der Tumorprogression der Mundschleimhaut.

3.4. Korrelation der Connexinexpression mit dem histologischen Grading

Die Expression von Connexin 26, 43, und 45 in den Tumorproben wurde mit dem histologischen Grading verglichen. Für alle drei Connexinsubtypen konnten keine signifikante Korrelation zwischen histologischem Grading und Genexpression nachgewiesen werden.





3.5. Korrelation der Connexinexpression mit dem Behandlungsregime und der Behandlungsdauer

Die Genexpression von Connexin 26, 43 und 45 wurde dahingehend analysiert, ob Behandlungsdauer oder Behandlungsregime einen Einfluss auf die Regulation der untersuchten Connexine hat.

Mit der zunächst durchgeführten 2-faktoriellen Varianzanalyse wurden je Gen die einzelnen Gruppen (DMBA, Mineralöl, Leerkontrolle) und Wochen (10, 14, 14+5) auf Unterschiede in der Genexpression untersucht. Für **Connexin 26** und **45** konnte ein Gruppeneffekt durch das Behandlungsregime (Cx26 p=0,02, Cx45 p<0,01), nicht aber durch die Dauer nachgewiesen werden. Die Länge der Behandlung bzw. ein anschließendes Tumorwachstum ohne Behandlung schien zeitlich keinen Einfluss auf die Regulation zu nehmen, wohl aber die Art der Behandlungssubstanz. Ob eine Interaktion der beiden Faktoren besteht (Interaktionseffekt), also ein Gruppeneffekt zu den einzelnen Zeitpunkten unterschiedlich stark ausgeprägt ist oder umgekehrt, wurde ebenfalls untersucht. Es konnte aber keine Interaktion beobachtet werden.



Nachdem keine Zeitabhängigkeit nachgewiesen werden konnte, wurden die Expressionsergebnisse der Behandlungsgruppen (DMBA, Mineralöl, Leerkontrolle) aller drei Regime (A-C) zusammengefasst und die Gruppen mittels 1-faktorieller Varianzanalyse paarweise verglichen. Für **Connexin 26** und **Connexin 45** wurde eine signifikante Steigerung der Genexpression in der DMBA-Gruppe gegenüber Mineralöl- und Leerkontrollgruppe nachgewiesen.





Connexin 43 wurde der real-time-PCR-Analyse entsprechend weder unter DMBA-Behandlung noch innerhalb der Kontrollgruppen differenziell exprimiert. Auch unter Berücksichtigung des zeitlichen Verlaufs waren zwischen den Regimen keine signifikanten Unterschiede festzustellen.



4. Diskussion

Das orale Plattenepithelkarzinom ist ein häufig vorkommender Tumor und umfasst insgesamt über 95% aller Mundhöhlenkarzinome (MEHROTRA und YADAV 2006). Diese Entität ist durch eine schlechte Prognose sowie eine niedrige 5-Jahres-Überlebensrate gekennzeichnet. Genauere Kenntnisse über Pathogenese und Progression des oralen Plattenepithelkarzinoms können zur Verbesserung von Therapie und Prognose beitragen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit soll ein Tiermodell erprobt werden, mit dem eine Beteiligung der Connexine 26, 43 und 45 an der oralen Karzinogenese evaluiert werden kann (vgl. 1.4). Das mit DMBA-induzierte Wangentaschenkarzinom des Hamsters soll weiterführende, kontrollierte in-vivo-Untersuchungen an Connexinen Gap-Junction-vermittelten interzellulären und der Kommunikation (GJIC) ermöglichen, um dortige molekulare Vorgänge im Verlauf der Tumorgenese zu beleuchten. Gegenwärtige in-vivo-Ergebnisse zeigen sehr uneinheitliche und widersprüchliche Connexinexpressionsmuster (siehe 1.4.2). Durch die Etablierung eines kontrollierten in-vivo-Modells, wie in der vorliegenden Arbeit geschehen, können heterogene Patientenkollektive, uneinheitliche Nachweisverfahren und interindividuelle Variabilität vermieden werden.

4.1. Tiermodell

Die Karzinominduktion durch DMBA in den Wangentaschen syrischer Goldhamster ist das bekannteste Tiermodell zur Untersuchung oraler Plattenepithelkarzinome und eine in diesem Rahmen oft genutzte und gut etablierte Methode (MOGNETTI et al. 2006). Das hierbei induzierte Malignom ist im Vergleich zu analogen Tiermodellen die am besten untersuchte orale Tumorentität, um Korrelationen zu dem humanen oralen Plattenepithelkarzinom zu finden und für weiterführende Untersuchungen zu nutzen (VAIRAKTARIS et al. 2008). Anhand dieses Modells wurde gezeigt, dass das Hamstermalignom makroskopisch histologisch und dem humanen oralen Plattenepithelkarzinom 2009). sehr ähnelt (NAGINI Weiterhin werden molekularbiologische Ähnlichkeiten beschrieben, die auf eine gleichartige Expression molekularer Marker und vergleichbare Defekte in der Signaltransduktion hindeuten

(NAGINI 2009). Ferner wurde die Expression humaner Onkogene (EGFR, erbB2, erbB3, FGFR-2, FGFR-3, c-myc, N-ras), Tumorsuppressorgene (p53, p16), Apoptosemarker (Bax, Bcl-2) und Zellproliferationsmarker (Ki-67) untersucht und deutliche Parallelen zum humanen Mundhöhlenkarzinom in allen Stadien der prämalignen und malignen Tumorgenese nachgewiesen (VAIRAKTARIS et al. 2008). Die von uns gewählte und im Versuch angewandte Gruppengröße und -aufteilung Versuchstiere beruht auf Literaturrecherche. Das Hamstermodell der der Tumorinitiation durch DMBA wird seit 1954 in dieser Form angewendet (SALLEY 1954). Seitdem konnte die Effizienz und Effektivität des Hamstermodells mehrfach bestätigt werden und dessen Überlegenheit gegenüber anderen Tiermodellen, wie beispielswiese Ratte (WALLENIUS und LEKHOLM 1973) und Maus (MOGNETTI et al. 2006), aufgezeigt werden. Zur Untersuchung von Plattenepithelkarzinomen ist das Hamstermodell eine oft genutzte und gut etablierte Methode (MOGNETTI et al. 2006).

Mittels eingehender Vorversuche wurde von uns die Eignung des Tiermodells im Hinblick auf Durchführbarkeit und Reproduzierbarkeit geprüft und bestätigt. Die Tiefe der Wangentaschen vereinfachte die Applikation der einzubringenden Lösungen und garantierte eine zuverlässige, langfristige Verweildauer an der Mundschleimhaut (MOGNETTI et al. 2006). Der tumorinduzierende DMBA-Effekt wurde histologisch untersucht und validiert.

Ein DMBA-unabhängiger Effekt durch das Lösungsmittel Mineralöl sowie durch andere unbekannte, äußere Einflussgrößen wurde ausgeschlossen. Hierzu wurden Mineralöl- und Leerkontrollen parallel während des gesamten Versuches durchgeführt und anschließend deren Connexinexpressionsmuster mit dem der mit DMBA behandelten Tiere verglichen. Mineralöl wird als Lösungsmittel in Kosmetik und Medizin genutzt. Unterschiedliche Arbeiten konnten zeigen, dass Mineralöl die Beschaffenheit der Wangentaschenschleimhaut der Hamster nicht verändert (ELZAY 1966, SOLT 1981). Auch in dieser Arbeit zeigten die mit ausschließlich Mineralöl behandelten Wangentaschenschleimhäute im Vergleich zu den Leerkontrollen keine Unterschiede bezüglich Makroskopie, Histologie und Connexinexpression. Da auch die Leerkontrollen im Laufe der Vor- und Hauptversuche keine Veränderungen aufwiesen, kann davon ausgegangen werden, dass äußere, unbekannte Einflüsse keinen Effekt auf die zu untersuchenden Gewebe hatten. Somit können äußere Einflüsse und interindividuelle Variabilität weitestgehend ausgeschlossen werden.

Natürlich kann trotz makroskopischer, histologischer und molekularer Ähnlichkeiten das orale Plattenepithelkarzinom des Hamsters mit dem des Menschen nicht gleichgesetzt werden. Bei vergleichender Betrachtung der Morphologie zeigt es beim Hamster einen exophytischen Wachstumsverlauf, während beim Menschen die ulzerierende Form vorherrschend ist. Dennoch ist das genannte Hamstermodell ein geeigneter und mehrfach bestätigter Ansatz zur Untersuchung des oralen Plattenepithelkarzinoms.

4.2. Quantitative real-time PCR

4.2.1. Nachweis auf mRNA-Ebene

Die quantitative real-time PCR ist eine etablierte, sensitive Methode zur Analyse von Genexpressionsmustern auf mRNA-Ebene. Mit aus mRNA mittels reverser Transkription generierter cDNA und der Möglichkeit, mithilfe bekannter DNA-Sequenzen verschiedener Connexinsubtypen in Hamstern spezifische Primer zu designen, können Expressionsmuster auf mRNA-Ebene analysiert werden (CRUCIANI et al. 2004).

4.2.2. Detektion und Quantifizierung der DNA im PCR-Produkt

Die quantitative real-time PCR basiert auf der Messung der Fluoreszenzaktivität DNA-bindender Fluorophore. Die DNA-Konzentration und Startkopienzahl wird dabei nicht absolut gemessen, sondern mehr die Kinetik der zur Menge der DNA proportionalen Fluoreszenzaktivität bestimmt. So wird die Expression des zu untersuchenden Gens auf ein ubiquitär und homogen exprimiertes Referenzgen (GAPDH) und eine Probe mit standardisierter, verdünnter Genexpression bezogen. Im Gegensatz zu der semiquantitativen Anfärbung einer Gelelektrophoresebande im Sinne einer Endpunkt-PCR bietet die Methode der real-time PCR den Vorteil, dass eine Beeinflussung der Messergebnisse durch verschiedene Effizienzen der PCR-Reaktion und dem Schwellenwert, ab welchem die Reaktion einem

exponentiellen Verlauf folgt (*threshold cycle*), die DNA-Menge in Relation zum Referenzgen und zur Standardprobe quantifiziert werden kann.

Die Normalisierung auf das ubiquitär, homogen exprimierte Referenzgen GAPDH bietet den Vorteil, die Varianz der Ergebnisse zu reduzieren. Bekanntlich können Gewebe- und Matrixeffekte, unterschiedliche mRNA-Extraktionseffizienzen und Fehler innerhalb der reversen Transkription die Ergebnisse beeinflussen (PFAFFL 2001).

4.2.3. Spezifitätsprüfung von SYBR-Green durch Schmelzkurvenanalyse und Gelelektrophorese

Der zur Detektion der DNA-Konzentration im PCR-Produkt angewandte Fluoreszenzfarbstoff SYBR-Green bindet unspezifisch an Doppelstrang-DNA und emittiert Licht bekannter Wellenlängen proportional zur replizierten DNA-Menge. Hierbei bindet SYBR-Green unspezifisch an Doppelstrang-DNA, sodass das Messergebnis unspezifisch verfälscht werden kann (SCHNEEBERGER et al. 1995).

Eine hohe Spezifität bietet der Fluoreszenzfarbstoff Taq-Man. Auf eine Spezifitätsprüfung, wie bei Anwendung von SYBR-Green notwendig, kann verzichtet werden. Auch bei unspezifischer Primerwahl garantiert eine hochsequenzspezifische Sonde die spezifische Freisetzung des Fluoreszenzsignals. Das Signal wird nur bei Amplifikation durch die Taq-Polymerase frei und nicht schon bei alleiniger Bindung an Doppelstrang-DNA. Im Hinblick auf die Sensitivität ist der Taq-Man-Assay der SYBR-Green-Methode aber unterlegen (SCHMITTGEN et al. 2000).

