

---

Aus dem Institut für Pathologie  
(Prof. Dr. med. H.-J. Radzun)  
im Zentrum Pathologie und Rechtsmedizin  
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

---

***Connexine als potenzielle Biomarker für den Progress oraler  
Plattenepithelkarzinome: Analyse der Expressionsmuster von  
Connexin 26, 43 und 45 und ihres Einflusses auf das  
Überleben***

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizinischen Fakultät der  
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt

von

Dr. Phillip Brockmeyer

aus

Hannover

Göttingen 2014

**Dekan:** Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer

**I. Berichtstatter:** PD Dr. med. B. Hemmerlein

**II. Berichtstatter/in:** Prof. Dr. med. R. Rödel

**III. Berichtstatter/in:**

**Tag der mündlichen Prüfung:** 02.07.2014

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Theoretische Grundlagen.....	1
1.1.1 <i>Plattenepithelkarzinome im Kopf-Hals-Bereich</i> .....	1
1.1.1.1 Epidemiologie .....	1
1.1.1.2 Ätiologie und Risikofaktoren .....	2
1.1.1.3 Staging .....	2
1.1.1.4 Histopathologisches Grading.....	3
1.1.1.5 Therapie .....	4
1.1.2 <i>Struktur und Funktion von Connexinen und der GJIC</i> .....	5
1.1.2.1 GJIC und Connexine unter physiologischen Bedingungen .....	5
1.1.2.1.1 Allgemeine Struktur und Funktion.....	5
1.1.2.1.2 Lebenszyklus der Connexine .....	7
1.1.2.1.3 Regulierung der GJIC .....	10
1.1.2.2 GJIC und Connexine während der Tumorgenese .....	11
1.2 Zielsetzung.....	15
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>16</b>
2.1 Patienten .....	16
2.2 Reagenzien und Färbungen.....	16
2.3 Schnittpräparatherstellung .....	17
2.4 Hämatoxylin-Eosin-Färbung .....	18

2.5 Immunhistochemie .....	18
2.6 Immunoreaktiver Score .....	19
2.7 Statistische Auswertung .....	20
<b>3 Ergebnisse</b>	<b>21</b>
3.1 Klinische Auswertung .....	21
3.1.1 Patienten .....	21
3.1.2 Einflüsse allgemeiner Patientenparameter auf das Überleben .....	21
3.2 Immunhistochemische Expressionsmuster .....	24
3.2.1 Deskriptive Analyse der Connexin-43-Expression .....	24
3.2.2 Lokalisationsanalyse der Connexin-43-Expression .....	27
3.2.3 Deskriptive Analyse der Connexin-45-Expression .....	28
3.2.4 Lokalisationsanalyse der Connexin-45-Expression .....	31
3.2.5 Deskriptive Analyse der Connexin-26-Expression .....	32
3.2.6 Lokalisationsanalyse der Connexin-26-Expression .....	34
3.2.7 Zusammenfassung der Connexin-Expressionsmuster .....	35
3.3 Connexine und Überlebenswahrscheinlichkeit .....	36
<b>4 Diskussion</b>	<b>39</b>
4.1 Connexin 26 .....	40
4.2 Connexin 43 .....	42
4.3 Connexin 45 .....	45
4.4 Myofibroblasten .....	47

<b>5 Zusammenfassung</b>	<b>49</b>
<b>6 Ausblick</b>	<b>51</b>
<b>7 Literaturverzeichnis</b>	<b>52</b>
<b>8 Anhang</b>	<b>61</b>
8.1 Immunreaktiver Score .....	61
8.2 Statistische Daten .....	64

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AJCC	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
AP1	<i>Activator protein 1</i>
bidest.	bidestilliert
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
°C	Grad Celsius
Ca	Karzinom
CT	Computertomographie
Cx26	Connexin 26
Cx43	Connexin 43
Cx45	Connexin 45
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EGFR	Inhibitoren epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptoren
g	Gramm
GJIC	<i>gap junctional intercellular communication</i>
HCL	Chlorwasserstoff
HE	Hämatoxylin-Eosin
HPV	humane Papillomaviren
IRS	immunoreaktiver Score
kg	Kilogramm

L	Liter
$\mu\text{m}$	Mikrometer
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MRT	Magnetresonanztomographie
OSCC	<i>oral squamous cell carcinoma</i>
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
P-Wert	<i>probability value</i>
PKC	Proteinkinase C
SCC	<i>squamous cell carcinoma</i>
SD	Standardabweichung
SP1	<i>specificity protein 1</i>
Tab.	Tabelle
TBST®-Puffer	<i>Tris Buffered Saline Tween®-Puffer</i>
TNM	<i>TNM Classification of Malignant Tumours</i>
VE-Wasser	demineralisiertes Wasser

# 1 Einleitung

## 1.1 Theoretische Grundlagen

### 1.1.1 Plattenepithelkarzinome im Kopf-Hals-Bereich

#### 1.1.1.1 Epidemiologie

In den weltweiten Tumorstatistiken treten die Tumoren der Kopf- und Halsregion an sechster Stelle auf. Jährlich werden circa 650000 neue Fälle registriert und circa 350000 Todesfälle dokumentiert (Jemal et al. 2011). Unter den auftretenden Neoplasien handelt es sich histologisch fast ausschließlich um Plattenepithelkarzinome, die hauptsächlich die Nasennebenhöhlen, die Mundhöhle, den Pharynx und Larynx befallen. In einigen Regionen der Erde wie Melanesien, der südliche Teil Zentralasiens und Zentral- und Ost-Europa wird diese Tumorart vermehrt diagnostiziert. Die niedrigsten Inzidenzraten werden in Afrika, Zentral-Amerika und Ost-Asien beobachtet. Plattenepithelkarzinome des Larynx wurden vermehrt in Süd- und Ost-Europa, Südamerika und Westasien beobachtet (Jemal et al. 2011). Das mittlere Alter der Patienten bei Erstdiagnose liegt bei circa 60 Jahren. Obwohl aufgrund des steigenden Tabakkonsums die Erkrankung immer häufiger auch bei Frauen diagnostiziert wird (Jemal et al. 2011), sind Männer bei allen Tumoren der Kopf- Hals-Region, besonders aber bei Larynxkarzinomen, häufiger betroffen (Jemal et al. 2011, Ries et al. 2007). In den letzten Jahren konnte ein leichter Rückgang beobachtet werden (Ries et al. 2007). Zungen- und Tonsillenkarzinome wurden dagegen häufiger diagnostiziert und traten besonders bei jüngeren Patienten vermehrt auf (Annertz et al. 2002, Shiboski et al. 2005). Die 5-Jahres-Überlebensrate, unter Berücksichtigung aller Tumorstadien, liegt bei circa 60%. Hypopharynxkarzinome zeigen aufgrund einer hohen Inzidenz von regionären- und Fernmetastasen eine deutlich schlechtere Prognose (Ries et al. 2007).



### 1.1.1.2 Ätiologie und Risikofaktoren

Alkohol- und Tabakkonsum gehören zu den wichtigsten Risikofaktoren, die zur Entstehung eines Plattenepithelkarzinoms führen können (Argiris und Eng 2003). Eine Kombination beider Karzinogene soll synergistisch wirken (Blot et al. 1988, Tuyns et al. 1988, Vineis et al. 2004). Als weitere Risikofaktoren wurde der Gebrauch von Kau- oder Schnupftabak und das Kauen von Betelnüssen beschrieben (Proia et al. 2006, Warnakulasuriya 2002). Daneben scheinen auch verschiedene anthropologische (Garavello et al. 2006), berufliche (Gillison 2007, Shangina et al. 2006) und genetische Faktoren (Suarez et al. 2006) bei der Tumorgenese beteiligt zu sein. In der aktuellen Literatur wird das humane Papillomavirus (HPV), hauptsächlich Typ 16 und zu einem geringeren Anteil Typ 18, als neuer Kausalfaktor bei der Entstehung oraler Plattenepithelkarzinome genannt (D'Souza et al. 2007, Marur et al. 2010). Circa 25% der Plattenepithelkarzinome soll HPV-genomische DNA enthalten (Kreimer et al. 2005). Eine besonders starke HPV-Assoziation soll bei Tonsillenkarzinomen vorliegen, wohingegen andere Bereiche des Oropharynx, der Mundhöhle und des Larynx weniger betroffen sind (Hobbs et al. 2006).

### 1.1.1.3 Staging

Das Therapiemanagement dieser Tumorerkrankung ist sehr komplex. Viele Spezialisten unterschiedlicher medizinischer Fachdisziplinen sind bei der Therapieplanung involviert. Bei der primären Therapieauswahl spielen vor allem die Lokalisation des Primärtumors, das Tumorstadium, chirurgische Aspekte sowie Faktoren der Lebensqualität wie das Schluckvermögen und eine unbehinderte Atmung eine große Rolle (Argiris et al. 2008). Die verschiedenen Staging-Methoden beinhalten die chirurgische Beurteilung und eine radiologische Untersuchung, die sich normalerweise aus einer CT- und/oder MRT-Aufnahme der Tumorregion zusammensetzt. Routinemäßig wird zur initialen Abschätzung eine Röntgenthoraxaufnahme angefertigt, um die Lunge auf Metastasen oder einen zweiten Primärtumor zu untersuchen (Argiris et al. 2008). Fernmetastasen sind besonders im Initialstadium unüblich und treten nur bei circa 10% der Patienten auf (Ries et al. 2007). Die insgesamt am häufigsten auftretenden Regionen für Fernmetastasen sind die Lunge,

gefolgt von den mediastinalen Lymphknoten, der Leber und dem Skelettsystem. Um eine einheitliche statistische Erfassung zu gewährleisten, wurde von der UICC (*Union internationale contre le cancer*) und der AJCC (*American Joint Committee on Cancer*) 1950 erstmals ein Klassifikationssystem für alle malignen Tumoren eingeführt (Patel und Shah 2005). Seitdem wurde die TNM-Klassifikation ständig weiterentwickelt und steht seit 2010 in der siebten Auflage bereit. Neben den drei Hauptkriterien T, N und M, die die Ausdehnung des Primärtumors, der Lymphknotenmetastasen und der Fernmetastasen wiedergeben, wurden fünf klinische Stadien beschrieben, die Patienten mit einem vergleichbaren Fortschritt der Tumorerkrankung zusammenfassen.

#### **1.1.1.4 Histopathologisches Grading**

Neben den vorgestellten Staging-Methoden ist auch das histopathologische Grading des Tumorgewebes ein weiteres Beurteilungskriterium, um die Prognose des Patienten einschätzen und dadurch das Therapiekonzept anzupassen zu können (Wittekind et al. 2010). Histologisch wird dabei der Differenzierungsgrad, also das Ausmaß, in dem die Tumorzellen von den Zellen des Ursprungsgewebes abweichen, bestimmt (G1-G4). Die Zellen eines G1-Tumors sind gut differenziert, haben also eine große Übereinstimmung mit den Zellen ihres Ursprungsgewebes und zeigen in der Regel eine geringe Wachstumsgeschwindigkeit und einen günstigen Verlauf. Tumoren, die als G2 angegeben werden, sind hingegen mäßig differenziert. Die Zellen eines G3-Tumors sind schlecht bzw. niedrig differenziert und zeigen wie die undifferenzierten G4-Tumoren, die häufig nicht mehr oder nur unter Zuhilfenahme immunhistochemischer Marker dem Ursprungsgewebe zugeordnet werden können, eine höhere Wachstumsgeschwindigkeit und Malignität (Wittekind et al. 2010).