Um also eine adäquate Spezifität bei Anwendung von SYBR-Green zu gewährleisten, wurde nach jedem PCR-Versuch eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, um in der PCR-Reaktion fehlerhaft entstandene unspezifische Produkte ausschließen zu können (RIRIE et al. 1997). So kann die Verfälschung der Messergebnisse durch die Bindung des Farbstoffs an unspezifische Produkte ausgeschlossen werden (SCHNEEBERGER et al. 1995). Bei Verdacht auf eine unspezifische PCR-Reaktion und somit abweichende Basenpaarlängen wurden die PCR-Produkte mittels Gelelektrophorese nachkontrolliert. Somit konnten PCR-Produkte mit abweichender Basenpaarlänge einer späteren Auswertung entzogen werden.

Insofern kann im Rahmen dieser Arbeit mit den hier verwendeten Methoden die Auswertung unspezifischer Reaktionsprodukte ausgeschlossen werden.

4.2.4. Einschränkungen

Die real-time PCR erlaubt die Beurteilung der Genexpression auf mRNA-Ebene. Die Translation in der Proteinbiosynthese, sowie sich anschließende Regulationsmechanismen, können mit dieser Methode nicht erfasst werden. In der Literatur wird jedoch auch von Regulationsmechanismen der Connexine berichtet, welche sich erst auf Proteinebene vollziehen (LANGLOIS et al. 2010). Beispielsweise war trotz reduzierter Connexinkonzentration eine normale Translation auf mRNA-Ebene auffällig (XIA et al. 2009).

Grundsätzlich gilt zu beachten, dass eine unveränderte Connexinexpression auf mRNA-Ebene in Tumor- sowie Schleimhautproben posttranslational auch zu einer unveränderten Proteinsynthese führen kann. Im Umkehrschluss allerdings kann bei Regulation auf mRNA-Ebene auch von Unterschieden im Proteinmuster ausgegangen werden.

Mögliche posttranskriptionale Effekte der beschriebenen Connexinexpressionsmuster bleiben Gegenstand zukünftiger Untersuchungen.

4.3. Makroskopie, Histologie und Inflammation

Krebserkrankungen führen zu Veränderungen auf verschiedenen Ebenen der Gewebearchitektur. Aus diesem Grund wurde zusätzlich zu der Analyse auf molekularbiologischer Ebene auch die markoskopische und histologische Ebene auf einen möglichen Karzinogeneffekt überprüft. Der weiterhin untersuchte Inflammationsgrad spiegelt die gewebeeigene Reaktion des Gesamtorganismus auf die Karzinogenese wider.

Der DMBA-Karzinogeneffekt in der Makroskopie war als konstant progredienter Prozess nachvollziehbar. Zu Beginn imponierte der Effekt als Rötung, später deutlich in Form von Schleimhautvergröberung und exophytischem Wachstum. Alle mit DMBA-behandelten Wangentaschen wiesen im Laufe des Versuches zeitgleich ähnliche Veränderungen auf. Die Mineralöl- und Leerkontrollen waren während des gesamten Versuches makroskopisch mit gesundem Gewebe vergleichbar, welches die DMBA-spezifische Wirkung aufzeigt.

Die histologische Untersuchung zeigte ebenfalls deutlich progrediente Veränderungen, die auf eine Karzinogenität hinweisen. In Abhängigkeit von der Behandlungsdauer wiesen die Präparate in den ersten 10 Wochen vermehrt hyperplastische Veränderungen, wie Hyperkeratosen und Hyperplasien auf. In den späteren Untersuchungswochen dominierten neoplastische Veränderungen, wie Dysplasien, Mikroinvasivität und gut bis mäßig differenzierte Plattenepithelkarzinome. Eine zunehmende Malignität und Invasivität war zu verzeichnen.

Zur histologischen Kontrolle wurden jedem Versuchstier aus der kontralateralen Wangentasche gleichermaßen Schleimhautproben entnommen und analysiert. Auf beiden Ebenen, makroskopisch und mikroskopisch, wurden die genannten Ausprägungen nicht beobachtet. Eine Generalisation der rechtslokalisierten Behandlung wurde somit ausgeschlossen. Veränderungen durch andere nichtvorhersehbare, außerexperimentelle Einflüsse waren ebenfalls nicht nachweisbar. Alle Präparate waren mit gesunden Präparaten vergleichbar.

Zur Erfassung der gewebeeigenen Reaktion wurde der Inflammationsgrad in Form von Entzündungszellen histologisch erfasst und zeigte ein vergleichbares Muster. Mit dem Fortschreiten der Tumorerkrankung verstärkte sich die Leukozyteninfiltration und somit der Grad der Entzündungsreaktion. Da die Inflammation nach 14 Wochen DMBA-Behandlung und weiteren 5 Wochen Tumorwachstum ohne Behandlung am stärksten ausgeprägt war, kann davon ausgegangen werden, dass nicht das DMBA, sondern der progrediente Tumor Ursache der Inflammation war.

Der Karzinogeneffekt durch DMBA-Applikation war auf den drei untersuchten Ebenen gut nachweisbar. Eine zeitliche Abhängigkeit wurde bestätigt und eine Generalisierung, als weiteres Maß des Versuchserfolges, ausgeschlossen.

4.4. Connexinexpressionsmuster

Die mittels RNA-Isolation und real-time PCR generierten mRNA-Expressionsanalysen von Connexin 26, 43 und 45 zeigten für Connexin 26 und 45 eine signifikante Zunahme der Genexpression im Tumorgewebe. Die Expression beider Connexine zeigte sich hier im Gegensatz zu den nicht mit DMBA behandelten Kontrollen, die keine Expressionsveränderungen aufwiesen, bereits nach 10 Wochen (Regime A) hochreguliert. Darauf folgend blieb ihre Expression konstant erhöht. Diese frühe Regulation lässt für beide Kanalproteine einen Beitrag während der Induktion des oralen Plattenepithelkarzinoms vermuten.

Die Expression von Connexin 43 zeigte sich während des gesamten Versuchs auf mRNA-Niveau unverändert.

Bezogen auf Connexinregulation, DMBA-Effekt und Tumorentstehung müssen aber einige Dinge beachtet werden. So ist es theoretisch möglich, dass DMBA eigenständig und unabhängig von Prozessen der Tumorinitiation die Connexinregulation beeinflussen kann. Dem aber entgegenzusetzen ist die Tatsache, dass in den fünf Wochen Tumorwachstum nach 14-wöchiger DMBA-Behandlung (Regime C) die Connexinexpression stabil blieb. Die von uns als verändert beobachtete Connexinexpression ist somit auf die Tumorerkrankung zurückzuführen. Andernfalls hätte es unter dem 5-wöchigen Aussetzen der DMBA-Behandlung ohne DMBA zu einer Normalisierung der Expression kommen müssen.

4.4.1. Korrelation der Expression mit Grading, Behandlungsregimen und Behandlungsdauer

Beim Vergleich von Connexinexpression und histopathologischem Grading konnte keine Korrelation nachgewiesen werden. Da aber nur 27 Proben wegen ihrer Dimensionen eine histologische Untersuchung zuließen und diese mit insgesamt 7 verschiedenen histologischen Befundarten korreliert wurden, können bei dieser Betrachtung gegebenenfalls aufgrund eines zu geringen Stichprobenumfangs falschnegative Ergebnisse vorliegen.

Die Connexinexpressionen wurden außerdem mit der Behandlungsdauer korreliert, um deren Zeitabhängigkeit zu prüfen und einen möglichen Wocheneffekt zu erfassen. Die Länge der Versuchsdauer zeigte aber keinen Einfluss auf die Regulation. Somit wurden die Expressionsergebnisse der Behandlungsgruppen (DMBA, Mineralöl und Leerkontrolle) aller drei Regime (A, B und C) zusammengefasst, um den Gruppeneffekt zu prüfen. Hier konnten bei dem angewandten Paarvergleich signifikante Unterschiede festgestellt werden. Die frühe und anschließend konstante Überexpression von Connexin 26 und 45 in den mit DMBA behandelten und somit karzinogen veränderten Geweben lässt für die untersuchten Connexine eine Beteiligung an der Tumorinitiation vermuten.

Dieser Hinweis auf eine Beteiligung an der Tumorentstehung lässt sich in den Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe an humanen Proben wiederfinden. Auch hier ist für die Regulation von Connexin 26 und 45 keine Stadienabhängigkeit zu erkennen, alleinig eine früh veränderte Expression (BRODMANN 2012).

4.4.2. Connexin 26

Connexin 26 (Cx26) ist als Subtyp der Connexinfamilie hauptsächlich in Hepatozyten, Keratozyten und den Sinnesepithelzellen der Cochlea vertreten (LAIRD 2006). Congenitale Schwerhörigkeit und hyperkeratotische Entwicklungsstörungen sind mit über 100 verschiedenen Cx26-Mutationen assoziiert (GERIDO und WHITE 2004, LAIRD 2006). Für eine Reihe von Brustkrebszelllinien wird Connexin 26 eine tumorsupprimierende (LEE SW et al. 1991) und wachstumshemmende (LEE HJ et al. 2002) Wirkung zugeschrieben. In Mammakarzinomzelllinien wurde weiterhin bei Induktion der Cx26-vermittelten Zell-Zell-Kommunikation ein Malignitätsrückgang beobachtet (MOMIYAMA et al. 2003). Zusätzlich kann Connexin 26 hier die Expression von Angiogenese regulierenden Genen GJIC-abhängig und –unabhängig beeinflussen (QIN et al. 2003).

In-vivo- und in-vitro-Experimente an oralen Plattenepithelkarzinomen ergaben bisher widersprüchliche Ergebnisse. An 13 Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren wurde eine unveränderte Expression beobachtet (OZAWA et al. 2007), und in in-vitro-Versuchen an Plattenepithelkarzinomzelllinien war es nicht nachweisbar (FRANK et al. 2006). In einer anderen Studie aber wurde Connexin 26 in Malignomen von 12 Patienten mit gleicher Erkrankung als überexprimiert beschrieben (VILLARET et al. 2000), was mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit vergleichbar ist. Im Gegensatz hierzu zeigen unveröffentlichte Daten unserer Abteilung, dass Connexin 26 in humanen Plattenepithelkarzinombiopsaten tendenziell, aber nicht signifikant unterexprimiert wird. Interessant sind die veränderten Regulationen insofern, dass der karzinogene Effekt auf die Kanalproteine nachgewiesen ist, sei es als Hoch- oder Herunterregulation. Die beobachtete starke Varianz innerhalb der Versuche unserer Abteilung lässt vermuten, dass durch eine höhere Stichprobenzahl einheitlichere Ergebnisse erzielt werden könnten. Dies bleibt aber Gegenstand zukünftiger Untersuchungen.

Zudem ausstehend ist ein weiterführender Einblick in die zeitliche Abhängigkeit. Von uns konnte eine Hochregulation zu Beginn der Tierversuche, höchstwahrscheinlich Zeitpunkt der Tumorinitiation, beschrieben Keine zum werden. Regulationsveränderung aber wurde im Laufe der Versuche, also in späteren Tumorerkrankung, gefunden. Kontinuierliche. Stadien der wiederholte Genexpressionsanalysen um den Zeitpunkt der Tumorinitiation sollten angestrebt werden, Kenntnisse über das Regulationsverhalten um genauere bei Tumorentstehung zu gewinnen. Im Rahmen einer längerfristigen Behandlung können spätere, von uns nicht erfasste Expressionsveränderungen erfasst, und eine genauere Kenntnis über Unterschiede zwischen den Tumorstadien erlangt werden. Ein Zusammenhang zwischen oralem Plattenepithelkarzinom und Connexin 26 ist weiterhin zu vermuten und sollte im Sinne der erstrebenswerten Therapie- und Prognoseverbesserung über die bisherigen Kenntnisse hinaus erforscht werden. Welche Form der Regulationsveränderung vorliegt und welchen zeitlichen Verlauf die Cx26-Expression nimmt, bleibt zu klären.

4.4.3. Connexin 43

Connexin 43 (Cx43) ist im Menschen ubiquitär vorkommend. Es ist kardial der häufigste Connexinsubtyp und in Zusammenschluss mit Connexin 45 für die synchrone Kontraktion des Ventrikelmyokards verantwortlich (VERHEULE et al. 1997). Das Kanalprotein wird in Astrozyten exprimiert und wurde bislang in den meisten astroglialen Komponenten glioneuronaler Tumoren, Astrozytomen und Epilepsie-assoziierten Hirntumoren nachgewiesen (ARONICA et al. 2001). An Astrozyten aus Cx43-defizienten Mäusen konnte gezeigt werden, dass je nach Höhe der Cx43-Expression über 250 Gene eine veränderte Expression aufwiesen. Es handelt sich hierbei unter anderem um Transkriptionsfaktoren und Gene, die an Apoptose und Zellwachstum beteiligt sind (IACOBAS et al. 2003, IACOBAS et al. 2004). Für die pleiotrope Entwicklungsstörung der okulodentodigitalen Dysplasie gilt die autosomal dominant vererbte Frameshift-Mutation von Connexin 43 als Ursache (PAZNEKAS et al. 2003).

Connexin 43 ist von allen Connexinen das am umfangreichsten untersuchte Kanalprotein und wird über eine Vielzahl von Mechanismen mit Tumorgenese und Tumorprogression unterschiedlicher Tumorentitäten assoziiert. Seine genaue Rolle ist aber weiterhin nicht vollends erforscht.

Connexin 43 wird einerseits eine <u>onkogene</u> Potenz zugeschrieben. In Melanomen zum Beispiel begünstigt Connexin 43 die Fähigkeit zur Metastasierung. Im Rahmen der Hochregulation des Protease-aktivierten Rezeptor-1 (PAR-1), ein Schlüsselprotein im Prozess der Melanommetastasierung, wird konsekutiv das Kanalprotein in höheren Konzentrationen nachgewiesen. Bei PAR-1-Depletion verschwindet auch Connexin 43 (VILLARES et al. 2009). In hepatischen Karzinomzelllinien wirkt es durch Hemmung der interzellulären Kommunikation malignitätsverstärkend (ZHANG D et al. 2007).

In mehreren Fällen konnten Zusammenhänge zwischen Connexin 43 und Tumorzellmotilität, sowie Invasivitätsgrad, beschrieben werden. So korreliert in Gliomzellen der Cx43-Expressionsgrad positiv mit diesen Tumoreigenschaften (BATES et al. 2007). Im Hinblick auf Metastasierung wurde beobachtet, dass Connexin 43 (und Connexin 26) in Lymphknotenmetastasen des Mammakarzinoms exprimiert wird, im Primarius hingegen aber nicht nachweisbar ist (KANCZUGA-KODA et al. 2006). Wiederum scheint in Mammakarzinomen die Cx43-Expression (und Cx26-Expression) vor Neoangiogenese zu schützen (SHAO et al. 2005).

Andererseits aber, aufgrund gegensätzlicher Ergebnisse, werden dem Kanalprotein wegen der mit ihm assoziierten Proliferationshemmung auch tumorsupprimierende Eigenschaften zugeschrieben. Hierfür spricht zum einen die unter Einfluss von Connexin 43 stehende Herunterregulation von Onkoproteinen (wie Skp-2) und zum anderen die Hochregulation von Tumorsuppressorproteinen (wie p27) (ZHANG YW et al. 2001, ZHANG YW et al. 2003). Weiterhin wird diskutiert, ob Connexin 43 in unterschiedlichen Zelllinien, wie zum Beispiel Leberzelllinien, durch einen Lokalisationswechsel von der Zellmembran in den Nukleus direkt Einfluss auf die Genexpression nimmt (DE FEIJTER et al. 1996) und über das C-terminale Ende Zellwachstum direkt hemmen kann (DANG et al. 2003). In maligne transformierten Keratinozyten der Ratte wird Connexin 43 als herunterreguliert nachgewiesen und gleichzeitig seine Interaktion mit dem Tumorsuppressor Caveolin-1 (Cav-1) als vermindert beobachtet. In humanen Plattenepithelkarzinomen ist diese Cx43/Cav-1-Kolonisation nicht mehr nachweisbar (LANGLOIS et al. 2010). Auffallend ist in Zungenkarzinomen der Ratte eine normale Translation auf m-RNA-Ebene trotz reduzierter Proteinkonzentration (XIA et al. 2009).

Dies sind nur wenige Beispiele, die aufzeigen, wie die Cx43-Expression das Tumorwachstum und die Tumorprogression positiv oder negativ beeinflussen kann.

Unsere Ergebnisse zeigen Connexin 43 in der Karzinogenese als unverändert exprimiert, welches mit den unveröffentlichten Daten unserer Arbeitsgruppe an humanen oralen Plattenepithelkarzinombiopsaten übereinstimmt. Demzufolge scheint Connexin 43 zunächst keine Relevanz für die Karzinogenese von oralen Plattenepithelkarzinomen zu haben. Da aber unsere Ergebnisse die Cx43-Expression auf RNA-Ebene widerspiegeln, können keine sicheren Rückschlüsse auf seine Regulation und Funktion auf Proteinebene erzielt werden. Als heteromere Cx45/Cx43-Gap-Junction zum Bespiel kann Connexin 43 als Kanalprotein eine deutlich veränderte Durchlässigkeit aufweisen und lässt eine Einflussnahme auf die Karzinogenese durch Reduktion der Zell-Zell-Kommunikation vermuten (BUKAUSKAS et al. 2002). Weiterhin können posttranskriptionelle Änderungen auf Cx43-Proteinebene durch alleinige mRNA-Analyse nicht registriert werden. Außerdem kann der Versuch aufgrund des beschränkten Beobachtungszeitraumes mögliche späte mRNA- und Proteinveränderungen nicht erfassen.

Um bezüglich der zellulären Connexinlokalisation und –interaktion mit anderen Connexinen und zellulären Proteinen genauere Aussagen machen zu können, sollten unter Anwendung der Immunhistochemie weitere Kenntnisse gewonnen werden. Eine verlängerte Versuchsdauer wird diskutiert.

4.4.4. Connexin 45

Connexin 45 kann im Juxtaglomerulären Apparat nachgewiesen werden und ist an der Reninsekretion und renalen Blutdruckregulation beteiligt (HANNER et al. 2008). Weiterhin wird es im Ventrikelmyokard exprimiert und bei Herzinsuffizienz hochreguliert, wobei Connexin 43 gleichzeitig vermindert exprimiert wird (YAMADA et al. 2003). In herzinsuffizientem Myokard ist, je schwerer die Ausprägung, die Gap-Junction-Kopplung aufgehoben. Die Erregungsleitung ist somit verzögert, welches ventrikuläre Arrhythmien begünstigt. Hierdurch werden wiederum der Schweregrad der Herzinsuffizienz und das Risiko für den konsekutiven plötzlichen Herztod begünstigt (YAMADA et al. 2003, BETSUYAKU et al. 2006).

Im Ventrikelmyokard wird der Cx43/Cx45-Koexistenz eine regulierende Wirkung auf die Kanaldurchlässigkeit zugeschrieben, wobei diese Wirkung auf Konzentrationsverschiebungen zurückzuführen ist. Wie in herzinsuffizientem Myokard beobachtet, nimmt bei Cx43-Abnahme und Cx45-Zunahme die Größe der Gap-Junctions ab. Durch Versuche an Hepatozyten der Ratte, die diesen Zusammenhang beleuchten sollten, konnte gezeigt werden, dass bei Induktion von Connexin 45 der Kanaldurchmesser der Gap-Junctions um 15 – 20 % verkleinert (GRIKSCHEIT et al. 2008) und die Diffusionskapazität für kationischen Fluoreszenzfarbstoff reduziert war (KOVAL et al. 1995). Diese Ergebnisse lassen

einen Zusammenhang zwischen Cx45-Überexpression und verminderter GJIC vermuten.

Über die Cx45-Beteiligung an der Karzinogenese ist nur sehr wenig bekannt. In gesundem Lungengewebe und fortschreitenden primären Lungenkarzinomen der Maus konnte Connexin 45 nachgewiesen werden, nicht aber in kleineren Tumoren (UDAKA et al. 2007). Dies lässt eventuell eine differentielle Regulation in terminalen Tumorstadien vermuten.

An humanen gesunden Lungenfibroblasten und Lungenkarzinomzelllinien wurde die homo- und heteromere Cx45/Cx43-Kopplung untersucht. Es ließen sich deutliche Unterschiede zwischen der GJIC in gesundem und erkranktem Gewebe nachweisen, die eine wichtige Rolle in der Regulation der Zellproliferation vermuten lassen (ZHANG ZQ et al. 2004).

Bezüglich Connexin 45 sind also zwei Eigenschaften von möglicher Bedeutung. Zum einen ist seine Funktion in karzinogenen Prozessen zu prüfen. Zum anderen bleibt zu untersuchen, inwiefern seine Koexistenz mit Connexin 43 die Tumorprogression fördert.

Unveröffentlichte Daten unserer Arbeitsgruppe zeigen Connexin 45 in humanen oralen Plattenepithelbiopsaten als stark überexprimiert, was mit den Ergebnissen dieser Arbeit korreliert. Im Hinblick auf weiterführende in-vivo-Untersuchungen zur Rolle des Connexin 45 in der oralen Karzinogenese kann demnach das DMBA-Hamstermodell als geeignet angesehen werden.

5. Zusammenfassung

Ziel der hier vorliegenden Arbeit war die Evaluierung eines reproduzierbaren Tiermodells zur Untersuchung der Genexpression von Connexin 26, 43 und 45 in oralen Plattenepithelkarzinomen während der Karzinogenese, um dann die Rolle der genannten Kanalproteine in humanen oralen Malignomen weiterführend untersuchen zu können.

Die für Connexin 26 und 45 beobachtete, in sehr frühen Tumorstadien stattgefundene Hochregulation und der bereits nach 10-wöchiger DMBA-Behandlung deutliche Karzinogeneffekt in den histologisch untersuchten Präparaten lassen vermuten, dass diese Connexine im Rahmen der Tumorinitiation reguliert werden und so an der Tumorentstehung beteiligt sein können. Für Connexin 43 konnte im Rahmen dieser Arbeit keine Regulation auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden.

Bei Vergleich mit den von unserer Arbeitsgruppe generierten Expressionsanalysen an humanen Proben selbiger Tumorentität lässt sich für Connexin 43 und 45, nicht aber für Connexin 26, ein vergleichbares Expressionsverhalten nachweisen.

Für weiterführende in-vivo-Untersuchungen zur Rolle der Interaktion von Connexin 43 und 45 in der oralen Karzinogenese kann das evaluierte Tiermodell des DMBAinduzierten Wangentaschenkarzinoms des Hamsters als Ergebnis dieser Arbeit als geeignet angesehen werden.