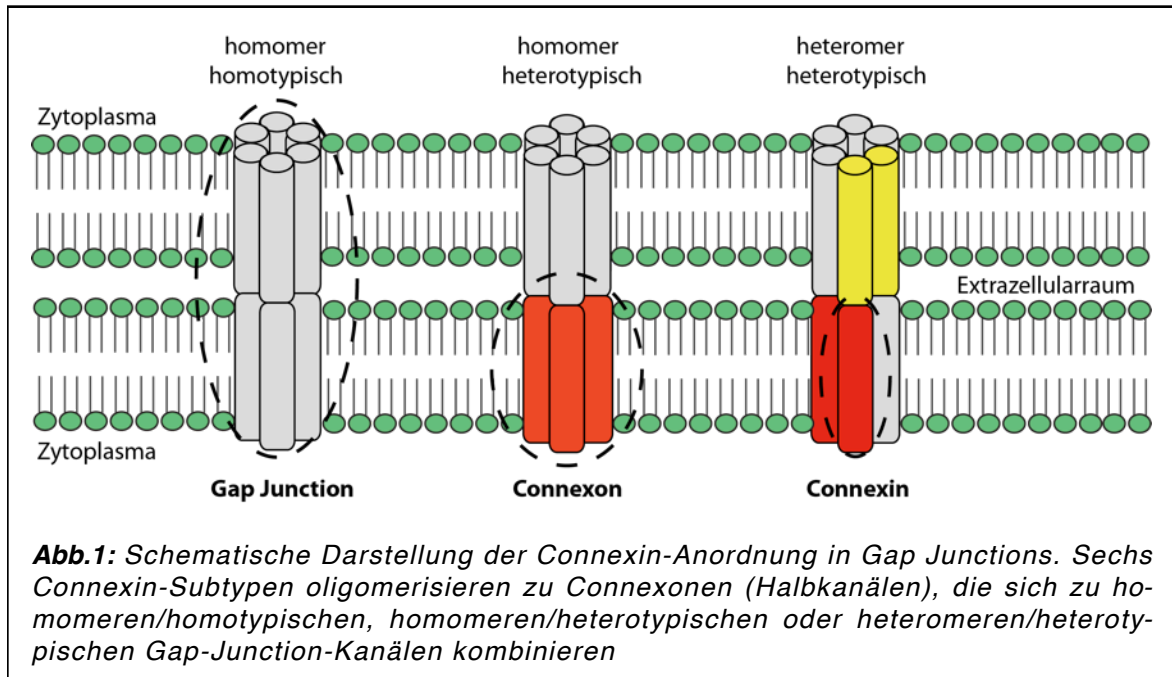
### 1.1.1.5 Therapie

Obwohl die chirurgische Exzision aufgrund der anatomischen Ausbreitung des Tumors limitiert ist, wird sie immer noch als Standardtherapiemethode bei der Behandlung von Tumoren im Kop-Hals-Bereich durchgeführt. Im Rahmen der chirurgischen Entfernung wird routinemäßig eine *neck dissection* durchgeführt (Argiris et al. 2004). Die Bestrahlung nimmt bei der primären oder adjuvanten Therapie eine zentrale Position ein. Bei früh auftretenden Karzinomen der Zunge, der Glottis und der Tonsillen zeigte die alleinige Bestrahlung gute Erfolgsraten (Argiris et al. 2008). Neben der intensitätsmodulierten Radiotherapie, bei der der zytotoxische Effekt in den an den Tumor angrenzenden Gewebearealen minimiert werden kann (Eisbruch et al. 2004), wurden neuartige Verfahren wie die Tomotherapie, die Partikeltherapie, die Protonentherapie, die Neutronenbestrahlung, die Brachytherapie und die stereotaktische Radiochirurgie entwickelt, die bis heute allerdings noch nicht ausreichend in prospektiven klinischen Studien validiert wurden (Ding et al. 2005, Voynov et al. 2006). Die Chemotherapie hat sich von einem eher palliativen Ansatz zu einer zentralen Komponente der kurativen Therapie entwickelt (Cohen et al. 2004). Für verschiedene Wirkstoffklassen wie die Platinverbindungen, Antimetabolite und Taxane wurde eine gute Wirksamkeit nachgewiesen (Colevas 2006). Als Standardwirkstoff wird heute Cisplatin eingesetzt. Carboplatin ist bei einer kombinierten Radio-Chemo-Therapie nicht so effektiv wie Cisplatin, wird vom Organismus jedoch besser toleriert (De Andres et al. 1995, Forastiere et al. 1992). Ein neuartiges Therapiekonzept stellen die EGFR-Inhibitoren dar. Cetuximab ist der erste molekulare Wirkstoff dieser Art, der in der klinischen Therapie eingesetzt wird (Karamouzis et al. 2007).

## 1.1.2 Struktur und Funktion von Connexinen und der GJIC

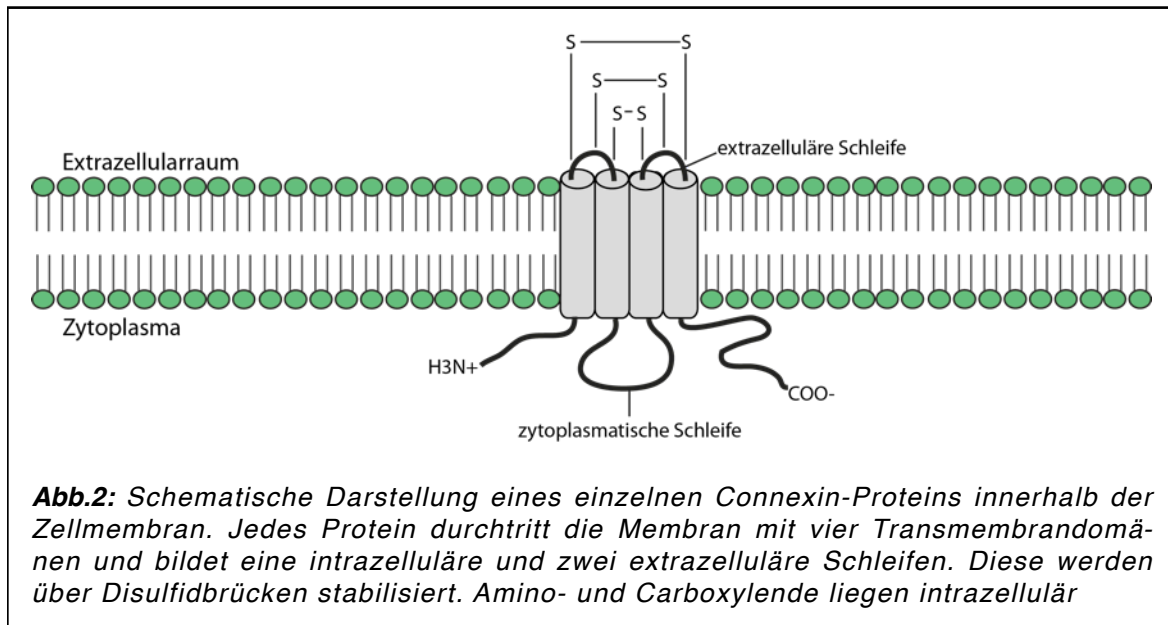
### 1.1.2.1 GJIC und Connexine unter physiologischen Bedingungen

#### 1.1.2.1.1 Allgemeine Struktur und Funktion



Als Connexine wird eine Gruppe von 21 Transmembranproteinen bezeichnet, die Halbkkanäle (Connexone) innerhalb der Plasmamembran einer Zelle bilden. Jedes Connexon ist entweder aus einem homomeren oder aus einem heteromeren Connexin-Hexamere aufgebaut und verbindet sich mit dem Connexon einer benachbarten Zelle zu einem interzellulären Kanal (Gap Junction). Diese Gap Junctions ermöglichen eine direkte interzelluläre Kommunikation (GJIC) durch die Passage kleiner Moleküle ( $\leq 1000$  Da) wie Ionen ( $\text{Ca}^{2+}$ ), *second messenger* (cAMP,  $\text{IP}_3$ ) oder kleinen Metaboliten (ATP) und spielen dadurch eine zentrale Rolle in der Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase, Zellwachstumskontrolle und Entwicklung x. Im reizleitenden Gewebe des Herzens und des Nervensystems agieren sie als elektrische Synapse wodurch eine annähernd synchrone interzelluläre Reizübertragung möglich ist (Gros und Jongasma 1996). In schlecht durchbluteten Ge-

webearten, wie beispielsweise der Augenlinse, ist eine Aufnahme von Metaboliten aus dem Blut über Gap Junctions möglich (DeRosa et al. 2007).



Topografisch durchtritt jedes Connexin-Protein die Zellmembran mit vier Transmembrandomänen. Es verfügt über eine zyttoplasmatische und jeweils zwei extrazelluläre Schleifen. Die beiden extrazellulären Schleifen sind untereinander über Disulfidbrücken stabilisiert (Kumar und Gilula 1996). Sowohl das hydrophile Amino- als auch das hydrophobe Carboxylende liegen intrazellulär. Die Connexin-Subtypen unterscheiden sich in Sequenz und Länge der endständigen Carboxylgruppe. Die Abfolge dreier Cysteinreste innerhalb der extrazellulären Schleifen ist dagegen hoch konserviert (Willecke et al. 2002) und an der Zusammenlagerung gegenüberliegender Connexone beteiligt (Yeager und Nicholson 1996).

In mehreren sehr heterogenen Krankheitsbildern wurden Mutationen verschiedener Connexin-Subtypen beschrieben. Eine Mutation im GJA1-Gen (Cx43) wurde mit der ODDD-Krankheit (Occludentodigitale Dysplasie) in Verbindung gebracht, einer Erkrankung, bei der die Patienten unter Verwachsungen und Missbildungen der Finger, lichtem Haar und unterentwickelten Zähnen leiden (Paznekas et al. 2003). Darüber hinaus scheinen Cx43-Mutationen bei der Entstehung des Katarakts und verschiedenen Herzfehlbildungen eine Rolle zu spielen (Krutovskikh und

Yamasaki 2000). Ein mutiertes Cx26-Gen wurde für die nicht-syndromatische Gehörlosigkeit verantwortlich gemacht (Liu et al. 2009). Cx45-Gen-Mutationen konnten im Myokard nachgewiesen werden und sollen zu der Entstehung von Arrhythmien führen (Gollob 2006, Wang et al. 2010).

#### **1.1.2.1.2 Lebenszyklus der Connexine**

Im Gegensatz zu vielen anderen Membranproteinen ist die Halbwertszeit der meisten Connexine relativ kurz; sie wird zwischen einer und fünf Stunden angegeben (Darrow et al. 1995, Fallon und Goodenough 1981). Cx26 und Cx43 gehören mit circa 1,5 Stunden zu den eher instabilen Subtypen (Beardslee et al. 1998, Thomas et al. 2005), wohingegen Cx45 mit circa 90 Stunden eine stabilere Form aufweist (Jiang und Goodenough 1998). Die Gene dieser Transmembranproteine unterscheiden sich in ihrem Aufbau kaum. Sie bestehen aus einem randständigen 5'-untranslatierten Exon, das von einem zweiten Exon, welches die komplette kodierende Information enthält, durch ein Intron variabler Länge getrennt wird (Willecke et al. 2002). Neben dieser Grundstruktur wurden verschiedene Spleißvarianten der 5'-untranslatierten Region und eine zusätzliche Unterbrechung der kodierenden Region durch ein weiteres Intron beschrieben (Sohl und Willecke 2004). Für Cx43 sind bisher sechs unterschiedliche Transkripte bekannt (Pfeifer et al. 2004). Im Verlauf der Genregulation scheinen die Promotor-Regionen von entscheidender Bedeutung zu sein. Während für Cx45 bisher kein exakter Promotor identifiziert werden konnte (Jacob und Beyer 2001), wurden für Cx26 eine- (Tu und Kiang 1998) und für Cx43 drei verschiedene Regionen (P1, P2, P3) charakterisiert (Pfeifer et al. 2004). P1 wird als die dominante Region beschrieben, die in den meisten Transkripten identifiziert wurde. Auf P3 wurden Bindungsstellen für Sp1 und den STAT-Faktor identifiziert, wohingegen P2 über eine Bindungsstelle für CREB und c-Myc sowie HSP90 verfügt (Carystinos et al. 2003). Bisher ist unklar, wofür diese unterschiedlichen Promotor-Regionen zuständig sind. Wahrscheinlich scheint jedoch eine Beteiligung der P2- und P3-Region während Zelldifferenzierung und -entwicklung (Salameh 2006). Eine optimale Promotor-Aktivität wird durch die Transkriptionsfaktoren AP1 und Sp1 sowie die PKC-Aktivierung er-

reicht (Geimonen et al. 1996). Darüber hinaus scheinen sowohl NKx2.5 und Tbx2 als auch der Wnt-Signalweg an der Regulierung der Cx43-Transkription beteiligt zu sein (Teunissen und Bierhuizen 2004). Sowohl Translation als auch intrazelluläre Transportwege der Connexine wurden vor allem an Cx43 intensiv untersucht. Nach Translation an den Ribosomen des Endoplasmatischen Retikulums (ER) und dem Einbau in dessen Membran sind mehrere Phosphorylierungen zur Reifung notwendig (Falk 2000). Für Cx43 ergeben sich dadurch drei Isoformen P1, P2 und P3 (Crow et al. 1990, Lampe et al. 1998, Musil et al. 1990). Die meisten Subtypen folgen dem herkömmlichen Transportweg für Membranproteine über den Golgi-Apparat (George et al. 1999). Nachdem das Protein das ER verlassen hat, kommt es in dem Trans-Golgi-Netzwerk zur Oligomerisierung in Hexamere (Puranam et al. 1993). Anschließend werden die fertigen Connexone (Halbkanäle) in kleinen Gruppen über Vesikel in die Plasmamembran transportiert (Saez et al. 2003). In der Plasmamembran angekommen, bewegen sie sich über laterale Diffusion, bis sie auf das Connexon einer benachbarten Zelle treffen und mit diesem einen Gap-Junction-Kanal ausbilden. Es bilden sich große Ablagerungen von Gap Junctions zwischen den Zellen, die als Gap-Junction-Plaques bezeichnet werden (Lauf et al. 2002). Unabhängig von diesem typischen Transportweg wurde für Cx26 ein alternativer Weg beschrieben, durch den der schnelle Aufbau homomerer Cx26-Kanäle in der Membran möglich ist (George et al. 1999, Martin et al. 2001). Die Verbindung der benachbarten Connexone wird über die beiden extrazellulären Schleifen realisiert. Dieser Vorgang scheint durch Kalzium-abhängige Zelladhäsionsmoleküle wie E-Cadherin (Segretain und Falk 2004a), N-Cadherin (Meyer et al. 1992) und  $\alpha$ -Catenin (Fujimoto et al. 1997) erleichtert zu werden. Auch  $\beta$ -Catenin stimuliert die Cx43-Expression (Xia et al. 2010) und wurde in Kardiomyozyten als Cx43-Bindungspartner beschrieben (Ai et al. 2000). Darüber hinaus konnte eine Bindungsstelle für ZO-1, eine membranständige Guanylatkinase, im Carboxylende des Cx43 identifiziert werden. Dieser Cx43/ZO-1-Komplex ist über  $\alpha$ -Spectrin mit den Aktinfilamenten des Zytoskeletts verbunden. Wahrscheinlich ist ZO-1 am Austausch der Gap Junctions in der Plasmamembran beteiligt (Giepmans 2004, Martin und Evans 2004, Segretain et al. 2004b). Severs et al. beschrieben eine moderate Cx43-ZO-1-Verbindung in Kardiomyozyten, die nach Behandlung mit