6. <u>Abkürzungen</u>

C _T	threshold cycle
Сх	Connexin
kDa	Kilodalton
DMBA	Dimethyl-1,2-Benzanthrazen
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GJ	Gap-Junction
GJIC	Gap-Junction-vermittelte interzelluläre Kommunikation
MÖ	Mineralöl
MS	Mundschleimhaut
n. s.	nicht signifikant
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEC	Plattenepithelkarzinom
RIN	RNA integrity number
RNA	Ribonukleinsäure
WTSH	Wangentaschenschleimhaut

7. Literaturverzeichnis

Ahluwalia KP (2005): Assessing the oral cancer risk of South-Asian immigrants in New York City. Cancer <u>104</u>, 2959-2961

Alberts B, Bray D, Hopkins K, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P: Lehrbuch der Molekularen Zellbiologie; Wiley-VCH, Berlin 2005

Aronica E, Gorter JA, Jansen GH, Leenstra S, Yankaya B, Troost D (2001): Expression of connexin 43 and connexin 32 gap-junction proteins in epilepsy-associated brain tumors and in the perilesional epileptic cortex. Acta Neuropathol <u>101</u>, 449-459

Bates DC, Sin WC, Aftab Q, Naus CC (2007): Connexin43 enhances glioma invasion by a mechanism involving the carboxy terminus. Glia <u>55</u>, 1554-1564

Battegay EJ (1995): Angiogenesis: mechanistic insights, neovascular diseases, and therapeutic prospects. J Mol Med <u>73</u>, 333-346

Bennett MV, Verselis VK (1992): Biophysics of gap junctions. Semin Cell Biol 3, 29-47

Bennett MV, Spray DC, Harris AL, Ginzberg RD, Campos de Carvalho A, White RL (1982): Control of intercellular communication by way of gap junctions. Harvey Lect <u>78</u>, 23-57

Bernstein SA, Morley GE (2006): Gap junctions and propagation of the cardiac action potential. Adv Cardiol <u>42</u>, 71-85

Betsuyaku T, Nnebe NS, Sundset R, Patibandla S, Krueger CM, Yamada KA (2006): Overexpression of cardiac connexin45 increases susceptibility to ventricular tachyarrhythmias in vivo. Am J Physiol Heart Circ Physiol <u>290</u>, H163-171

Blot WJ, McLaughlin JK, Winn DM, Austin DF, Greenberg RS, Preston-Martin S, Bernstein L, Schoenberg JB, Stemhagen A, Fraumeni JF, Jr. (1988): Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. Cancer Res <u>48</u>, 3282-3287

Brodmann T: Eine vergleichende Genexpressionsanalyse von Gap-Junction-Strukturproteinen in oralen Plattenepithelkarzinomen und gesunder Schleimhaut. Med. Diss. Göttingen 2012

Bukauskas FF, Angele AB, Verselis VK, Bennett MV (2002): Coupling asymmetry of heterotypic connexin 45/ connexin 43-EGFP gap junctions: properties of fast and slow gating mechanisms. Proc Natl Acad Sci U S A <u>99</u>, 7113-7118

Caspar DL, Goodenough DA, Makowski L, Phillips WC (1977): Gap junction structures. I. Correlated electron microscopy and x-ray diffraction. J Cell Biol <u>74</u>, 605-628

Castellsague X, Quintana MJ, Martinez MC, Nieto A, Sanchez MJ, Juan A, Monner A, Carrera M, Agudo A, Quer M et al. (2004): The role of type of tobacco and type of alcoholic beverage in oral carcinogenesis. Int J Cancer <u>108</u>, 741-749

Cavenee WK, Dryja TP, Phillips RA, Benedict WF, Godbout R, Gallie BL, Murphree AL, Strong LC, White RL (1983): Expression of recessive alleles by chromosomal mechanisms in retinoblastoma. Nature <u>305</u>, 779-784

Chen JT, Cheng YW, Chou MC, Sen-Lin T, Lai WW, Ho WL, Lee H (2003): The correlation between aberrant connexin 43 mRNA expression induced by promoter methylation and nodal micrometastasis in non-small cell lung cancer. Clin Cancer Res <u>9</u>, 4200-4204

Chen SC, Pelletier DB, Ao P, Boynton AL (1995): Connexin43 reverses the phenotype of transformed cells and alters their expression of cyclin/cyclin-dependent kinases. Cell Growth Differ <u>6</u>, 681-690

Chissoe SL, Bodenteich A, Wang YF, Wang YP, Burian D, Clifton SW, Crabtree J, Freeman A, Iyer K, Jian L et al. (1995): Sequence and analysis of the human ABL gene, the BCR gene, and regions involved in the Philadelphia chromosomal translocation. Genomics <u>27</u>, 67-82

Cohen-Salmon M, Ott T, Michel V, Hardelin JP, Perfettini I, Eybalin M, Wu T, Marcus DC, Wangemann P, Willecke K et al. (2002): Targeted ablation of connexin26 in the inner ear epithelial gap junction network causes hearing impairment and cell death. Curr Biol <u>12</u>, 1106-1111

Cronier L, Crespin S, Strale PO, Defamie N, Mesnil M (2009): Gap junctions and cancer: new functions for an old story. Antioxid Redox Signal <u>11</u>, 323-338

Cruciani V, Heintz KM, Husoy T, Hovig E, Warren DJ, Mikalsen SO (2004): The detection of hamster connexins: a comparison of expression profiles with wild-type mouse and the cancer-prone Min mouse. Cell Commun Adhes <u>11</u>, 155-171

Dang X, Doble BW, Kardami E (2003): The carboxy-tail of connexin-43 localizes to the nucleus and inhibits cell growth. Mol Cell Biochem <u>242</u>, 35-38

de Bono JS, Rowinsky EK (2002): The ErbB receptor family: a therapeutic target for cancer. Trends Mol Med <u>8</u>, S19-26

de Feijter AW, Matesic DF, Ruch RJ, Guan X, Chang CC, Trosko JE (1996): Localization and function of the connexin 43 gap-junction protein in normal and various oncogene-expressing rat liver epithelial cells. Mol Carcinog <u>16</u>, 203-212

Diaz-Flores L, Gutierrez R, Varela H (1994): Angiogenesis: an update. Histol Histopathol 9, 807-843

Driman D, Thorner PS, Greenberg ML, Chilton-MacNeill S, Squire J (1994): MYCN gene amplification in rhabdomyosarcoma. Cancer <u>73</u>, 2231-2237

Duffy HS, Iacobas I, Hotchkiss K, Hirst-Jensen BJ, Bosco A, Dandachi N, Dermietzel R, Sorgen PL, Spray DC (2007): The gap junction protein connexin32 interacts with the Src homology 3/hook domain of discs large homolog 1. J Biol Chem <u>282</u>, 9789-9796

Elias LA, Wang DD, Kriegstein AR (2007): Gap junction adhesion is necessary for radial migration in the neocortex. Nature <u>448</u>, 901-907

Elzay RP (1966): Local effect of alcohol in combination with DMBA on hamster cheek pouch. J Dent Res <u>45</u>, 1788-1795

Evan GI, Littlewood TD (1993): The role of c-myc in cell growth. Curr Opin Genet Dev 3, 44-49

Fakhry C, Gillison ML (2006): Clinical implications of human papillomavirus in head and neck cancers. J Clin Oncol <u>24</u>, 2606-2611

Fallon RF, Goodenough DA (1981): Five-hour half-life of mouse liver gap-junction protein. J Cell Biol <u>90</u>, 521-526

Ferrara N, Gerber HP (2001): The role of vascular endothelial growth factor in angiogenesis. Acta Haematol <u>106</u>, 148-156

Forastiere AA, Trotti A, Pfister DG, Grandis JR (2006): Head and neck cancer: recent advances and new standards of care. J Clin Oncol <u>24</u>, 2603-2605

Frank DK, Szymkowiak B, Hughes CA (2006): Connexin expression and gap junctional intercellular communication in human squamous cell carcinoma of the head and neck. Otolaryngol Head Neck Surg <u>135</u>, 736-743

Fu CT, Bechberger JF, Ozog MA, Perbal B, Naus CC (2004): CCN3 (NOV) interacts with connexin43 in C6 glioma cells: possible mechanism of connexin-mediated growth suppression. J Biol Chem <u>279</u>, 36943-36950

Fushiki S, Perez Velazquez JL, Zhang L, Bechberger JF, Carlen PL, Naus CC (2003): Changes in neuronal migration in neocortex of connexin43 null mutant mice. J Neuropathol Exp Neurol <u>62</u>, 304-314

Gaietta G, Deerinck TJ, Adams SR, Bouwer J, Tour O, Laird DW, Sosinsky, Tsien RY, Ellisman MH (2002): Multicolor and electron microscopic imaging of connexin trafficking. Science <u>296</u>, 503-507

Gale N, Pilch, B.Z., Sidransky, D., Westra, W.H., Califano, J: Epithelial precursor lesions. In: Barnes , L., Eveson, J.W., Reichert, P., Sidransky; D. (eds.) World Health Organization classification of tumors. Pathology and genetics of head and neck tumors. IACR, Lyon 2005, 140-143

Gartner C, Ziegelhoffer B, Kostelka M, Stephan H, Mohr FW, Dhein S (2011): Knock-down of endothelial connexins impairs angiogenesis. Pharmacol Res., Leipzig 2012, 347-357

Gellhaus A, Dong X, Propson S, Maass K, Klein-Hitpass L, Kibschull M, Traub O, Willecke K, Perbal B, Lye SJ et al. (2004): Connexin43 interacts with NOV: a possible mechanism for negative regulation of cell growth in choriocarcinoma cells. J Biol Chem <u>279</u>, 36931-36942

Gerido DA, White TW (2004): Connexin disorders of the ear, skin, and lens. Biochim Biophys Acta <u>1662</u>, 159-170

Gilula NB, Epstein ML, Beers WH (1978): Cell-to-cell communication and ovulation. A study of the cumulus-oocyte complex. J Cell Biol <u>78</u>, 58-75

Goldberg GS, Bechberger JF, Tajima Y, Merritt M, Omori Y, Gawinowicz MA, Narayanan R, Tan Y, Sanai Y, Yamasaki H et al. (2000): Connexin43 suppresses MFG-E8 while inducing contact growth inhibition of glioma cells. Cancer Res <u>60</u>, 6018-6026

Goodenough DA, Goliger JA, Paul DL (1996): Connexins, connexons, and intercellular communication. Annu Rev Biochem <u>65</u>, 475-502

Goy J, Hall SF, Feldman-Stewart D, Groome PA (2009): Diagnostic delay and disease stage in head and neck cancer: a systematic review. Laryngoscope <u>119</u>, 889-898

Graeber SH, Hulser DF (1998): Connexin transfection induces invasive properties in HeLa cells. Exp Cell Res <u>243</u>, 142-149

Greenlee RT, Murray T, Bolden S, Wingo PA (2000): Cancer statistics, 2000. CA Cancer J Clin <u>50</u>, 7-33

Grikscheit K, Thomas N, Bruce AF, Rothery S, Chan J, Severs NJ, Dupont E (2008): Coexpression of connexin 45 with connexin 43 decreases gap junction size. Cell Commun Adhes <u>15</u>, 185-193

Hanahan D, Weinberg RA (2000): The hallmarks of cancer. Cell 100, 57-70

Hanahan D, Weinberg RA (2011): Hallmarks of cancer: the next generation. Cell <u>144</u>, 646-674

Hanner F, von Maltzahn J, Maxeiner S, Toma I, Sipos A, Kruger O, Willecke K, Peti-Peterdi J (2008): Connexin45 is expressed in the juxtaglomerular apparatus and is involved in the regulation of renin secretion and blood pressure. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol <u>295</u>, R371-380

Hellquist H, Cardesa A, Gale N, Kambic V, Michaels L (1999): Criteria for grading in the Ljubljana classification of epithelial hyperplastic laryngeal lesions. A study by members of the Working Group on Epithelial Hyperplastic Laryngeal Lesions of the European Society of Pathology. Histopathology <u>34</u>, 226-233

Hertzberg EL, Disher RM, Tiller AA, Zhou Y, Cook RG (1988): Topology of the Mr 27,000 liver gap junction protein. Cytoplasmic localization of amino- and carboxyl termini and a hydrophilic domain which is protease-hypersensitive. J Biol Chem <u>263</u>, 19105-19111

Herve JC, Bourmeyster N, Sarrouilhe D (2004): Diversity in protein-protein interactions of connexins: emerging roles. Biochim Biophys Acta <u>1662</u>, 22-41

Hopperstad MG, Srinivas M, Spray DC (2000): Properties of gap junction channels formed by Cx46 alone and in combination with Cx50. Biophys J <u>79</u>, 1954-1966

Huang GY, Cooper ES, Waldo K, Kirby ML, Gilula NB, Lo CW (1998): Gap junction-mediated cell-cell communication modulates mouse neural crest migration. J Cell Biol <u>143</u>, 1725-1734

Huang RP, Fan Y, Hossain MZ, Peng A, Zeng ZL, Boynton AL (1998): Reversion of the neoplastic phenotype of human glioblastoma cells by connexin 43 (cx43). Cancer Res <u>58</u>, 5089-5096

Huizinga JD, Liu LW, Blennerhassett MG, Thuneberg L, Molleman A (1992): Intercellular communication in smooth muscle. Experientia <u>48</u>, 932-941

Iacobas DA, Urban-Maldonado M, Iacobas S, Scemes E, Spray DC (2003): Array analysis of gene expression in connexin-43 null astrocytes. Physiol Genomics <u>15</u>, 177-190

lacobas DA, Scemes E, Spray DC (2004): Gene expression alterations in connexin null mice extend beyond the gap junction. Neurochem Int <u>45</u>, 243-250

Iruela-Arispe ML, Lombardo M, Krutzsch HC, Lawler J, Roberts DD (1999): Inhibition of angiogenesis by thrombospondin-1 is mediated by 2 independent regions within the type 1 repeats. Circulation <u>100</u>, 1423-1431

Ito A, Katoh F, Kataoka TR, Okada M, Tsubota N, Asada H, Yoshikawa K, Maeda S, Kitamura Y, Yamasaki H et al. (2000): A role for heterologous gap junctions between melanoma and endothelial cells in metastasis. J Clin Invest <u>105</u>, 1189-1197

Ito A, Morita N, Miura D, Koma Y, Kataoka TR, Yamasaki H, Kitamura Y, Kita Y, Nojima H (2004): A derivative of oleamide potently inhibits the spontaneous metastasis of mouse melanoma BL6 cells. Carcinogenesis <u>25</u>, 2015-2022

Ito A, Koma Y, Uchino K, Okada T, Ohbayashi C, Tsubota N, Okada M (2006): Increased expression of connexin 26 in the invasive component of lung squamous cell carcinoma: significant correlation with poor prognosis. Cancer Lett <u>234</u>, 239-248

Jiang JX, Goodenough DA (1996): Heteromeric connexons in lens gap junction channels. Proc Natl Acad Sci U S A <u>93</u>, 1287-1291

Jones AS (1994): Prognosis in mouth cancer: tumour factors. Eur J Cancer B Oral Oncol <u>30B</u>, 8-15

Kallioniemi OP, Kallioniemi A, Kurisu W, Thor A, Chen LC, Smith HS, Waldman FM, Pinkel D, Gray JW (1992): ERBB2 amplification in breast cancer analyzed by fluorescence in situ hybridization. Proc Natl Acad Sci U S A <u>89</u>, 5321-5325

Kamibayashi Y, Oyamada Y, Mori M, Oyamada M (1995): Aberrant expression of gap junction proteins (connexins) is associated with tumor progression during multistage mouse skin carcinogenesis in vivo. Carcinogenesis <u>16</u>, 1287-1297

Kanczuga-Koda L, Sulkowski S, Koda M, Sulkowska M (2005): Alterations in connexin26 expression during colorectal carcinogenesis. Oncology <u>68</u>, 217-222

Kanczuga-Koda L, Sulkowski S, Lenczewski A, Koda M, Wincewicz A, Baltaziak M, Sulkowska M (2006): Increased expression of connexins 26 and 43 in lymph node metastases of breast cancer. J Clin Pathol <u>59</u>, 429-433

Kligerman J, Lima RA, Soares JR, Prado L, Dias FL, Freitas EQ, Olivatto LO (1994): Supraomohyoid neck dissection in the treatment of T1/T2 squamous cell carcinoma of oral cavity. Am J Surg <u>168</u>, 391-394

Knudson AG, Jr. (1971): Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. Proc Natl Acad Sci U S A <u>68</u>, 820-823

Koffler L, Roshong S, Kyu Park I, Cesen-Cummings K, Thompson DC, Dwyer-Nield LD, Rice P, Mamay C, Malkinson AM, Ruch RJ (2000): Growth inhibition in G(1) and altered expression of cyclin D1 and p27(kip-1) after forced connexin expression in lung and liver carcinoma cells. J Cell Biochem <u>79</u>, 347-354

Kohn EC, Francis EA, Liotta LA, Schiffmann E (1990): Heterogeneity of the motility responses in malignant tumor cells: a biological basis for the diversity and homing of metastatic cells. Int J Cancer <u>46</u>, 287-292

Kotwall C, Sako K, Razack MS, Rao U, Bakamjian V, Shedd DP (1987): Metastatic patterns in squamous cell cancer of the head and neck. Am J Surg <u>154</u>, 439-442

Koval M, Geist ST, Westphale EM, Kemendy AE, Civitelli R, Beyer EC, Steinberg TH (1995): Transfected connexin45 alters gap junction permeability in cells expressing endogenous connexin43. J Cell Biol <u>130</u>, 987-995

Kumar NM, Gilula NB (1996): The gap junction communication channel. Cell <u>84</u>, 381-388

Laing JG, Beyer EC (1995): The gap junction protein connexin43 is degraded via the ubiquitin proteasome pathway. J Biol Chem <u>270</u>, 26399-26403

Laing JG, Tadros PN, Westphale EM, Beyer EC (1997): Degradation of connexin43 gap junctions involves both the proteasome and the lysosome. Exp Cell Res <u>236</u>, 482-492

Laird DW (2006): Life cycle of connexins in health and disease. Biochem J 394, 527-543

Laird DW, Puranam KL, Revel JP (1991): Turnover and phosphorylation dynamics of connexin43 gap junction protein in cultured cardiac myocytes. Biochem J <u>273(Pt 1)</u>, 67-72

Langlois S, Cowan KN, Shao Q, Cowan BJ, Laird DW (2010): The tumor-suppressive function of Connexin43 in keratinocytes is mediated in part via interaction with caveolin-1. Cancer Res <u>70</u>, 4222-4232

Lee HJ, Lee IK, Seul KH, Rhee SK (2002): Growth inhibition by connexin26 expression in cultured rodent tumor cells. Mol Cells <u>14</u>, 136-142

Lee SW, Tomasetto C, Sager R (1991): Positive selection of candidate tumor-suppressor genes by subtractive hybridization. Proc Natl Acad Sci U S A <u>88</u>, 2825-2829

Li Q, Omori Y, Nishikawa Y, Yoshioka T, Yamamoto Y, Enomoto K (2007): Cytoplasmic accumulation of connexin32 protein enhances motility and metastatic ability of human hepatoma cells in vitro and in vivo. Int J Cancer <u>121</u>, 536-546

Liao CT, Chang JT, Wang HM, Ng SH, Hsueh C, Lee LY, Lin CH, Chen IH, Kang CJ, Huang SF et al. (2006): Surgical outcome of T4a and resected T4b oral cavity cancer. Cancer <u>107</u>, 337-344

Lin JH, Takano T, Cotrina ML, Arcuino G, Kang J, Liu S, Gao Q, Jiang L, Li F, Lichtenberg-Frate H et al. (2002): Connexin 43 enhances the adhesivity and mediates the invasion of malignant glioma cells. J Neurosci <u>22</u>, 4302-4311

Liotta LA, Stetler-Stevenson WG (1990): Metalloproteinases and cancer invasion. Semin Cancer Biol <u>1</u>, 99-106

Liotta LA, Stetler-Stevenson WG (1991): Tumor invasion and metastasis: an imbalance of positive and negative regulation. Cancer Res <u>51</u>, 5054s-5059s

Liotta LA, Stracke ML, Aznavoorian SA, Beckner ME, Schiffmann E (1991): Tumor cell motility. Semin Cancer Biol <u>2</u>, 111-114

Liu CJ, Lin SC, Chen YJ, Chang KM, Chang KW (2006): Array-comparative genomic hybridization to detect genomewide changes in microdissected primary and metastatic oral squamous cell carcinomas. Mol Carcinog <u>45</u>, 721-731

Loewenstein WR (1979): Junctional intercellular communication and the control of growth. Biochim Biophys Acta <u>560</u>, 1-65

Löffler G, Petrides PE, Heinrich PC: Biochemie und Pathobiochemie. 8. Auflage; Springer Verlag, Berlin 2006

Lowy DR, Willumsen BM (1993): Function and regulation of ras. Annu Rev Biochem 62, 851-891

Mazure NM, Chen EY, Laderoute KR, Giaccia AJ (1997): Induction of vascular endothelial growth factor by hypoxia is modulated by a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway in Ha-ras-transformed cells through a hypoxia inducible factor-1 transcriptional element. Blood <u>90</u>, 3322-3331

McCoy GD, Wynder EL (1979): Etiological and preventive implications in alcohol carcinogenesis. Cancer Res <u>39</u>, 2844-2850

McCuskey RS (2004): Anatomy of efferent hepatic nerves. Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol <u>280</u>, 821-826

McLachlan E, Shao Q, Wang HL, Langlois S, Laird DW (2006): Connexins act as tumor suppressors in three-dimensional mammary cell organoids by regulating differentiation and angiogenesis. Cancer Res <u>66</u>, 9886-9894

Mehrotra R, Yadav S (2006): Oral squamous cell carcinoma: etiology, pathogenesis and prognostic value of genomic alterations. Indian J Cancer <u>43</u>, 60-66

Mesnil M (2002): Connexins and cancer. Biol Cell 94, 493-500

Mognetti B, Di Carlo F, Berta GN (2006): Animal models in oral cancer research. Oral Oncol <u>42</u>, 448-460

Momiyama M, Omori Y, Ishizaki Y, Nishikawa Y, Tokairin T, Ogawa J, Enomoto K (2003): Connexin26-mediated gap junctional communication reverses the malignant phenotype of MCF-7 breast cancer cells. Cancer Sci <u>94</u>, 501-507

Nagini S (2009): Of humans and hamsters: the hamster buccal pouch carcinogenesis model as a paradigm for oral oncogenesis and chemoprevention. Anticancer Agents Med Chem <u>9</u>, 843-852

Neid M, Tannapfel A (2009): [Squamous intraepithelial neoplasia (WHO 2005). Precancerous lesions of the head and neck region]. HNO <u>57</u>, 181-187; quiz 188