Kollagenase, welche die interzelluläre Verbindung unterbrach, zunahm und zu zytoplasmatischen Gap-Junction-Vesikeln führte (Severs et al. 1989). Diese als „*annular gap junctions*“ bekannten Strukturen sind internalisierte, von einer Doppelmembran umschlossene Gap Junctions, die für den weiteren Abbau durch Endozytose in das Zytoplasma einer der beiden Zellen aufgenommen werden. An diesem Vorgang sollen verschiedene Zytoskelettfilamente beteiligt sein (Murray et al. 1997). Giepmans et al. untersuchten die Verbindung des Cx43 mit den Mikrotubuli des Zytoskeletts und erkannten, dass diese durch Cx43 direkt mit den Gap Junctions in Verbindung stehen (Giepmans et al. 2001b). Butkevich et al. erkannten eine Verbindung des zytoplasmatischen, Aktin-bindenden Proteins Drebrin mit Cx43 (Butkevich et al. 2004). Es ist bisher nicht eindeutig geklärt, ob neben der Aufnahme des gesamten Gap-Junction-Kanals in eine der beiden Zellen auch eine vorherige Degradation in die einzelnen Connexone (Halbkanäle) möglich ist (Fujimoto et al. 1997). Es wird jedoch angenommen, dass intakte Gap Junctions unter physiologischen Bedingungen nicht wieder in die einzelnen Connexone zerlegt werden können (Ghoshroy et al. 1995, Goodenough und Gilula 1974). Besonders die unterschiedlichen intrazellulären Abbauwege der Connexine scheinen für ihren Stoffwechsel wichtig zu sein (Su et al. 2012). Bisher sind drei verschiedene Abbauwege bekannt. Neben dem typischen endolysosomalen Abbauweg wurde auch der Abbau innerhalb des Proteasoms und über die Autophagie beschrieben (Beardslee et al. 1998, Su et al. 2012). Der proteasomale Abbauweg ist typisch für nukleäre und zytoplasmatische Proteine, die über eine Polyubiquitinkette für diesen Weg markiert sind (Su et al. 2012). Aus diesem Grund wurde bisher angenommen, dass das Proteasom als Qualitätskontrolle agiert und nur falsch gefaltete Connexine dort abgebaut werden. In der aktuellen Literatur wird jedoch auch der teilweise Abbau des funktionstüchtigen membranösen Cx43 über das Proteasom beschrieben (Su et al. 2012). Der typische Abbauweg der membranösen Connexine ist allerdings der lysosomale (VanSlyke und Musil 2002). Dies ist die gemeinsame Endstrecke für den endolysosomalen und den autophagischen Weg und es ist bisher nicht eindeutig geklärt, ob diese beiden Wege getrennte unterschiedliche Prozesse oder Teil des gleichen Mechanismus sind (Su et al. 2012). Welcher Abbauweg in der Zelle überwiegt, ist bisher nicht bekannt. Wahrscheinlich



liegt jedoch eine Zelltypspezifität und ein Unterschied zwischen kommunikationskompetenten- (Kardiomyozyten) und -inkompetenten Zellen (Tumorzellen) vor (Salameh 2006). In diesem Zusammenhang scheinen auch Phosphorylierung und Ubiquitinierung wichtig zu sein (Musil et al. 2000).

#### **1.1.2.1.3 Regulierung der GJIC**

Für eine physiologische Zellfunktion ist die Regulierung der GJIC wichtig und sie ist auf zwei unterschiedliche Arten möglich. Änderungen der Kanaleigenschaften führen zu einer schnellen Adaptierung, wohingegen eine langfristige Regulierung über die Syntheserate der Connexine und über den Auf- und Abbau der Gap Junctions erreicht werden kann (Laird 1996, Lampe und Lau 2000). Dabei spielt besonders die Phosphorylierung eine entscheidende Rolle, da sie sowohl die Kanaleigenschaft als auch die Halbwertszeit der Gap Junctions beeinflusst (Lampe und Lau 2000). Die meisten Connexine werden posttranslational durch Phosphorylierung an der Aminosäure Serin modifiziert (Lampe und Lau 2000). Darüber hinaus bestimmen eine Reihe weiterer Faktoren die Kanaleigenschaften. Brink et al. beschrieben eine spannungssensitive Öffnungswahrscheinlichkeit der Gap-Junction-Kanäle (Brink 2000). Hohe transjunktionale Spannungen führten in der Untersuchung zu einem Verschluss der Gap Junctions (Brink 2000). Auch die intrazelluläre Kalziumkonzentration (Rose und Loewenstein 1975) und der intra- und extrazelluläre pH-Wert (Sonntag et al. 2009) sollen an der Regulierung der GJIC beteiligt sein. Homma et al. beschrieben eine Konformationsänderung der endständigen Carboxylgruppe des Cx43 bei Erhöhung des interzellulären pH-Werts. Dies führte zum Verschluss der Gap Junctions (Homma et al. 1998). Im Gegensatz dazu sollen aus Cx26 aufgebaute Gap Junctions sich nicht durch die Carboxyl-, sondern durch die Aminogruppe verschließen (Maeda et al. 2009). Eine weitere Möglichkeit der Modulierung ist die heterogene Zusammensetzung der Connexonen aus verschiedenen Connexin-Subtypen (Elfgang et al. 1995) und das von Unwin beschriebene Iris-Blenden-Modell, bei dem es durch das Verschieben der Connexine gegeneinander zu einem Verschluss des Kanals kommt (Unwin 1987).

### 1.1.2.2 GJIC und Connexine während der Tumorgenese

Eine mögliche Assoziation zwischen den Connexinen bzw. der GJIC und der Tumorprogression wurde erstmals von Loewenstein und Penn in kultivierten Hepatomzellen beschrieben (Loewenstein und Penn 1967). Aufgrund ihrer Erkenntnis wurde die Hypothese aufgestellt, dass Gap Junctions während der Tumorgenese verloren gehen und es durch den Verlust der GJIC zu einer Entkopplung von der externen Wachstumskontrolle kommt. Dabei muss jedoch zwischen den Connexinen als Baustein der Gap Junctions und den Connexinen als eigenständige, intrazelluläre Reaktionspartner unterschieden werden. Eine detaillierte Zusammenfassung der Literatur über den Zusammenhang der Connexine bzw. der GJIC während der Tumorgenese wurde von Cronier veröffentlicht (Cronier et al. 2009). Sie übernimmt unterschiedliche Funktionen in verschiedenen Phasen der Tumorprogression. Wahrscheinlich können Connexine durch eine Vielzahl verschiedener Prozesse die Genexpression kontrollieren und wirken so auf das Zellwachstum (Cronier et al. 2009).

Viele Studien bringen die Connexine bzw. die GJIC mit einer tumorsupprimierenden Wirkung in Verbindung. Das Fehlen der interzellulären Kommunikation soll zu einer intrazellulären Akkumulation von Wachstumsfaktoren (Loewenstein und Penn 1967) und zu einer Unterdrückung der Kontaktinhibition führen (Trosko et al. 2004), wodurch eine Zellproliferation ausgelöst werden kann. King et al. beschrieben eine positive Korrelation der Cx43-Expressionsstärke mit der Wachstumskontrolle in HeLa-Zellen des Zervixkarzinoms (King et al. 2000). Ähnliche Ergebnisse wurden in MDA-MB-231-Zellen der Mamma für Cx26 und Cx43 beschrieben (McLachlan et al. 2006). Es wurde gezeigt, dass Cx26 für eine Kontakt-Wachstumshemmung in HeLa und HepG2-Zellen verantwortlich ist (Mesnil et al. 1995, Yano et al. 2001). In einem Knockout-Maus-Modell zu der physiologischen neuronalen Funktion des Cx43 führte eine fehlende Cx43-Expression zu Astrozyten mit einer veränderten Expression von Genen, die mit Apoptose, Zellwachstum und Transkriptionsfaktoren assoziiert sind (Iacobas et al. 2004, Iacobas et al. 2003) und einem vermehrten Auftreten pulmonaler Neoplasien (Avanzo et al. 2004). Die Cx43-Transfektion in zuvor defiziente Tumorzelllinien führte zu einer Wachstums-

hemmung und zu einer Rückbildung des malignen Phänotyps (Chen et al. 1995, Eghbali et al. 1991, Eghbali et al. 1990), was mit einer verlängerten G1-Phase, einer verminderten Cyclin-A-, D1- und D2-Expression und der Akkumulation klassischer Tumorsuppressoren wie P27 und dem Rb-Protein assoziiert war (Koffler et al. 2000, Taberner et al. 2006, Zhang et al. 2001). Aufgrund der Fähigkeit des Connexins 45, in Kombination mit Cx43 veränderte heteromere Gap Junctions zu bilden, wurde angenommen, dass eine Cx45-Überexpression den Zell-Zell-Kontakt während der Karzinogenese beeinträchtigen kann (Betsuyaku et al. 2006, Bukauskas et al. 2002, Koval et al. 1995).

Neben der vorgestellten tumorinhibierenden Wirkung wurde jedoch auch eine verstärkte Connexin-Expression und eine dadurch verbesserte Anlagerung der Tumorzellen an das Stroma während der Invasion und Migration beschrieben (Cronier et al. 2009). Die Immigration der Tumorzellen in das Gewebe kann wahrscheinlich durch eine gesteigerte Kommunikation mit der endothelialen Barriere gefördert werden, an der die Connexine beteiligt sind (Ogawa et al. 2012). Eine erhöhte Connexin-Expression, insbesondere des Cx26, wurde in hyperplastischem Gewebe nachgewiesen (Habermann et al. 2002, Lucke et al. 1999, Sawey et al. 1996). Daneben wurde eine erhöhte Cx26-Expression in Melanomzellen und in den Endothelzellen kleinerer Gefäße beschrieben, die die Melanomzell-Nester umgaben (Saito-Katsuragi et al. 2007). Ito et al. beschrieben eine erhöhte Cx26-Expression in den Gewebeproben von 16 Patienten aus einer Kohorte von 50 Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom der Lunge. Alle malignen Zellen innerhalb der zugehörigen Lymphknotenmetastasen waren Cx26-positiv (Ito et al. 2006). Ähnliche Ergebnisse wurden für eine erhöhte Cx26- und Cx43-Expression in lokalen Lymphknotenmetastasen im Vergleich zum primären Brustkrebs beschrieben. Selbst die Cx26- und Cx43-negativen Primärtumoren entwickelten Cx26- und Cx43-positive Lymphknotenmetastasen (Kanczuga-Koda et al. 2006). Eine erhöhte Cx43-Expression führte dazu, dass Gliomzellen im Gehirn von Erwachsenen in der Lage waren mit Astrozyten zu interagieren und funktionale Gap Junctions zu etablieren, wodurch eine erleichterte direkte parenchymatöse Invasion möglich war (Lin et al. 2002). Eine Erhöhung der Cx43-Expression konnte in den Kontaktflächen zwischen Tumorzellen und Endothelzellen intratumoraler Ge-

fäße und mikrometastatischen Foci des metastasierenden Bronchialkarzinoms beobachtet werden (Elzarrad et al. 2008). Die in der Literatur angegebenen Daten über die Connexin-Expression innerhalb des oralen Plattenepithelkarzinoms (OSCC) ist widersprüchlich. Während Villaret et al. eine Cx26-Überexpression in den Primärtumoren und den assoziierten Lymphknotenmetastasen einer heterogenen Gruppe von 12 Patienten mit OSCC beschrieben (Villaret et al. 2000), konnte in einem vergleichbaren Patientenkollektiv keine Cx26 nachgewiesen werden (Ozawa et al. 2007).