Omori Y, Li Q, Nishikawa Y, Yoshioka T, Yoshida M, Nishimura T, Enomoto K (2007): Pathological significance of intracytoplasmic connexin proteins: implication in tumor progression. J Membr Biol <u>218</u>, 73-77

Ozawa H, Matsunaga T, Kamiya K, Tokumaru Y, Fujii M, Tomita T, Ogawa K (2007): Decreased expression of connexin-30 and aberrant expression of connexin-26 in human head and neck cancer. Anticancer Res <u>27</u>, 2189-2195

Parish CR, Jakobsen KB, Coombe DR (1992): A basement-membrane permeability assay which correlates with the metastatic potential of tumour cells. Int J Cancer <u>52</u>, 378-383

Parkin DM, Pisani P, Ferlay J (1999): Estimates of the worldwide incidence of 25 major cancers in 1990. Int J Cancer <u>80</u>, 827-841

Parsons JT, Mendenhall WM, Stringer SP, Cassisi NJ, Million RR (1997): An analysis of factors influencing the outcome of postoperative irradiation for squamous cell carcinoma of the oral cavity. Int J Radiat Oncol Biol Phys <u>39</u>, 137-148

Paznekas WA, Boyadjiev SA, Shapiro RE, Daniels O, Wollnik B, Keegan CE, Innis JW, Dinulos MB, Christian C, Hannibal MC et al. (2003): Connexin 43 (GJA1) mutations cause the pleiotropic phenotype of oculodentodigital dysplasia. Am J Hum Genet <u>72</u>, 408-418

Pepper MS, Montesano R, el Aoumari A, Gros D, Orci L, Meda P (1992): Coupling and connexin 43 expression in microvascular and large vessel endothelial cells. Am J Physiol <u>262</u>, C1246-1257

Pfaffl MW (2001): A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Res 29, e45

Pollmann MA, Shao Q, Laird DW, Sandig M (2005): Connexin 43 mediated gap junctional communication enhances breast tumor cell diapedesis in culture. Breast Cancer Res <u>7</u>, R522-534

Pomerantz J, Schreiber-Agus N, Liegeois NJ, Silverman A, Alland L, Chin L, Potes J, Chen K, Orlow I, Lee HW et al. (1998): The Ink4a tumor suppressor gene product, p19Arf, interacts with MDM2 and neutralizes MDM2's inhibition of p53. Cell <u>92</u>, 713-723

Qiagen: Purification of total RNA using the RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit. RNeasy Fibrous Tissue Handbook, Austin 2006, 14-19

Qin H, Shao Q, Thomas T, Kalra J, Alaoui-Jamali MA, Laird DW (2003): Connexin26 regulates the expression of angiogenesis-related genes in human breast tumor cells by both GJIC-dependent and - independent mechanisms. Cell Commun Adhes <u>10</u>, 387-393

Reed KE, Westphale EM, Larson DM, Wang HZ, Veenstra RD, Beyer EC (1993): Molecular cloning and functional expression of human connexin37, an endothelial cell gap junction protein. J Clin Invest <u>91</u>, 997-1004

Reichart PA, Philipsen HP (2005): Oral erythroplakia--a review. Oral Oncol 41, 551-561

Retamal MA, Froger N, Palacios-Prado N, Ezan P, Saez PJ, Saez JC, Giaume C (2007): Cx43 hemichannels and gap junction channels in astrocytes are regulated oppositely by proinflammatory cytokines released from activated microglia. J Neurosci <u>27</u>, 13781-13792

Riede U-N, Schaefer H-E: Allgemeine und spezielle Pathologie. 4. Auflage; Thieme Verlag, Stuttgart, New York 1999

Ririe KM, Rasmussen RP, Wittwer CT (1997): Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. Anal Biochem <u>245</u>, 154-160

Risau W (1990): Angiogenic growth factors. Prog Growth Factor Res 2, 71-79

Ritchie JM, Smith EM, Summersgill KF, Hoffman HT, Wang D, Klussmann JP, Turek LP, Haugen TH (2003): Human papillomavirus infection as a prognostic factor in carcinomas of the oral cavity and oropharynx. Int J Cancer <u>104</u>, 336-344

Rosenquist K, Wennerberg J, Schildt EB, Bladstrom A, Goran Hansson B, Andersson G (2005): Oral status, oral infections and some lifestyle factors as risk factors for oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. A population-based case-control study in southern Sweden. Acta Otolaryngol <u>125</u>, 1327-1336

Rosenthal DI, Lewin JS, Eisbruch A (2006): Prevention and treatment of dysphagia and aspiration after chemoradiation for head and neck cancer. J Clin Oncol <u>24</u>, 2636-2643

Ruch RJ, Trosko JE (2001): Gap-junction communication in chemical carcinogenesis. Drug Metab Rev <u>33</u>, 117-124

Saez JC, Berthoud VM, Branes MC, Martinez AD, Beyer EC (2003): Plasma membrane channels formed by connexins: their regulation and functions. Physiol Rev <u>83</u>, 1359-1400

Saez JC, Retamal MA, Basilio D, Bukauskas FF, Bennett MV (2005): Connexin-based gap junction hemichannels: gating mechanisms. Biochim Biophys Acta <u>1711</u>, 215-224

Saito-Katsuragi M, Asada H, Niizeki H, Katoh F, Masuzawa M, Tsutsumi M, Kuniyasu H, Ito A, Nojima H, Miyagawa S (2007): Role for connexin 26 in metastasis of human malignant melanoma: communication between melanoma and endothelial cells via connexin 26. Cancer <u>110</u>, 1162-1172

Salley JJ (1954): Experimental carcinogenesis in the cheek pouch of the Syrian hamster. J Dent Res <u>33</u>, 253-262

Sanchez-Garcia I (1997): Consequences of chromosomal abnormalities in tumor development. Annu Rev Genet <u>31</u>, 429-453

Schantz SP, Ostroff JS (1997): Novel approaches to the prevention of head and neck cancer. Proc Soc Exp Biol Med <u>216</u>, 275-282

Schmidt M, Hoppe F (2000): [Molecular biology and immunohistochemical prognostic markers in head and neck squamous epithelial carcinomas]. Laryngorhinootologie <u>79</u>, 719-729

Schmittgen TD, Zakrajsek BA, Mills AG, Gorn V, Singer MJ, Reed MW (2000): Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction to study mRNA decay: comparison of endpoint and real-time methods. Anal Biochem <u>285</u>, 194-204

Schneeberger C, Speiser P, Kury F, Zeillinger R (1995): Quantitative detection of reverse transcriptase-PCR products by means of a novel and sensitive DNA stain. PCR Methods Appl <u>4</u>, 234-238

Schwab M, Alitalo K, Klempnauer KH, Varmus HE, Bishop JM, Gilbert F, Brodeur G, Goldstein M, Trent J (1983): Amplified DNA with limited homology to myc cellular oncogene is shared by human neuroblastoma cell lines and a neuroblastoma tumour. Nature <u>305</u>, 245-248

Shao Q, Wang H, McLachlan E, Veitch GI, Laird DW (2005): Down-regulation of Cx43 by retroviral delivery of small interfering RNA promotes an aggressive breast cancer cell phenotype. Cancer Res <u>65</u>, 2705-2711

Simon AM, Goodenough DA, Li E, Paul DL (1997): Female infertility in mice lacking connexin 37. Nature <u>385</u>, 525-529

Sims SM, Daniel EE, Garfield RE (1982): Improved electrical coupling in uterine smooth muscle is associated with increased numbers of gap junctions at parturition. J Gen Physiol <u>80</u>, 353-375

Snow GB, Annyas AA, van Slooten EA, Bartelink H, Hart AA (1982): Prognostic factors of neck node metastasis. Clin Otolaryngol Allied Sci <u>7</u>, 185-192

Sohl G, Willecke K (2004): Gap junctions and the connexin protein family. Cardiovasc Res <u>62</u>, 228-232

Solt DB (1981): Localization of gamma-glutamyl transpeptidase in hamster buccal pouch epithelium treated with 7,12-dimethylbenz[a]anthracene. J Natl Cancer Inst <u>67</u>, 193-200

Sosinsky (1995): Mixing of connexins in gap junction membrane channels. Proc Natl Acad Sci U S A <u>92</u>, 9210-9214

Sosinsky, Nicholson BJ (2005): Structural organization of gap junction channels. Biochim Biophys Acta <u>1711</u>, 99-125

Strachan T, Read A: Moleculare Humangenetik. 3. Auflage; Elsevier GmbH, München 2005

Stryer L, Berg JM, Tymoczko JL: Stryer Biochemie. 6. Auflage; Spektrum Akademischer Verlag; Heidelberg 2007

Sun J, Ahmad S, Chen S, Tang W, Zhang Y, Chen P, Lin X (2005): Cochlear gap junctions coassembled from Cx26 and 30 show faster intercellular Ca2+ signaling than homomeric counterparts. Am J Physiol Cell Physiol <u>288</u>, C613-623

Talamini R, Franceschi S, Barra S, La Vecchia C (1990): The role of alcohol in oral and pharyngeal cancer in non-smokers, and of tobacco in non-drinkers. Int J Cancer <u>46</u>, 391-393

Tate AW, Lung T, Radhakrishnan A, Lim SD, Lin X, Edlund M (2006): Changes in gap junctional connexin isoforms during prostate cancer progression. Prostate <u>66</u>, 19-31

Udaka N, Miyagi Y, Ito T (2007): Connexin expression in mouse lung tumor. Cancer Lett 246, 224-229

Vairaktaris E, Spyridonidou S, Papakosta V, Vylliotis A, Lazaris A, Perrea D, Yapijakis C, Patsouris E (2008): The hamster model of sequential oral oncogenesis. Oral Oncol <u>44</u>, 315-324

van der Weyden L, Adams DJ (2007): The Ras-association domain family (RASSF) members and their role in human tumourigenesis. Biochim Biophys Acta <u>1776</u>, 58-85

Verheule S, van Kempen MJ, te Welscher PH, Kwak BR, Jongsma HJ (1997): Characterization of gap junction channels in adult rabbit atrial and ventricular myocardium. Circ Res <u>80</u>, 673-681

Villares GJ, Dobroff AS, Wang H, Zigler M, Melnikova VO, Huang L, Bar-Eli M (2009): Overexpression of protease-activated receptor-1 contributes to melanoma metastasis via regulation of connexin 43. Cancer Res <u>69</u>, 6730-6737

Villaret DB, Wang T, Dillon D, Xu J, Sivam D, Cheever MA, Reed SG (2000): Identification of genes overexpressed in head and neck squamous cell carcinoma using a combination of complementary DNA subtraction and microarray analysis. Laryngoscope <u>110</u>, 374-381

Vis JC, Nicholson LF, Faull RL, Evans WH, Severs NJ, Green CR (1998): Connexin expression in Huntington's diseased human brain. Cell Biol Int <u>22</u>, 837-847

Wallenius K, Lekholm U (1973): Oral cancer in rats induced by the water-soluble carcinogen 4nitrochinoline N-oxide. Odontol Revy 24, 39-48

Willecke K, Eiberger J, Degen J, Eckardt D, Romualdi A, Guldenagel M, Deutsch U, Sohl G (2002): Structural and functional diversity of connexin genes in the mouse and human genome. Biol Chem <u>383</u>, 725-737

Wittekind C, Meyer HJ, Bootz F: TNM-Klassifikation maligner Tumoren. 6. Auflage; Spinger Verlag, Heidelberg 2002

Woolgar JA, Scott J, Vaughan ED, Brown JS, West CR, Rogers S (1995): Survival, metastasis and recurrence of oral cancer in relation to pathological features. Ann R Coll Surg Engl <u>77</u>, 325-331

Wynder EL, Bross IJ, Feldman RM (1957): A study of the etiological factors in cancer of the mouth. Cancer <u>10</u>, 1300-1323

Xia J, Liu X, Tao X, Hong Y, Chen X, Dai Y, Huang Y, Cheng B (2009): Expression of gap junctional protein connexin43 during 4-nitroquinoline-1-oxide-induced rat tongue carcinogenesis. J Mol Histol <u>40</u>, 183-188

Xu X, Francis R, Wei CJ, Linask KL, Lo CW (2006): Connexin 43-mediated modulation of polarized cell movement and the directional migration of cardiac neural crest cells. Development <u>133</u>, 3629-3639

Yakushiji T, Noma H, Shibahara T, Arai K, Yamamoto N, Tanaka C, Uzawa K, Tanzawa H (2001): Analysis of a role for p16/CDKN2 expression and methylation patterns in human oral squamous cell carcinoma. Bull Tokyo Dent Coll <u>42</u>, 159-168

Yamada KA, Rogers JG, Sundset R, Steinberg TH, Saffitz JE (2003): Up-regulation of connexin45 in heart failure. J Cardiovasc Electrophysiol <u>14</u>, 1205-1212

Yamasaki H, Naus CC (1996): Role of connexin genes in growth control. Carcinogenesis <u>17</u>, 1199-1213

Zhang D, Kaneda M, Nakahama K, Arii S, Morita I (2007): Connexin 43 expression promotes malignancy of HuH7 hepatocellular carcinoma cells via the inhibition of cell-cell communication. Cancer Lett <u>252</u>, 208-215

Zhang W, DeMattia JA, Song H, Couldwell WT (2003): Communication between malignant glioma cells and vascular endothelial cells through gap junctions. J Neurosurg <u>98</u>, 846-853

Zhang YW, Morita I, Ikeda M, Ma KW, Murota S (2001): Connexin43 suppresses proliferation of osteosarcoma U2OS cells through post-transcriptional regulation of p27. Oncogene <u>20</u>, 4138-4149

Zhang YW, Kaneda M, Morita I (2003): The gap junction-independent tumor-suppressing effect of connexin 43. J Biol Chem <u>278</u>, 44852-44856

Zhang ZQ, Hu Y, Wang BJ, Lin ZX, Naus CC, Nicholson BJ (2004): Effective asymmetry in gap junctional intercellular communication between populations of human normal lung fibroblasts and lung carcinoma cells. Carcinogenesis <u>25</u>, 473-482

8. <u>Anhang</u>

8.1. Anhang A: Versuchstiere

8.1.1. Regime A: Opferung nach 10-wöchiger Behandlung am 17.08.2009

	Probengewicht	RNA-Isolation/ Nanodrop	PicoChip-RIN	cDNA
DMBA 1	45mg	187,4µg/ml	9,9	20µl aus 5,4µl RNA
(Käfig 14)		(10.9.09)	(21.9.09)	(21.9.09)
DMBA 2	45mg	281,6µg/ml	10	20µl aus 3,5µl RNA
(Käfig 14)		(10.9.09)	(21.9.09)	(21.9.09)
DMBA 3	45mg	460,8µg/ml	10	20µl aus 2,2µl RNA
(Käfig 14)		(10.9.09)	(21.9.09)	(21.9.09)
DMBA 4	45mg	617,9µg/ml	10	20µl aus 1,6µl RNA
(Käfig 14)		(10.9.09)	(21.9.09)	(21.9.09)
DMBA 5	45mg	540,2µg/ml	10	20µl aus 1,8µl RNA
(Käfig 14)		(10.9.09)	(21.9.09)	(21.9.09)
DMBA 6	30mg	64,5µg/ml	9,3	20µl aus 15µl RNA
(Käfig 13)		(21.9.09)	(22.9.09)	(12.10.09)
DMBA 7	45mg	178,7µg/ml	10	20µl aus 5,6µl RNA
(Käfig 13)		(16.9.09)	(21.9.09)	(21.9.09)
DMBA 8	45mg	280,6µg/ml	10	20µl aus 3,6µl RNA
(Käfig 13)		(16.9.09)	(21.9.09)	(21.9.09)
DMBA 9	45mg	265,3µg/ml	9,6	20µl aus 3,8µl RNA
(Käfig 13)		(2.9.09)	(4.9.09)	(4.9.09)
DMBA 10	45mg	161,1µg/ml	9,9	20µl aus 6,2µl RNA
(Käfig 13)		(16.9.09)	(21.9.09)	(21.9.09)

DMBA-Behandlung

Mineralöl-Behandlung

	Probengewicht	RNA-Isolation/ Nanodrop	PicoChip-RIN	cDNA
MÖ 1	45mg	56,6µg/ml	8,5	20µl aus 15µl RNA
(Käfig 7)		(10.9.09)	(22.9.09)	(2.10.09)
MÖ 2	30mg	57,5µg/ml	9,6	20µl aus 15µl RNA
(Käfig 7)		(23.9.09)	(28.9.09)	(2.10.09)
MÖ 3	30mg	85,8µg/ml	8,5	20µl aus 11,7µl RNA
(Käfig 7)		(23.9.09)	(28.9.09)	(2.10.09)
MÖ 4	45mg	167,4µg/ml	10	20µl aus 6,0µl RNA
(Käfig 7)		(10.9.09)	(21.9.09)	(21.9.09)
MÖ 5	45mg	174,4µg/ml	9,8	20µl aus 5,7µl RNA
(Käfig 7)		(10.9.09)	(21.9.09)	(21.9.09)
MÖ 6	45mg	302,4µg/ml	9,7	20µl aus 3,3µl RNA
(Käfig 8)		(10.9.09)	(21.9.09)	(21.9.09)
MÖ 7	30mg	88,3µg/ml	9,4	20µl aus 11,3µl RNA
(Käfig 8)		(21.9.09)	(22.9.09)	(2.10.09)
MÖ 8	45mg	110,1µg/ml	9,8	20µl aus 9,0µl RNA
(Käfig 8)		(16.9.09)	(21.9.09)	(21.9.09)
MÖ 9	45mg	360,4µg/ml	9,6	20µl aus 2,8µl RNA
(Käfig 8)		(2.9.09)	(4.9.09)	(4.9.09)
MÖ 10	30mg	65,5µg/ml	9,6	20µl aus 15µl RNA
(Käfig 8)		(21.9.09)	(22.9.09)	(12.10.09)

	Probengewicht	RNA-Isolation/ Nanodrop	PicoChip-RIN	cDNA
Kontrolle 1	45mg	373,1µg/ml	9,8	20µl aus 2,7µl RNA
(Käfig 1)		(10.9.09)	(22.9.09)	(2.10.09)
Kontrolle 2	45mg	165,5µg/ml	10	20µl aus 6,0µl RNA
(Käfig 1)		(10.9.09)	(22.9.09)	(2.10.09)
Kontrolle 3	30mg	212,9µg/ml	10	20µl aus 5,0µl RNA
(Käfig 1)		(23.9.09)	(2.10.09)	(13.10.09)
Kontrolle 4	45mg	175,6µg/ml	10	20µl aus 5,7µl RNA
(Käfig 1)		(10.9.09)	(22.9.09)	(2.10.09)
Kontrolle 5	30mg	112,8µg/ml	9,8	20µl aus 8,9µl RNA
(Käfig 1)		(23.9.09)	(28.9.09)	(2.10.09)
Kontrolle 6	45mg	211,9µg/ml	10	20µl aus 4,7µl RNA
(Käfig 2)		(10.9.09)	(22.9.09)	(2.10.09)
Kontrolle 7	45mg	432,9µg/ml	9,9	20µl aus 2,3µl RNA
(Käfig 2)		(10.9.09)	(22.9.09)	(2.10.09)
Kontrolle 8	30mg	80µg/ml	9,4	20µl aus 12,5µl RNA
(Käfig 2)		(21.9.09)	(28.9.09)	(2.10.09)
Kontrolle 9	45mg	189,7µg/ml	10	20µl aus 5,3µl RNA
(Käfig 2)		(2.9.09)	(4.9.09)	(4.9.09)
Kontrolle 10	30mg	80,9µg/ml	9,6	20µl aus 12,3µl RNA
(Käfig 2)		(21.9.09)	(28.9.09)	(2.10.09)

Leerkontrolle

8.1.2. Regime B: Opferung nach 14-wöchiger Behandlung am 14.09.2009

DMBA-Behandlung

	Probengewicht	RNA-Isolation/ Nanodrop	PicoChip-RIN	cDNA
DMBA 1	30mg	779,5µg/ml	10	20µl aus 1,3µl RNA
(Käfig 15)		(23.9.09)	(28.9.09)	(12.10.09)
DMBA 2	30mg	712,9µg/ml	10	20µl aus 1,4µl RNA
(Käfig 15)		(28.9.09)	(29.9.09)	(12.10.09)
DMBA 3	30mg	994,3µg/ml	10	20µl aus 1,0µl RNA
(Käfig 15)		(28.9.09)	(29.9.09)	(12.10.09)
DMBA 4	30mg	1054,1µg/ml	10	20µl aus 0,9µl RNA
(Käfig 15)		(28.9.09)	(2.10.09)	(13.10.09)
DMBA 5	30mg	640,6µg/ml	10	20µl aus 1,6µl RNA
(Käfig 15)		(28.9.09)	(2.10.09)	(13.10.09)
DMBA 6	10mg	546,0µg/ml	10	20µl aus 1,8µl RNA
(Käfig 14)		(30.9.09)	(2.10.09)	(13.10.09)
DMBA 7	15mg	742,9µg/ml	10	20µl aus 1,3µl RNA
(Käfig 14)		(30.9.09)	(2.10.09)	(13.10.09)
DMBA 8	30mg	1256,9µg/ml	10	20µl aus 0,8µl RNA
(Käfig 14)		(28.9.09)	(2.10.09)	(13.10.09)
DMBA 9	20mg	538,0µg/ml	10	20µl aus 1,9µl RNA
(Käfig 14)		(30.9.09)	(2.10.09)	(13.10.09)
DMBA 10	30mg	1078,0µg/ml	10	20µl aus 0,9µl RNA
(Käfig 14)		(28.9.09)	(2.10.09)	(13.10.09)

Mineralöl-Behandlung

	Probengewicht	RNA-Isolation/ Nanodrop	PicoChip-RIN	cDNA
MÖ 1 (Käfig 10)	30mg	189,9µg/ml (23.9.09)	9,9 (29.9.09)	20µl aus 5,3µl RNA (12.10.09)
MÖ 2	30mg	170,3µg/ml	9,9	20µl aus 5,9µl RNA

8. Anhang

(Käfig 10)		(23.9.09)	(28.9.09)	(12.10.09)
MÖ 3	30mg	202,9µg/ml	9,9	20µl aus 4,9µl RNA
(Käfig 10)		(23.9.09)	(28.9.09)	(12.10.09)
MÖ 4	30mg	305,8µg/ml	10	20µl aus 3,3µl RNA
(Käfig 10)		(28.9.09)	(29.9.09)	(12.10.09)
MÖ 5	30mg	262,6µg/ml	10	20µl aus 3,8µl RNA
(Käfig 10)		(28.9.09)	(29.9.09)	(12.10.09)
MÖ 6	30mg	142,7µg/ml	9,7	20µl aus 7,0µl RNA
(Käfig 9)		(28.9.09)	(29.9.09)	(12.10.09)
MÖ 7	30mg	231,1µg/ml	9,8	20µl aus 4,3µl RNA
(Käfig 9)		(28.9.09)	(29.9.09)	(12.10.09)
MÖ 8	30mg	160,4µg/ml	10	20µl aus 6,2µl RNA
(Käfig 9)		(28.9.09)	(2.10.09)	(13.10.09)
MÖ 9	30mg	639,6µg/ml	9,9	20µl aus 1,6µl RNA
(Käfig 9)		(28.9.09)	(2.10.09)	(13.10.09)
MÖ 10	Vorzeitig			
(Käfig 9)	verstorben.			