Die genaue Funktion der Connexine bzw. der GJIC während der Tumorgenese und -progression ist bisher nur unzureichend verstanden. Wahrscheinlich kann ein bestimmtes Connexin-Expressionsprofil zu einem aggressiveren Verhalten des Primärtumors führen und dadurch Einfluss auf die Prognose der Patienten nehmen. Aus diesem Grund könnte das Expressionsprofil dieser Connexine als Biomarker für die Einschätzung der Prognose des Patienten und dadurch für die Planung einer gezielten therapeutischen Intervention verwendet werden. Eine Zusammenfassung der in der Literatur beschriebenen pro- und antitumorigenen Wirkung der in der vorliegenden Studie untersuchten Connexine 26, 43 und 45 in den unterschiedlichen Gewebetypen ist in Tab. 1 dargestellt.

Gewebetyp	Cx26		Cx43		Cx45	
	-	+	-	+	-	+
Zervixkarzinom (in vitro)	(Mesnil et al. 1995)		(King et al. 2000)			
Mammakarzinom (in vitro)	(McLachlan et al. 2006)		(McLachlan et al. 2006)			
Mammakarzinom (in vivo)		(Kanczuga- Koda et al. 2006)		(Kanczuga- Koda et al. 2006)		
LK-Metastasen (Mammakarzinom)		(Kanczuga- Koda et al. 2006)		(Kanczuga- Koda et al. 2006)		
Leberzellkarzinom (in vitro)	(Yano et al. 2001)					
Bronchialkarzinom (Knockout-Maus/ Maus)			(Avanzo et al. 2004)		(Udaka et al. 2007)	
Bronchialkarzinom (in vitro)					(Zhang et al. 2004)	
Gefäßwand (Bronchialkarzinom)				(Elzarrad et al. 2008)		
SCC der Lunge (in vivo)		(Ito et al. 2006)				
LK-Metastasen (SCC der Lunge)		(Ito et al. 2006)				
Malignes Melanom (in vivo)		(Saito-Katsu- ragi et al. 2007)				
Endothel Gefäßwand (Nahe Melanom)		(Saito-Katsu- ragi et al. 2007)				
Gliom (in vivo)				(Lin et al. 2002)		
OSCC (in vivo)	(Ozawa et al. 2007)	(Villaret et al. 2000)				
LK-Metastasen (OSCC)	(Ozawa et al. 2007)	(Villaret et al. 2000)				

**Tab.1:** In der Literatur beschriebene pro-(+) und antitumorogene Wirkung (-) der Connexine 26, 43 und 45 in den unterschiedlichen Gewebetypen

## 1.2 Zielsetzung

Bis heute wurde keine Studie vorgestellt, in der das Expressions- und Lokalisationsprofil der Connexine 26, 43 und 45 in einem Patientenkollektiv mit oralem Plattenepithelkarzinom auf Proteinebene untersucht wurde. Aus diesem Grund bestand das Ziel der vorliegenden Untersuchung darin, die individuellen Expressions- und Lokalisationsprofile der Connexine 26, 43 und 45 zu evaluieren und mit der Prognose der Patienten zu korrelieren. Zu diesem Zweck wurden Gewebebiopsien primärer oraler Plattenepithelkarzinome, assoziierter Lymphknotenmetastasen und gesunder Mundschleimhaut derselben Patienten semiquantitativ immunhistochemisch untersucht und mit der Prognose der Patienten korreliert.

### **Folgende Hypothesen sollten getestet werden:**

- Die Ausbildung oraler Plattenepithelkarzinome des Menschen geht mit einer Änderung der Cx26-, Cx43- und Cx45-Proteinexpression einher.
- Es liegt eine unterschiedliche morphologische Verteilung der Connexine innerhalb der verschiedenen Gewebetypen vor.
- Es besteht eine Korrelation zwischen differentieller Expression und klinischen Parametern, insbesondere der Überlebenszeit.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Patienten

In der vorliegenden immunhistochemischen Evaluation der Connexin-Expression wurden die Gewebeproben von 35 Probanden untersucht, bei denen im Zeitraum von 1998 bis 2007 ein nicht vorbehandeltes orales Plattenepithelkarzinom in der Abteilung Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie des Universitätsklinikums Göttingen operativ entfernt wurde. Es gab keine Ausschlusskriterien bezüglich Geschlecht oder Alter der Probanden. Die postoperative Beobachtungszeit jedes Patienten betrug mindestens drei Jahre. Einschlusskriterium für die Untersuchung war ein histologisch gesichertes Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle. Ausschlusskriterien waren eine neoadjuvante Radio- oder Chemotherapie sowie der Nachweis eines Zweitkarzinoms. Insgesamt bestand das Patientenkollektiv aus 23 männlichen und 12 weiblichen Probanden. Das durchschnittliche Alter lag bei 56,5 Jahren. Die Untersuchung der humanen Gewebeproben wurde durch die Ethikkommission der Georg-August-Universität Göttingen am 05.10.2009 geprüft und befürwortet (Antragsnummer: 7/6/09).

### 2.2 Reagenzien und Färbungen

#### **Citrat-Puffer (pH-Wert 6,0)**

**Lösung A:** Citronensäure-Monohydrat 4,2 g / 200 ml VE-Wasser  
(Art.-Nr. 1.00244. 1000 / 1 kg, Merck, Darmstadt)

**Lösung B:** Tri-Natriumcitrat-Dihydrat 29,4 g / 1 L VE-Wasser  
(Art.-Nr. 1.06448.0500, 500 g, Merck, Darmstadt)

**Mischung:** Verhältnis A (18 ml) + B (82 ml) ad 1 L VE-Wasser.

**TBS-Puffer (pH-Wert 7,35)**

**Mischung für 1 L Konzentrat:** TRIS 60,6 g (Art.-Nr. 4855.2, 1 kg, Roth, Karlsruhe), Natriumchlorid 87,6 g (Art.-Nr. 1.06404.1000, 1 kg, Merck, Darmstadt), 800 ml VE-Wasser, 3,5 mol HCl 120 ml (Art.-Nr. 1.13134.9010, 10 L, Merck, Darmstadt)

**BSA (2%)**

*Albumin fraction 4* 4 g (Art.-Nr. 1.12018.0025, 25 g, Merck, Darmstadt) auf 200 ml TRIS-Puffer (Art.-Nr. 4855.2, 1 kg, Roth, Karlsruhe).

**EDTA-Puffer (pH-Wert 9,0)**

Dako Target Retrieval Solution (Art.-Nr. S2367, 500 ml, Dako, Hamburg)

**Hämatoxylin-Eosin-Färbung**

**Hämalaun nach Mayer:** 1 g Hämatoxylin,  $C_{16}H_{14}O_6$  (Merck, Darmstadt) 50 g Kaliumaluminiumsulfat-Dodecahydrat,  $KAl(SO_4)_2 \times 12 H_2O$  (Merck, Darmstadt) 0,2 g Natriumiodat,  $NaIO_4$  (Merck, Darmstadt) 50 g Chloralhydrat,  $C_2H_3Cl_3O_2$  (Merck, Darmstadt) ad 1 L VE-Wasser

**Eosin:** 0,5 g Eosin G,  $C_{20}H_6Br_4Na_2O_5$  (Merck, Darmstadt) ad 100 ml VE-Wasser, vor Gebrauch einige Tropfen Essigsäure,  $CH_3COOH$ , 100% (Merck, Darmstadt)

**2.3 Schnittpräparatherstellung**

Das zu untersuchende Gewebe wurde kurz nach der operativen Entnahme in 4% neutral gepuffertem Formaldehyd fixiert und mit einem halbautomatischen Einbett-



Systems (Leica, Wetzlar) in Paraffin eingebettet. Mithilfe eines Schlittenmikrotoms (Microm Ag, Zürich) wurden 2  $\mu\text{m}$  dicke Paraffinschnitte angefertigt und in einem Wasserbad auf SuperFrost® Plus Objektträger (Menzel-Gläser, Braunschweig) aufgezogen. Die fertigen Paraffinschnitte wurden über Nacht bei 37°C getrocknet und bis zur Durchführung der Färbungen staubgeschützt bei Raumtemperatur gelagert.

#### **2.4 Hämatoxylin-Eosin-Färbung**

Zur morphologischen Beurteilung der Gewebeproben wurde eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung durchgeführt. Die Zellkerne wurden mit Meyers-Hämalaun, das Zytoplasma mit Eosin gefärbt. Nach anschließender Dehydratation mit Hilfe einer Alkoholreihe aufsteigender Konzentration wurden die Objektträger über Xylol eingedeckt.

#### **2.5 Immunhistochemie**

Die Paraffinschnitte wurden zunächst für 15 Minuten in Xylol entparaffiniert, anschließend in einer Alkoholreihe absteigender Konzentration schrittweise rehydriert und unter fließendem VE-Wasser gespült. Die Objektträger für den Cx45-Antikörper wurden anschließend für 30 Minuten in 10 mM Citratpuffer in einem Dampfgerat erhitzt. Die Objektträger für die Cx26- und Cx43-Antikörper wurden für 20 Minuten in EDTA-Puffer erhitzt. Nach zehnminütiger Abkühlung in Eiswasser auf Raumtemperatur wurden die Präparate für 15 Minuten in TBS-Puffer gespült. Nach einer fünfminütigen Inkubation mit 10% BSA wurden die Objektträger für 30 Minuten in dem mit TBS-Puffer verdünnten Primäantikörper inkubiert und in TBS-Puffer gewaschen. Anschließend wurden die Cx43- und Cx45-Präparate mit alkalischer Phosphatase (Dako, Hamburg) und die Cx26-Präparate mit Peroxidase (Dako, Hamburg) beschichtet und für 20 Minuten in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Waschen mit TBS-Puffer wurden die Präparate für 20 Minuten in Diaminobenzidine inkubiert und anschließend wieder mit TBS-Puffer gespült, kurz mit VE-Wasser behandelt und mit Hämalaun gegen-

gefärbt. Nach Dehydrierung mithilfe einer Alkoholreihe aufsteigender Konzentration wurden die Objektträger über Xylol eingedeckt.

Antikörper	Verdünnung	Inkubationsdauer	Firma
Connexin 26	1:200	30 min	Abcam®, Cambridge
Connexin 43	1:50	30 min	Cell Signaling, Danvers
Connexin 45	1:100	30 min	Millipore, Temecula

**Tab. 2:** Färbeprotokoll für die verwendeten Connexin-Antikörper

## 2.6 Immunoreaktiver Score

Die Evaluation der Connexin-Expression erfolgte unter dem Lichtmikroskop (Olympus, Tokyo) mithilfe eines semiquantitativen immunoreaktiven Scores (IRS). Dieser berechnete sich als Summe der Einzelprodukte aus den Parametern Färbeintensität und prozentualer Anteil positiver Zellen. Insgesamt waren Werte zwischen 0 und 300 möglich. Für jeden Gewebeschnitt wurde der IRS separat für die verschiedenen Zelllokalisationen (Zellkern, Zytoplasma, Zellmembran) bestimmt.

Färbeintensität	SI	Prozentsatz positiver Zellen	SI x Prozentsatz
kein Signal	0	100 %	0 x Prozentsatz
schwaches Signal	1	auf einzelnen Färbeintensitäten	1 x Prozentsatz
mäßiges Signal	2	verteilt	2 x Prozentsatz
starkes Signal	3		3 x Prozentsatz

$$\text{IRS} = \text{Summe der Einzelprodukte (0-300)}$$

**Tab. 3:** Berechnung des Immunoreaktiven Scores

**Beispielrechnung:** 10% der Zellen starkes Signal (3), 20% der Zellen mäßiges Signal (2), 70 % der Zellen kein Signal (0);  

$$\text{IRS} = (10 \times 3) + (20 \times 2) + (70 \times 0) = 70$$

## 2.7 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Messergebnisse wurde von dem Institut für Medizinische Statistik der Universität Göttingen durchgeführt. Zu Beginn wurde der Einfluss der allgemeinen klinischen Patientenparametern auf das Gesamtüberleben mittels Cox Proportional Hazard Regressionen untersucht. Die Stärke des Einflusses wurde dabei durch das Hazard Ratio (mit zusätzlichem 95%-Konfidenzintervall) beschrieben. Desweiteren wurden die signifikant mit dem Überleben assoziierten Connexin-Expressionsprofile mit ebenfalls signifikanten Baselinecharakteristika verglichen. Hierzu wurde der Kruskal-Wallis-Test verwendet.

Der Einfluss des Gewebetyps (Epithel, Tumor, Lymphknotenmetastase) und der Zelllokalisierung (Zellkern, Zytoplasma, Zellmembran) sowie deren Wechselwirkung auf die Expression der einzelnen Proteine wurde mittels nichtparametrischer Varianzanalyse für Daten mit Messwiederholungen (Brunner et al. 2002) untersucht. Im Falle signifikanter Wechselwirkungen wurden alle Gewebetypen bzw. alle Zelllokalisationen zusätzlich paarweise miteinander verglichen, ebenfalls mit nichtparametrischer Varianzanalyse. Alle Tests wurden zu einem Signifikanzniveau von  $\alpha = 5\%$  ausgeführt. Alle Analysen wurden mit der Statistik-Software R (Version 2.15, [www.r-project.org](http://www.r-project.org)) vorgenommen.

## **3 Ergebnisse**

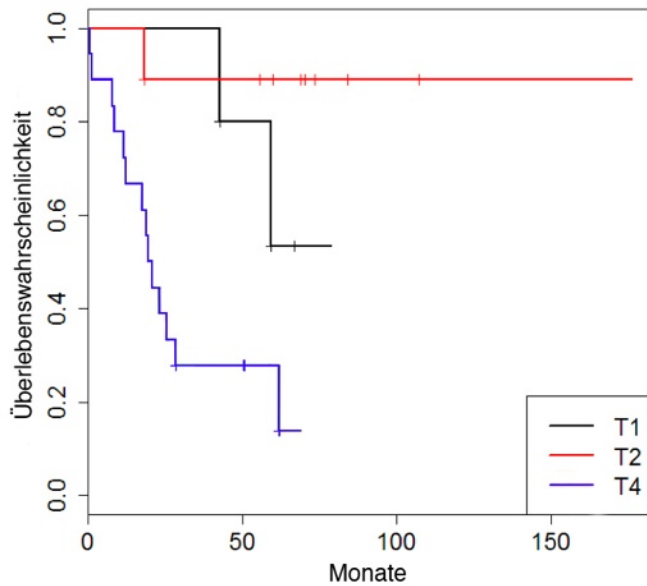
### **3.1 Klinische Auswertung**

#### **3.1.1 Patienten**

Das Untersuchungsmaterial für die immunhistochemische Evaluation stammte von 35 Patienten, von denen 23 (66%) männlich und 12 (34%) weiblich waren. Das mittlere Alter bei Erstdiagnose lag bei 56,5 +/- 11,1 Jahren (+/- SD; Median: 58,0; Min: 31,0; Max: 79,0). Die mittlere Nachbeobachtungszeit lag bei 45,4 +/- 35,4 Monaten (+/- SD; Median: 49,5; Min: 0,7; Max: 176,1). Weitere klinische Patientencharakteristika sind in Tab. 7 (siehe Anhang, Seite 65/66) abgebildet.

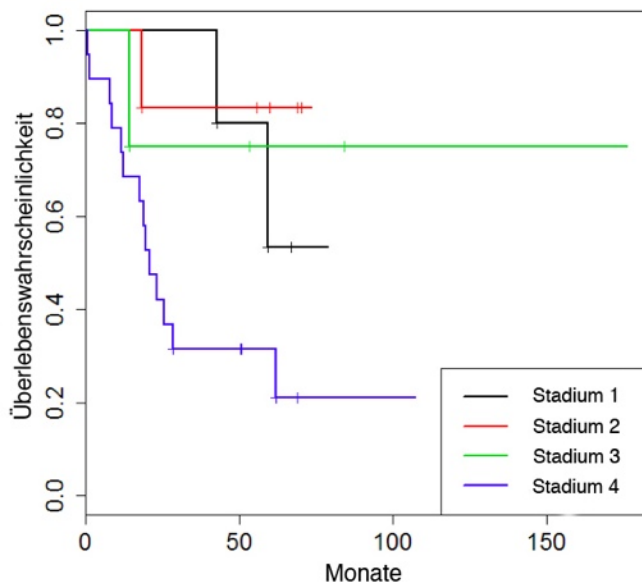
#### **3.1.2 Einflüsse allgemeiner Patientenparameter auf das Überleben**

Bei der statistischen Auswertung wurden die allgemeinen klinischen Patientenparameter mit dem Gesamtüberleben mittels Cox-Proportional-Hazard-Regressionen korreliert. Unter den untersuchten Parametern (Tab. 7) konnte eine signifikante Verschlechterung des postoperativen Gesamtüberlebens mit einem höheren T-Stadium ( $p < 0,01$ ), einem fortgeschrittenen UICC-Stadium ( $p = 0,03$ ) und der anatomischen Lage der primären Tumorlokalisation ( $p = 0,02$ ) nachgewiesen werden (siehe Anhang, Seite 67). Aufgrund der geringen Fallzahlen konnten sowohl das Tumorstadium T3 ( $n = 2$ ) als auch die unterschiedlichen Differenzierungsgrade (überwiegend G2) nicht in der Korrelationsanalyse berücksichtigt werden. Die Einflüsse der allgemeinen Patientenparameter auf das Gesamtüberleben sind in Tab. 8 (siehe Anhang, siehe Seite 67) abgebildet.



**Abb. 3:** Überlebenswahrscheinlichkeit nach Kaplan-Meier für Patienten mit unterschiedlichem Tumorstadium; T1 (schwarze Kurve); T2 (rote Kurve); T4 (blaue Kurve)

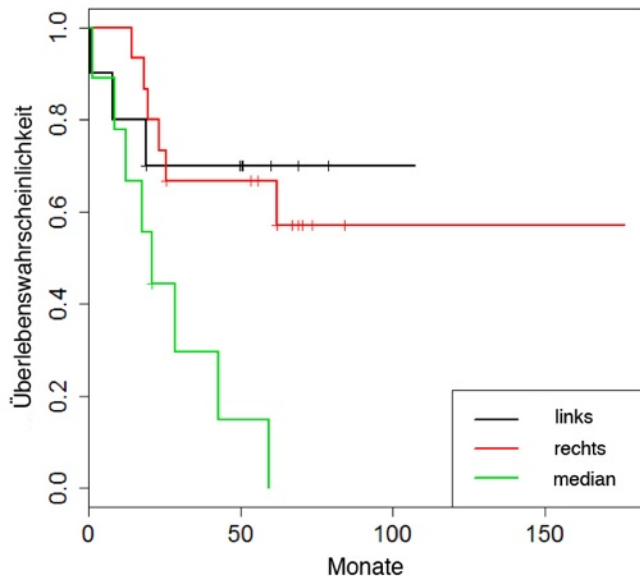
Zwischen Tumorstadium T1 und T2 konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden ( $p=0,28$ ). Die Daten der paarweisen Vergleiche sind in Tab. 8 dargestellt (siehe Anhang, Seite 67).



**Abb. 4:** Überlebenswahrscheinlichkeit nach Kaplan-Meier für Patienten mit unterschiedlichem UICC-Stadium; Stadium 1 (schwarze Kurve); Stadium 2 (rote Kurve); Stadium 3 (grüne Kurve); Stadium 4 (blaue Kurve)

In Abb. 3 ist die Abhängigkeit der Überlebenswahrscheinlichkeit von dem T-Stadium dargestellt. Die Patienten mit dem Tumorstadium T4 (blaue Kurve) zeigten eine signifikant kürzere postoperative Überlebenswahrscheinlichkeit als die Patienten mit dem Tumorstadium T2 ( $p<0,01$ ) (rote Kurve) und eine annähernd signifikant kürzere Überlebenswahrscheinlichkeit als die Patienten mit Tumorstadium T1 ( $p=0,08$ ) (schwarze

In Abb. 4 ist die Abhängigkeit der Überlebenswahrscheinlichkeit von dem UICC-Stadium abgebildet. Die Patienten mit einem UICC-Stadium 4 (blaue Kurve) zeigten eine signifikant kürzere postoperative Überlebenswahrscheinlichkeit als die Patienten mit einem UICC-Stadium 2 ( $p=0,03$ ) (rote Kurve). Die Unterschiede zwischen Stadium 1 und 2 ( $p=0,50$ ), Stadium 3 und 1 ( $p=0,79$ ) und Stadium 4 und 1 ( $p=0,12$ ) waren nicht signifikant.

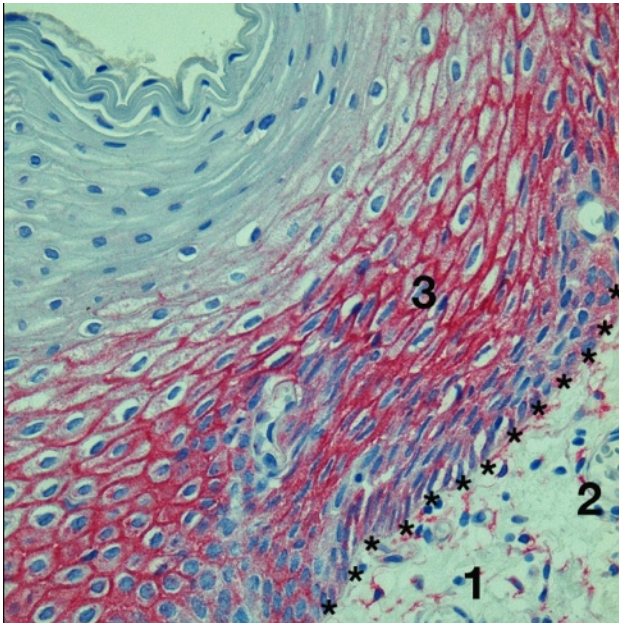


**Abb. 5:** Überlebenswahrscheinlichkeit nach Kaplan-Meier für Patienten mit unterschiedlicher primärer Tumorlokalisation; links (schwarze Kurve); rechts (rote Kurve); median (grüne Kurve)

In Abb. 5 ist die Abhängigkeit der Überlebenswahrscheinlichkeit von der primären Tumorlokalisation (links, rechts, median) abgebildet. Die Patienten mit einem median gelegenen Primärtumor (grüne Kurve) zeigten eine signifikant kürzere postoperative Überlebenswahrscheinlichkeit, als die Patienten mit der primären Tumorlokalisation auf der rechten- ( $p < 0,01$ ) (rote Kurve) oder linken Seite ( $p = 0,03$ ) (schwarze Kurve).

### 3.2 Immunhistochemische Expressionsmuster

#### 3.2.1 Deskriptive Analyse der Connexin-43-Expression

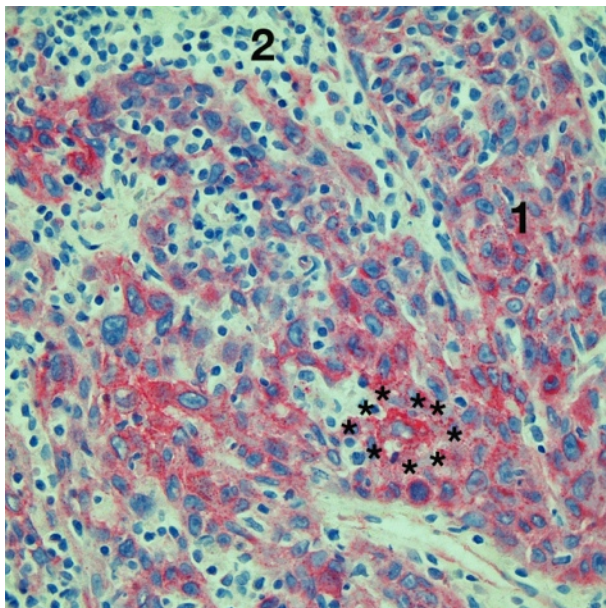


**Abb. 6:** Exemplarische Darstellung der Cx43-Immunhistochemie der Mundschleimhaut; Subepitheliales Stroma (1); Blutgefäß mit Erythrozyten (2); Basalmembran mit aufliegenden Keratinozyten (\*); Orale Schleimhaut (3); Originalvergrößerung x20

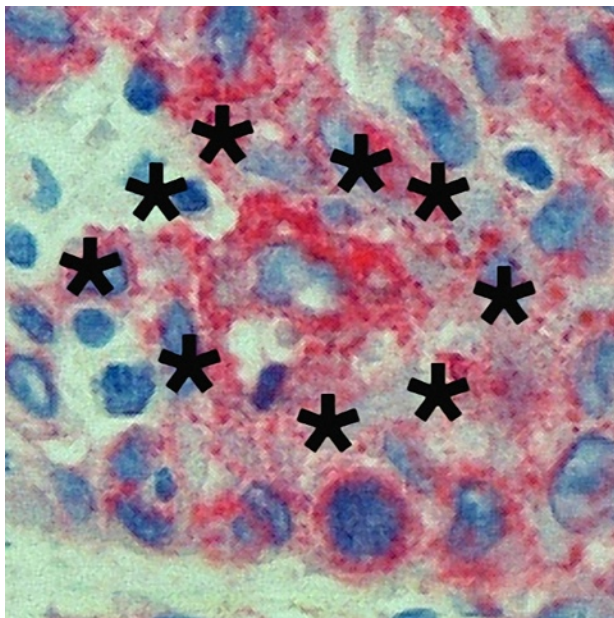
Auf Abb. 6 ist ein histologischer Schnitt eines oralen, mehrschichtigen, teils verhornten Plattenepithels mit seiner typischen Schichtung zu erkennen. Bei diesem Präparat wurde eine immunhistochemische Färbung mit dem Antikörper gegen Cx43 durchgeführt, der sich in der Abbildung rot darstellt. Im rechten unteren Bildausschnitt ist das subepitheliale Stroma (1) mit einem angeschnittenen Blutgefäß und darin enthaltenen Erythrozyten abgebildet (2). Die orale Schleimhaut grenzt sich von dem subepithelialen Stroma deutlich durch die gut erhaltene Basalmembran (\*) ab. Auf dieser liegen die sich teilenden Keratinozyten, die von dort aus nach luminal wandern und dabei intrazellulär Keratin bilden. Die in diesem Präparat stark rot angefärbten Connexin-Komplexe liegen granulär und klusterartig zusammengelagert über die Zellmembranen der Keratinozyten verteilt (3). Die intrazelluläre Cx43-Expression ist im Gegensatz zu der membranösen Expression schwächer ausgeprägt. Deutlich ist zu erkennen, dass Cx43 vorwiegend im Stratum spinosum exprimiert wurde. In den oberflächlichen Epithelschichten nimmt die Cx43-Expression ab und ist in den obersten Lagen und der schmalen Parakeratoseschicht histologisch nicht mehr nachweisbar.