Leerkontrolle

	Probengewicht	RNA-Isolation/ Nanodrop	PicoChip-RIN	cDNA
Kontrolle 1	30mg	228,6µg/ml	10	20µl aus 4,4µl RNA
(Käfig 3)		(23.9.09)	(29.9.09)	(12.10.09)
Kontrolle 2	30mg	185,5µg/ml	9,9	20µl aus 5,4µl RNA
(Käfig 3)		(23.9.09)	(28.9.09)	(12.10.09)
Kontrolle 3	30mg	98,7µg/ml	9,8	20µl aus 10,1µl RNA
(Käfig 3)		(23.9.09)	(28.9.09)	(12.10.09)
Kontrolle 4	30mg	112,3µg/ml	10	20µl aus 8,9µl RNA
(Käfig 3)		(23.9.09)	(28.9.09)	(12.10.09)
Kontrolle 5	30mg	297,5µg/ml	10	20µl aus 3,4µl RNA
(Käfig 3)		(28.9.09)	(29.9.09)	(12.10.09)
Kontrolle 6	30mg	331,7µg/ml	10	20µl aus 3,0µl RNA
(Käfig 4)		(28.9.09)	(29.9.09)	(12.10.09)
Kontrolle 7	30mg	250,8µg/ml	9,9	20µl aus 4,0µl RNA
(Käfig 4)		(28.9.09)	(29.9.09)	(12.10.09)
Kontrolle 8	30mg	237,0µg/ml	10	20µl aus 4,2µl RNA
(Käfig 4)		(28.9.09)	(29.9.09)	(12.10.09)
Kontrolle 9	30mg	548,8µg/ml	10	20µl aus 1,8µl RNA
(Käfig 4)		(28.9.09)	(2.10.09)	(13.10.09)
Kontrolle 10	30mg	251,7µg/ml	9,9	20µl aus 4,0µl RNA
(Käfig 4)		(28.9.09)	(2.10.09)	(13.10.09)

8.1.3. Regime C: Opferung nach 14-wöchiger Behandlung mit anschließendem 5-wöchigem Tumorwachstum am 19.10.2009

DMBA-Behandlung

	Probengewicht	RNA-Isolation/ Nanodrop	PicoChip-RIN	cDNA
DMBA 1 *	30mg	1384,9µg/ml	10	20µl aus 0,7µl RNA
(Käfig 18)		(2.10.09)	(22.10.09)	(26.10.09)
DMBA 2	30mg	1037,1µg/ml	9,9	20µl aus 1,0µl RNA
(Käfig 18)		(20.10.09)	(26.10.09)	(26.10.09)
DMBA 3	30mg	693,1µg/ml	9,3	20µl aus 1,4µl RNA
(Käfig 18)		(20.10.09)	(26.10.09)	(26.10.09)
DMBA 4	30mg	2185,0µg/ml	10	20µl aus 0,5µl RNA
(Käfig 18)		(20.10.09)	(26.10.09)	(26.10.09)
DMBA 5	30mg	1060,3µg/ml	10	20µl aus 0,9µl RNA
------------------------------	-----------------------	-------------	------------	--------------------
(Käfig 17)		(20.10.09)	(26.10.09)	(26.10.09)
DMBA 6	30mg	1004,8µg/ml	9,8	20µl aus 1,0µl RNA
(Käfig 17)		(21.10.09)	(26.10.09)	(26.10.09)
DMBA 7	30mg	558,7µg/ml	9,8	20µl aus 1,8µl RNA
(Käfig 17)		(21.10.09)	(26.10.09)	(26.10.09)
DMBA 8	30mg	782,2µg/ml	10	20µl aus 1,3µl RNA
(Käfig 17)		(21.10.09)	(26.10.09)	(26.10.09)
DMBA 9	30mg	335,3µg/ml	9,6	20µl aus 3,0µl RNA
(Käfig 17)		(21.10.09)	(26.10.09)	(26.10.09)
DMBA 10 (Käfig 18)	Vorzeitig verstorben.	-	-	-

* DMBA1 aus Regime C musste wegen verschlechterndem Allgemeinzustand

verfrüht am 29.9.09 (nach 14-wöchiger Behandlung mit nur 2-wöchigem

Tumorwachstum) geopfert werden.

Mineralöl-Behandlung

	Probengewicht	RNA-Isolation/ Nanodrop	PicoChip-RIN	cDNA
MÖ 1*	30mg	423,9µg/ml	10	20µl aus 2,4µl RNA
(Käfig 12)		(2.10.09)	(22.10.09)	(26.10.09)
MÔ 2	30mg	286,8µg/ml	10	20µl aus 3,5µl RNA
(Käfig 12)		(20.10.09)	(22.10.09)	(26.10.09)
MÖ 3	30mg	255,8µg/ml	9,6	20µl aus 3,9µl RNA
(Käfig 12)		(20.10.09)	(22.10.09)	(26.10.09)
MÖ 4	30mg	427,8µg/ml	9,3	20µl aus 2,3µl RNA
(Käfig 12)	_	(20.10.09)	(22.10.09)	(26.10.09)
MÖ 5	30mg	323,1µg/ml	9,9	20µl aus 3,1µl RNA
(Käfig 12)		(20.10.09)	(22.10.09)	(26.10.09)
MÖ 6	30mg	191,4µg/ml	9,2	20µl aus 5,2µl RNA
(Käfig 11)		(21.10.09)	(26.10.09)	(26.10.09)
MÖ 7	30mg	124,0µg/ml	8,8	20µl aus 8,1µl RNA
(Käfig 11)		(21.10.09)	(26.10.09)	(26.10.09)
MÖ 8	30mg	363,8µg/ml	9,0	20µl aus 2,7µl RNA
(Käfig 11)		(21.10.09)	(26.10.09)	(26.10.09)
MÖ 9	30mg	418,9µg/ml	9,3	20µl aus 2,4µl RNA
(Käfig 11)	_	(21.10.09)	(26.10.09)	(26.10.09)
MÖ 10	30mg	400,8µg/ml	9,4	20µl aus 2,5µl RNA
(Käfig 11)		(21.10.09)	(26.10.09)	(26.10.09)

* MÖ1 aus Regime C musste als Kontrolle zu DMBA1 (Regime C) verfrüht am 29.9.09 (nach 14-wöchiger Behandlung mit nur 2-wöchigem Tumorwachstum) geopfert werden.

<u>Leerkontrolle</u>

	Probengewicht	RNA-Isolation/ Nanodrop	PicoChip-RIN	cDNA
Kontrolle 1*	30mg	445,3 /ml	10	20µl aus 2,2µl RNA
(Käfig 5)		(2.10.09)	(22.10.09)	(26.10.09)
Kontrolle 2	30mg	107,4 μg/ml	9,4	20µl aus 9,3µl RNA
(Käfig 5)		(20.10.09)	(22.10.09)	(26.10.09)

Kontrolle 3	3,50mg	299,4µg/ml	9,7	20µl aus 3,3µl RNA
(Käfig 5)		(20.10.09)	(22.10.09)	(26.10.09)
Kontrolle 4	30mg	318,2µg/ml	9,6	20µl aus 3,1µl RNA
(Käfig 5)		(20.10.09)	(22.10.09)	(26.10.09)
Kontrolle 5	30mg	344,7µg/ml	9,7	20µl aus 2,9µl RNA
(Käfig 5)		(20.10.09)	(22.10.09)	(26.10.09)
Kontrolle 6	30mg	136,2µg/ml	9,1	20µl aus 7,4µl RNA
(Käfig 6)		(20.10.09)	(22.10.09)	(26.10.09)
Kontrolle 7	30mg	249,7µg/ml	10	20µl aus 4,0µl RNA
(Käfig 6)		(21.10.09)	(26.10.09)	(26.10.09)
Kontrolle 8	30mg	394,7µg/ml	9,6	20µl aus 2,5µl RNA
(Käfig 6)		(21.10.09)	(26.10.09)	(26.10.09)
Kontrolle 9	30mg	339,6µg/ml	9,8	20µl aus 2,9µl RNA
(Käfig 6)		(21.10.09)	(26.10.09)	(26.10.09)
Kontrolle 10	30mg	183,3µg/ml	9,9	20µl aus 5,5µl RNA
(Käfig 6)		(21.10.09)	(26.10.09)	(26.10.09)

* Kontrolle1 aus Regime C musste als Kontrolle zu DMBA1 (Regime C) verfrüht am 29.9.09 (nach 14-wöchiger Behandlung mit nur 2-wöchigem Tumorwachstum) geopfert werden.

8.2. Anhang B: Qualitätskontrolle der zu analysierenden RNA

8.2.1. Regime A

DMBA-Behandlung:

















8.2.2. Regime B

DMBA-Behandlung:









Leerkontrolle:





8.2.3. Regime C







Mineralöl-Behandlung:







45 50 55 60 65[s]

25 30 35 40

0

20

0. 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65[s]





8.3. Anhang C: Etablierung der Primer

Gelelektrophoresen (1,5% Agarosegel in 0,5-fachem TBE-Puffer)



Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Franz-Josef Kramer möchte ich für die Möglichkeit danken, dieses interessante und spannende Promotionsthema bearbeiten zu dürfen.

Bei Herrn Dr. med. Dr. med. dent. Florian Fialka bedanke ich mich für die hervorragende Betreuung während der gesamten Bearbeitung des Promotionsthemas. Außerdem möchte ich mich für die Hilfestellung bei der Durchführung der Versuche, der thematischen und molekularbiologischen Einarbeitung und für die sehr konstruktiven Korrekturen dieser Arbeit bei ihm bedanken. Aber vor allem bedanke ich mich für seine immerwährende Erreichbarkeit und seine Mühen, die diese Dissertation möglich gemacht haben.

Frau Antje Ahrbecker, Frau Siggie Ahlborn und Frau Jutta Schulz danke ich für die Mitarbeit an den Tierexperimenten und deren Ermöglichung.

Frau Jutta Schulz danke ich auch für die Hilfestellung und Unterstützung bei den Laborarbeiten.

Frau Marion Striepe, Labor der Urologie, Universitätsmedizin Göttingen, danke ich für die Möglichkeit der Nutzung des Bioanalyzers.

Dem Labor von Herrn Prof. Dr. med. Nicolai Miosge der Abteilung Prothetik, Universitätsmedizin Göttingen danke ich für die Möglichkeit der Nutzung des Nanodrops.

Herrn Dr. rer. nat. Klaus Jung danke ich für die statistische Auswertung der real-time PCR-Experimente.

Frau Dr. med. Julia Kitz, Abteilung Pathologie der Universitätsmedizin Göttingen, danke ich für die Anfertigung histologischer Schnitte aus den zu untersuchenden Gewebeproben und deren Beurteilung mittels HE-Färbung.

Herrn Dr. med. dent. Tobias Brodmann danke ich für die Hilfestellung bei der Bearbeitung des Promotionsthemas und für die Korrekturlesung.

Frau Annette Altiok und Herrn Alfred Jakobi danke ich ebenfalls für das Korrekturlesen dieser Arbeit.