Die orale Schleimhaut grenzt sich von dem subepithelialen Stroma deutlich durch die gut erhaltene Basalmembran (\*) ab. Auf dieser liegen die sich teilenden Keratinozyten, die von dort aus nach luminal wandern und dabei intrazellulär Keratin bilden. Die in diesem Präparat stark rot angefärbten Connexin-Komplexe liegen granulär und klusterartig zusammengelagert über die Zellmembranen der Keratinozyten verteilt (3). Die intrazelluläre Cx43-Expression ist im Gegensatz zu der membranösen Expression schwächer ausgeprägt. Deutlich ist zu erkennen, dass Cx43 vorwiegend im Stratum spinosum exprimiert wurde. In den oberflächlichen Epithelschichten nimmt die Cx43-Expression ab und ist in den obersten Lagen und der schmalen Parakeratoseschicht histologisch nicht mehr nachweisbar.





**Abb. 7:** Exemplarische Darstellung der Cx43-Immunhistochemie des oralen Plattenepithelkarzinoms; Tumorzellverband (1); Reduziertes Stroma mit eingewanderten Lymphozyten (2); Perinukleäre Cx43-Anreicherung (\*); Originalvergrößerung x40

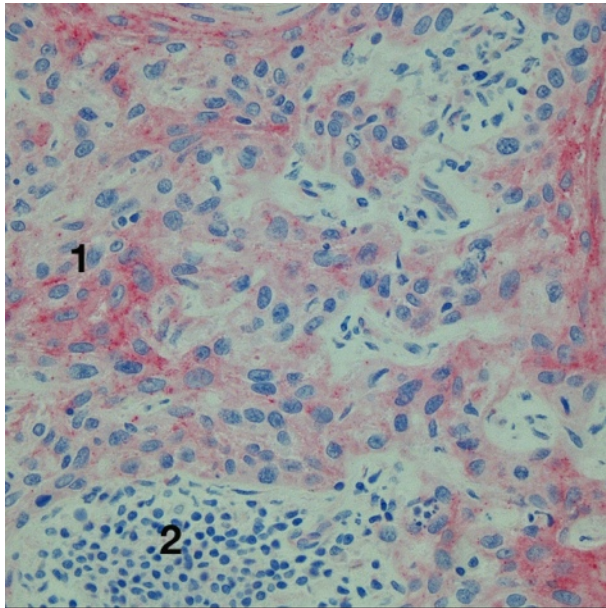


**Abb. 8:** Vergrößerte Darstellung der perinukleären Cx43-Anreicherung aus Abb. 7 (\*)

Auf Abb. 7 ist der Ausschnitt eines primären oralen Plattenepithelkarzinoms dargestellt. Deutlich sind die atypischen Tumorzellen zu erkennen, die in soliden Formationen das umliegende Stroma infiltrieren (1). Eine plattenepitheliale Schichtung ist weitgehend aufgehoben. Der Tumorzellverband zeigt eine charakteristische Zell- und Kernpolymorphie. Vereinzelt sind Mitosefiguren und Apoptosen zu erkennen. Zwischen den Tumorzellen sind einige lockere Bindegewebssepten abgebildet, in die Lymphozyten und Plasmazellen eingewandert sind (2). Deutlich ist zu erkennen, dass in den Tumorzellen Cx43 exprimiert wurde. Im Vergleich zu dem normalen Plattenepithel (Abb. 6) hat sich die Verteilung der Protein-Komplexe verändert. Während Cx43 in der normalen Mundschleimhaut (Abb. 6) vorwiegend in der Zellmembran nachgewiesen werden konnten und die Abbildung daher durch ein netzartiges Erscheinungsbild dominiert wurde, hat sich Cx43 in dem Tumorzellverband vermehrt intrazel-

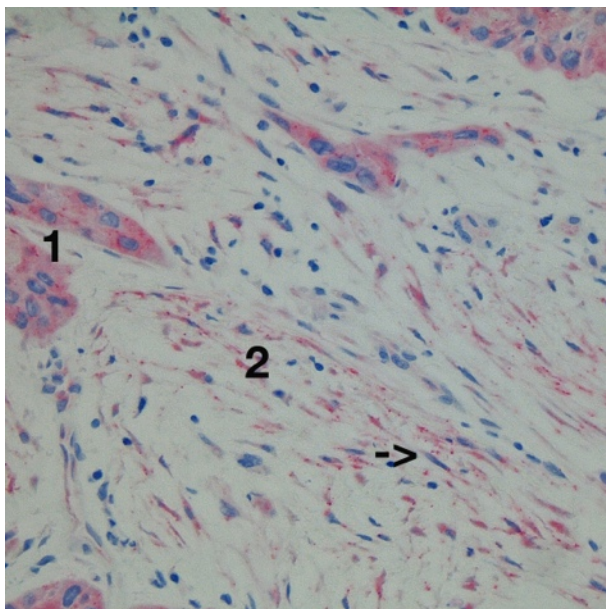
lulär angereichert. Im unteren Bildausschnitt ist eine perinukleäre Cx43-Anreicherung zu erkennen (Abb. 8). Das netzartige Erscheinungsbild, das Abb. 6 dominierte, ist in diesem Ausschnitt komplett aufgehoben.





**Abb. 8:** Exemplarische Darstellung der Cx43-Immunhistochemie einer Lymphknotenmetastase; Tumorzellverband (1); Stroma mit Lymphozyten (2); Originalvergrößerung x40

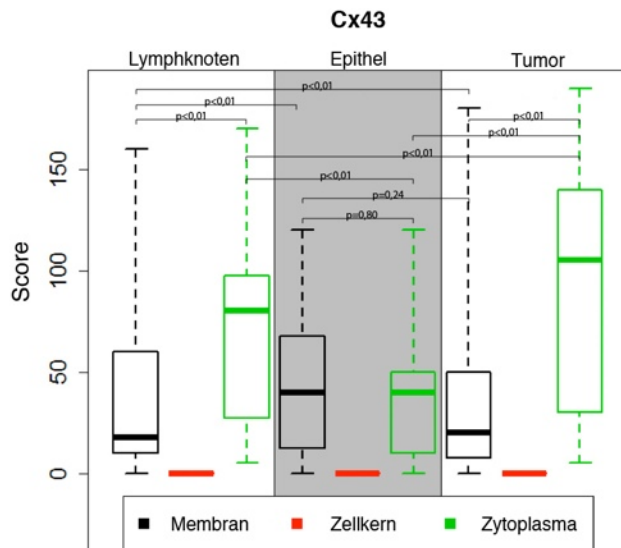
Auf Abb. 8 ist der Ausschnitt einer assoziierten Lymphknotenmetastase eines oralen Plattenepithelkarzinom dargestellt. Wie schon auf der Abbildung des Primärtumors (Abb. 7) erkennt man den infiltrativ wachsenden Tumorzellverband, mit der typischen Zell- und Kernpolymorphie (1). Im unteren Abschnitt ist die Ansammlung von Lymphozyten und Plasmazellen (2) zu erkennen. Die Tumorzellen sind teils stark, teils weniger stark Cx43-positiv. Die Proteine liegen vorwiegend granulär und intrazellulär verteilt.



**Abb. 9:** Exemplarische Darstellung der Cx43-Immunhistochemie einer Lymphknotenmetastase; Tumorzellverband (1); Desmoplastische Stromareaktion (2); Myofibroblast (->); Originalvergrößerung x40

Auch auf Abb. 9 ist der Ausschnitt einer Lymphknotenmetastase abgebildet. Neben den atypischen Tumorzellen (1) ist im zentralen Bildausschnitt eine desmoplastische Stromareaktion (2) mit eingelagerten Myofibroblasten (->) dargestellt. Auch in dieser reaktiven Bindegewebsvermehrung können die Cx43-Komplexe mithilfe des Antikörpers angefärbt werden.

### 3.2.2 Lokalisationsanalyse der Connexin-43-Expression

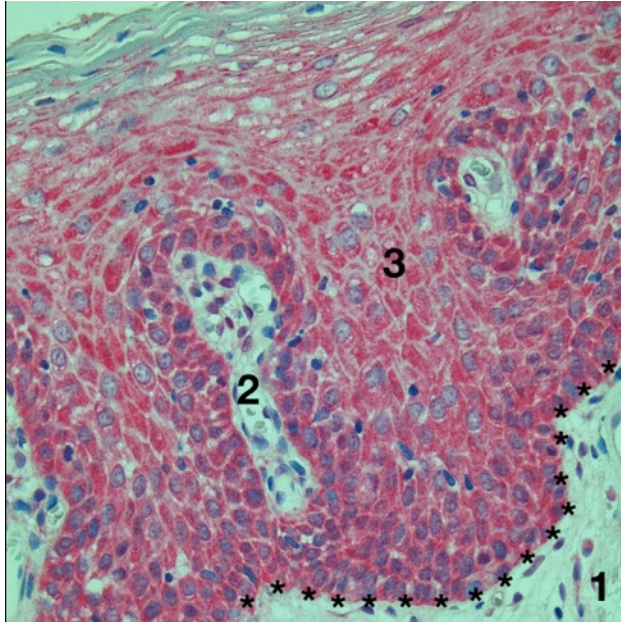


**Abb. 10:** Boxplot der morphologischen Verteilung der Cx43-Expression; Abszisse: Unterschiedliche Gewebetypen und Zelllokalisationen; Ordinate: Immunoreaktiver Score mit Median (schwarzer und grüner Querbalken) und beiden Quartilen (schwarzes und grünes Feld)

Auf Abb. 10 ist die morphologische Verteilung der Cx43-Expression zu erkennen. Im normalen Epithel konnte Cx43 sowohl im Zytoplasma als auch innerhalb der Zellmembran, nicht jedoch im Zellkern, nachgewiesen werden. Im paarweisen Vergleich lag die membranöse Expressionsstärke über der zytoplasmatischen Expressionsstärke. Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant ( $p=0,80$ ). Das beschriebene Verteilungsmuster änderte sich innerhalb

des Tumorgewebes. Hier kam es im Vergleich zu dem normalen Epithel zu einem signifikanten Anstieg der zytoplasmatischen ( $p<0,01$ ) und einem tendenziellen Abfall der membranösen Cx43-Expression ( $p=0,24$ ). Auch in den Präparaten der primären Tumorgewebe konnte keine Expression innerhalb des Zellkerns nachgewiesen werden. Insgesamt wurde in den Primärtumoren mehr Cx43 exprimiert als in der oralen Schleimhaut. In den Lymphknotenmetastasen kam es zu einem signifikanten Anstieg der zytoplasmatischen- ( $p<0,01$ ) und einem Abfall der membranösen Cx43-Expression im Vergleich zu dem normalen Epithel ( $p<0,01$ ). Die Expressionsstärke beider Zelllokalisationen lag unter der der Primärtumore ( $p<0,01$ ). Kernsignale konnten nicht nachgewiesen werden. Im Vergleich der einzelnen Lokalisationen untereinander, lag die Cx43-Expressionsstärke innerhalb des Zytoplasmas signifikant über der der Zellmembran ( $p<0,01$ ). Insgesamt wurde in den Lymphknotenmetastasen mehr Cx43 exprimiert als in der oralen Schleimhaut. Die Daten aller paarweisen Vergleiche sind in Tab. 12 und 13 dargestellt (siehe Anhang, Seite 69-71).

### 3.2.3 Deskriptive Analyse der Connexin-45-Expression

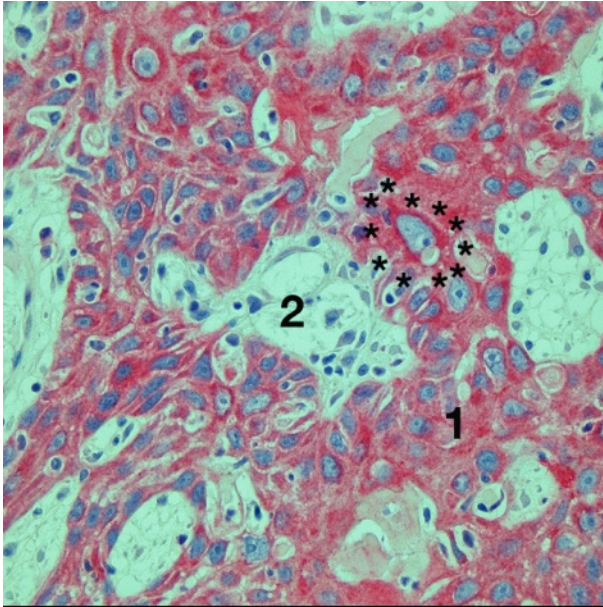


**Abb. 11:** Exemplarische Darstellung der Cx45-Immunhistochemie der Mundschleimhaut; Subepitheliales Stroma (1); Basalmembran mit aufliegenden Keratinozyten (\*); Stratum papillare (2); Orale Schleimhaut (3); Originalvergrößerung x20

Abb. 11 zeigt den Ausschnitt eines weitgehend normalen oralen Plattenepithels. Bei diesem Präparat wurde eine immunhistochemische Färbung gegen Cx45 durchgeführt. Wie bereits beschrieben erkennt man auch auf diesem Gewebeschnitt im rechten unteren Bildausschnitt das subepitheliale Stroma (1), welches sich durch die Basalmembran (\*) von der oralen Schleimhaut abgrenzt. Zentral sind zwei Papillen des Stratum papillare quer angeschnitten worden (2). Deutlich ist zu erkennen, dass fast alle Zellen des Epithels Cx45 stark expri-

miert haben (3). Im Gegensatz zu den Präparaten mit Cx43-Immunhistochemie, scheint es histologisch so, als würde die Cx45-Expressionsstärke von basal nach luminal zunehmen. In der für die Mundschleimhaut unphysiologischen Parakeratose-schicht kann jedoch kein Cx45 beobachtet werden (4). Im Gegensatz zu den Präparaten mit Cx43-Immunhistochemie, bei denen die Proteine vor allem in der Zellmembran nachgewiesen wurden, scheint Cx45 im oralen Plattenepithel fast ausschließlich intrazellulär vorzuliegen.

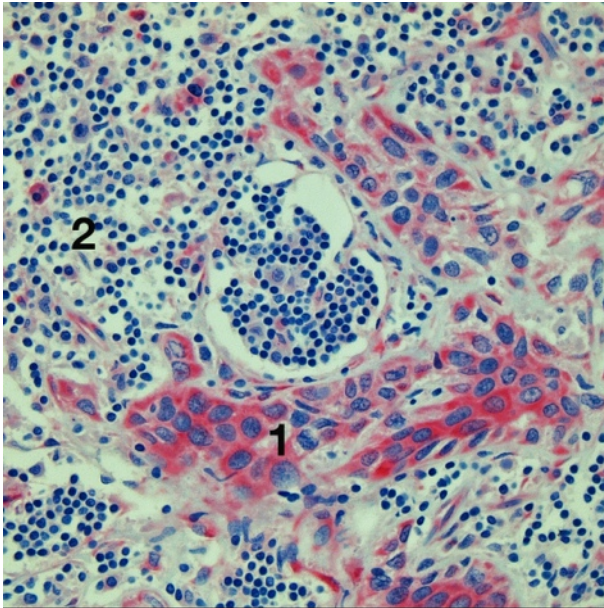




**Abb. 12:** Exemplarische Darstellung der Cx45-Immunhistochemie eines oralen Plattenepithelkarzinoms; Tumorzellverband (1); Reduziertes Stroma mit eingewanderten Lymphozyten (2); Perinukleäre Cx45-Anreicherung (\*); Originalvergrößerung x40

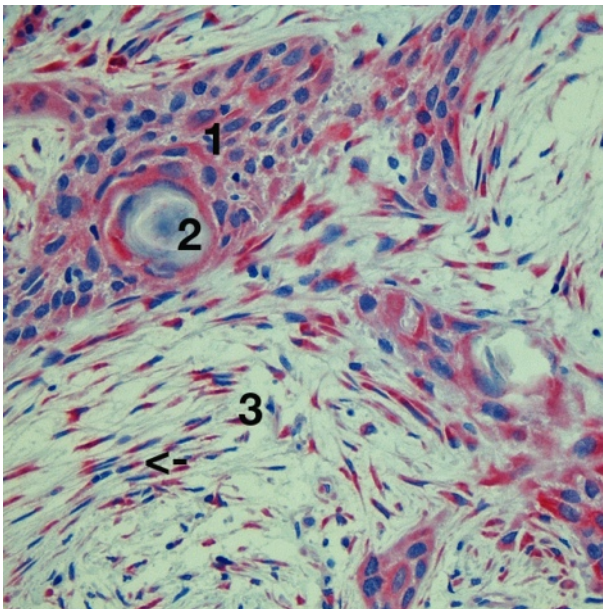
Auf Abb. 12 ist der Ausschnitt eines primären Plattenepithelkarzinoms mit Cx45-Immunhistochemie dargestellt. Die Tumorzellen (1) infiltrieren als solide zapfenartige Strukturen das umliegende Bindegewebe (2) und zeigen eine deutliche Zell- und Kernpolymorphie. In das umliegende Stroma sind vereinzelte Lymphozyten und Plasmazellen eingewandert (2). Auch in diesem Präparat kann eine starke Cx45-Positivität in dem Tumorzellverband beobachtet werden. Die größte Cx45-Anreicherung befindet sich auch hier intrazellulär und dort vor

allem perinukleär (\*). Das zelluläre Expressionsmuster des Cx45 hat sich im Vergleich zur physiologischen Mundschleimhaut nicht verändert.



**Abb. 13:** Exemplarische Darstellung der Cx45-Immunhistochemie einer Lymphknotenmetastase; Tumorzellverband (1); Stroma mit darin liegenden Lymphozyten (2); Originalvergrößerung x40

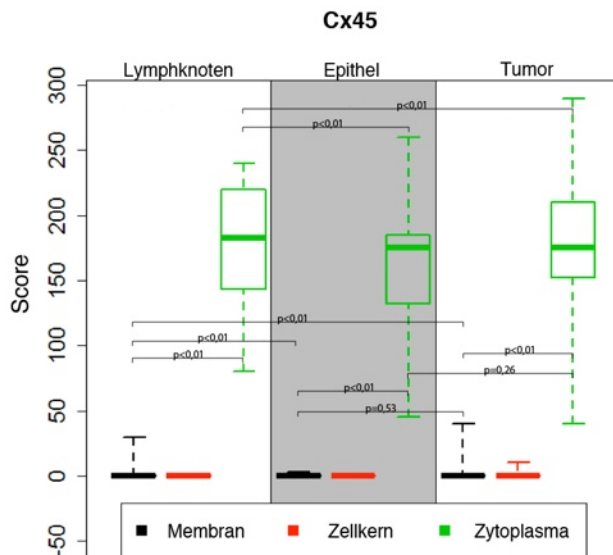
Abb. 13 zeigt den Ausschnitt einer Lymphknotenmetastase mit Cx45-Immunhistochemie. Neben den teilweise stark Cx45-positiven atypischen Tumorzellen (1) kann man auf dieser Abbildung gut das umliegende Stroma mit den eingewanderten Lymphozyten und Plasmazellen erkennen (2). Auch in diesem Gewebeschnitt liegt Cx45 vorwiegend intrazellulär vor.



**Abb. 14:** Exemplarische Darstellung der Cx45-Immunhistochemie einer Lymphknotenmetastase; Tumorzellverband (1); Keratinperle (2); Desmoplastische Stromareaktion (3); Myofibroblast (->); Originalvergrößerung x40

Auf Abb. 14 erkennt man den Ausschnitt aus einer assoziierten Lymphknotenmetastase. Neben den atypischen Tumorzellen (1) mit der charakteristischen Zell- und Kernpolymorphie ist im oberen linken Bildausschnitt eine Keratinperle zu erkennen (2). Angrenzend an den Tumorzellverband hat sich eine reaktive desmoplastische Stromareaktion (3) mit eingelagerten Myofibroblasten (->) ausgebildet. Neben den Tumorzellen kann auch innerhalb der abgebildeten Myofibroblasten eine starke Cx45-Positivität beobachtet werden.

### 3.2.4 Lokalisationsanalyse der Connexin-45-Expression



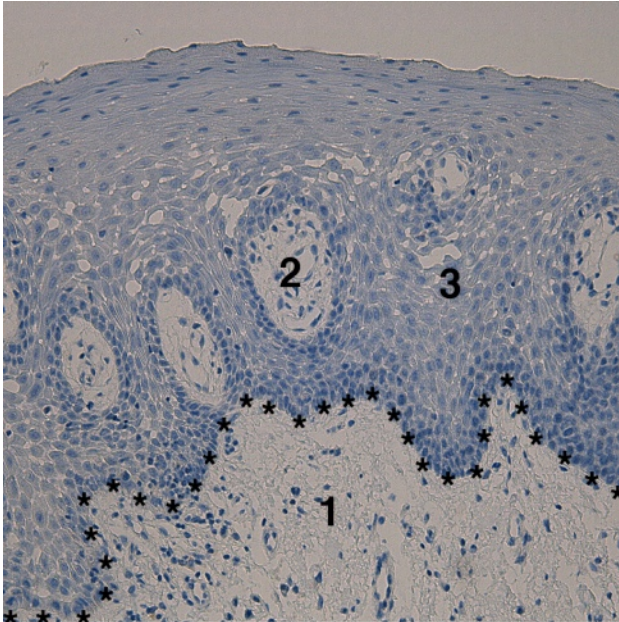
**Abb. 15:** Boxplot der morphologische Verteilung der Cx45-Expression; Abszisse: unterschiedliche Gewebetypen und Zelllokalisationen; Ordinate: immunoreaktiver Score mit Median (schwarzer und grüner Querbalken) und beiden Quartilen (grünes Feld)

Auf Abb. 15 ist das morphologische Verteilungsmuster der Cx45-Expression innerhalb der untersuchten Gewebetypen und den unterschiedlichen Zelllokalisationen dargestellt. Im normalen oralen Plattenepithel wurde Cx45 fast ausschließlich zytoplasmatisch exprimiert. Nur in Ausnahmefällen konnten dezente membranöse Signale, nicht jedoch Kernsignale beobachtet werden. Dieses Verteilungsmuster änderte sich auch innerhalb

der primären Tumorzellen nicht. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der zytoplasmatischen Expressionsstärke der Primärtumoren und des normalen Epithels festgestellt werden ( $p=0,26$ ). Nur in Ausnahmefällen konnte eine dezente Cx45-Expression innerhalb der Zellmembran und des Zellkerns nachgewiesen werden. In den Lymphknotenmetastasen kam es im Vergleich zu dem gesunden Epithel ( $p<0,01$ ) und den Primärtumoren ( $p<0,01$ ) zu einem signifikanten Anstieg der zytoplasmatischen Cx45-Expression. In wenigen Präparaten konnten dezente membranöse-, nicht jedoch Kernsignale nachgewiesen werden. Im paarweisen Vergleich der Zelllokalisationen untereinander lag die zytoplasmatische Expressionsstärke signifikant über der membranösen Expressionsstärke ( $p<0,01$ ). Die Daten der paarweisen Vergleiche sind in Tab. 12 und 13 dargestellt (siehe Anhang, Seite 69-71).

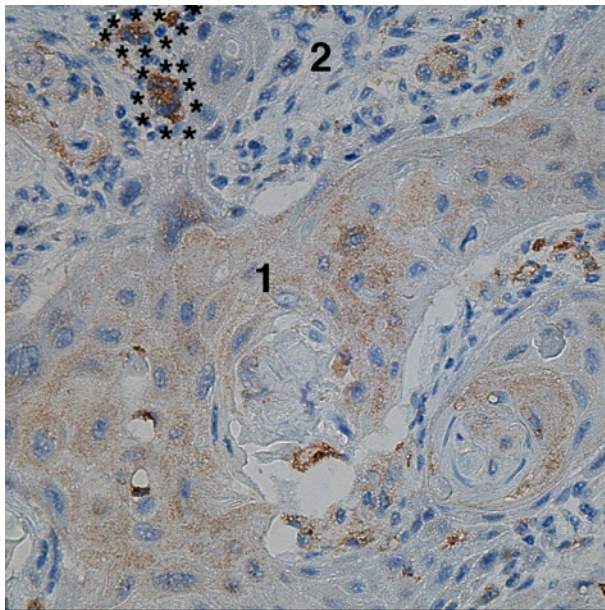


### 3.2.5 Deskriptive Analyse der Connexin-26-Expression

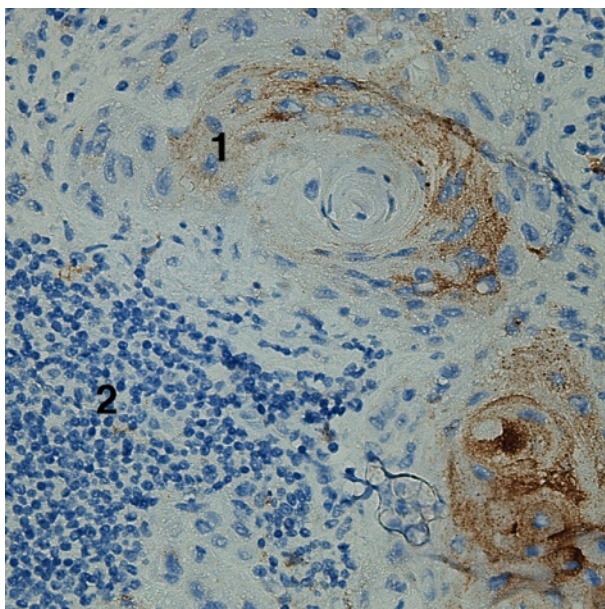


**Abb. 16:** Exemplarische Darstellung der Cx26-Immunhistochemie der Mundschleimhaut; Subepitheliales Stroma (1); Basalmembran mit aufliegenden Keratinozyten (\*); Stratum papillare (2); Orale Schleimhaut (3); Originalvergrößerung x20

Auf Abb. 16 ist der Ausschnitt eines weitgehend normalen oralen Plattenepithels mit der typischen Schichtung dargestellt. Bei diesem Präparat wurde eine immunhistochemische Färbung gegen Cx26 durchgeführt. In diesem Präparat erkennt man im unteren Bildausschnitt deutlich das subepitheliale Stroma (1), welches sich durch die Basalmembran (\*), mit den darauf liegenden Keratinozyten, von der Schleimhaut (3) abgrenzt. Zentral sind mehrere Papillen des Stratum papillare quer angeschnitten worden (2). Im Gegensatz zu den Vergleichspräparaten mit Cx43- und Cx45-Immunhistochemie kann histologisch kein Cx26 innerhalb des Epithels nachgewiesen werden.



**Abb. 17:** Exemplarische Darstellung der Cx26-Immunhistochemie eines oralen Plattenepithelkarzinoms; Tumorzellverband (1); reduziertes Stroma (2); mehrkernige Riesenzellen (\*); Originalvergrößerung x40



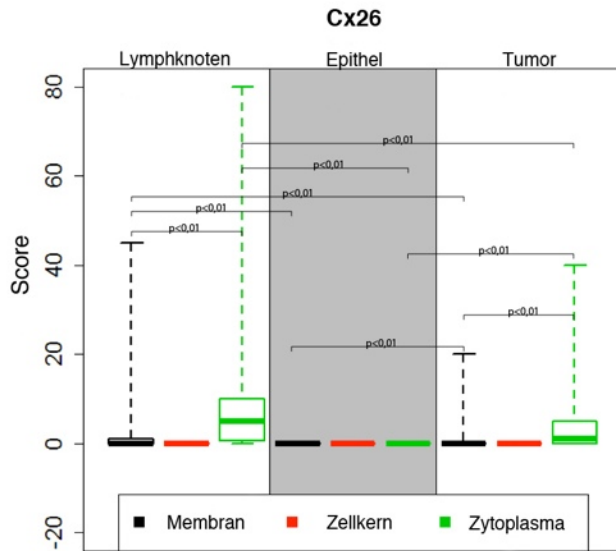
**Abb. 18:** Exemplarische Darstellung der Cx26-Immunhistochemie einer Lymphknotenmetastase; Tumorzellverband (1); Stroma mit darin liegenden Lymphozyten (2); Originalvergrößerung x40

Abb. 17 zeigt den Ausschnitt eines oralen Plattenepithelkarzinoms mit Cx26-Immunhistochemie. Die atypischen Tumorzellen (1) liegen infiltrativ als solider Verband zwischen dem umliegenden Bindegewebe (2), indem vereinzelt Leukozyten zu erkennen sind. Im Gegensatz zu dem physiologischen Epithel (Abb. 16), ist deutlich eine dezente zytoplasmatische Cx26-Anreicherung zu erkennen, die sich hier braun darstellt. Eine membranöse Cx26-Expression ist nicht nachweisbar. Im oberen linken Bildausschnitt sind deutlich zwei mehrkernige histiozytäre Riesenzellen zu erkennen, die im Vergleich zu den Tumorzellen eine starke zytoplasmatische Cx26-Expression zeigen (\*).

Auf Abb. 18 ist der Ausschnitt einer Lymphknotenmetastase mit Cx26-Immunhistochemie abgebildet. Im Vergleich zu dem Primärtumor (Abb. 17) zeigen die Tumorzellen (1) in diesem Präparat eine deutlich stärkere zytoplasmatische Cx26-Anreicherung. Im linken unteren Bildausschnitt erkennt man das umliegende Stroma mit eingelagerten Lymphozyten (1).



### 3.2.6 Lokalisationsanalyse der Connexin-26-Expression



**Abb. 19:** Boxplot der morphologischen Verteilung der Cx26-Expression; Abszisse: unterschiedliche Gewebetypen und Zelllokalisationen; Ordinate: immunoreaktiver Score mit Median (schwarzer und grüner Querbalken) und beiden Quartilen (grünes Feld)

Auf Abb. 19 ist die morphologische Verteilung des Cx26 innerhalb der unterschiedlichen Gewebetypen (Epithel, Tumor, Lymphknotenmetastase) und der verschiedenen Zelllokalisationen (Zellkern, Zytoplasma, Zellmembran) abgebildet. Deutlich ist zu erkennen, dass Cx26 im normalen Plattenepithel weder im Zellkern noch im Zytoplasma oder der Membran exprimiert wurde. Im Vergleich zum normalen Epithel kam es in dem primären

Tumorgewebe dagegen zu einem signifikanten Anstieg der zytoplasmatischen Cx26-Expression ( $p < 0,01$ ). Auch in diesen Präparaten konnten keine Kernsignale und nur in Ausnahmefällen dezente membranöse Signale nachgewiesen werden. In den Tumorzellen der Lymphknotenmetastasen war die Cx26-Expression insgesamt am stärksten. Es konnte eine signifikante Zunahme der zytoplasmatischen Expressionsstärke im Vergleich zu dem physiologischen Epithel ( $p < 0,01$ ) und der Primärtumore ( $p < 0,01$ ) nachgewiesen werden. In einigen Präparaten konnten Membransignale beobachtet werden. Kernsignale wurden dagegen nicht nachgewiesen. Im Vergleich der unterschiedlichen Zelllokalisationen untereinander lag die zytoplasmatische Cx26-Expressionsstärke in diesen Präparaten signifikant über der membranösen Cx26-Expressionsstärke ( $p < 0,01$ ). Die Daten der paarweisen Vergleiche sind in Tab. 12 und 13 dargestellt (siehe Anhang, Seite 69-71).

### 3.2.7 Zusammenfassung der Connexin-Expressionsmuster

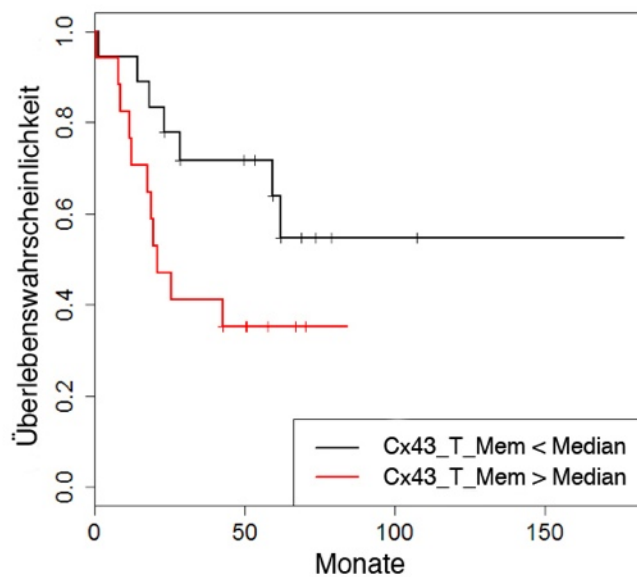
Bei der Expressionsanalyse der untersuchten Connexin-Subtypen konnten drei unterschiedliche Lokalisationsmuster nachgewiesen werden: Während in den Präparaten der physiologischen Mundschleimhaut immunhistochemisch kein Cx26 nachgewiesen werden konnte, unterschied sich die teils starke Cx43- und Cx45-Expression vor allem durch ihren Verteilungsmuster innerhalb des tumorfreien Epithels. Die stärksten Cx43-Signale wurden innerhalb der Zellmembran des Stratum spinosum nachgewiesen. Von dort aus nahm die Stärke bis in die oberflächliche Zelllage deutlich ab. Auch zytoplasmatisch wurde Cx43 nachgewiesen. Die zytoplasmatische Expressionsstärke war im Vergleich zu der membranösen Expressionsstärke jedoch deutlich schwächer. Im Gegensatz zu der Cx43-Expression schien die Cx45-Expression innerhalb des Plattenepithels von basal nach luminal hin zuzunehmen. Nur in der oberflächlichen Zelllage konnte auch bei diesen Präparaten kein Cx45 nachgewiesen werden. Cx45 wurde fast ausschließlich intrazellulär exprimiert. Ein schwaches membranöses Signal war nur in seltenen Fällen nachweisbar. Bei den Präparaten der primären Karzinome wurde eine schwache intrazelluläre und granuläre Cx26-Anreicherung nachgewiesen. Membranöse Signale waren dagegen nur selten nachweisbar. Im Vergleich zu der physiologischen Mundschleimhaut änderte sich das Verteilungsmuster der Cx43-Expression in dem Tumorgewebe. Während Cx43 in dem physiologischen Epithel stärker in der Zellmembran als im Zytoplasma exprimiert wurde, konnte es im Tumorgewebe am stärksten intrazellulär und dort vor allem perinukleär nachgewiesen werden. Über alle Zelllokalisationen kam es in den Primärtumoren jedoch zu einer Zunahme der Cx43-Expression. Im Gegensatz dazu änderte sich das Cx45-Verteilungsmuster zwischen gesundem Epithel und den Tumorzellen nicht. Auch in dem Tumorgewebe konnte eine starke intrazelluläre Cx45-Anreicherung nachgewiesen werden. Die stärksten Signale lagen auch hier perinukleär. Die Connexin-Expression innerhalb der assoziierten Lymphknotenmetastasen ähnelt der Expression innerhalb der Primärtumore. Die Stärke der Cx26-Anreicherung war in diesen Präparaten jedoch deutlich höher als bei den Präparaten der primären Karzinome. Neben der deutlich erhöhten intrazellulären Cx26-Expression konnten auch ver-

stärkt membranöse Signale nachgewiesen werden. Eine nukleäre Expression wurden dagegen nicht beobachtet. Auch das histologische Verteilungsmuster der Connexine 43 und 45 änderte sich nicht zwischen den primären Karzinomen und den assoziierten Lymphknotenmetastasen. Die Cx43-Expressionsstärke in den Metastasen lag über der des normalen Epithels, jedoch unter der der Primärtumore. Die Cx45-Expressionsstärke innerhalb der Metastasen war signifikant höher als in den Primärtumoren. Bei der immunhistochemischen Evaluation der Gewebeschnitte konnte in einigen Präparaten der primären Karzinome und der assoziierten Lymphknotenmetastasen desmoplastische Stromareaktionen in unmittelbarer Nachbarschaft der Tumorzellverbände beobachtet werden. Die darin enthaltenen Myofibroblasten zeigten neben der membranösen auch eine deutlich zytoplasmatische Cx43- und Cx45-Positivität. Cx26 konnte hingegen nicht nachgewiesen werden.

### **3.3 Connexine und Überlebenswahrscheinlichkeit**

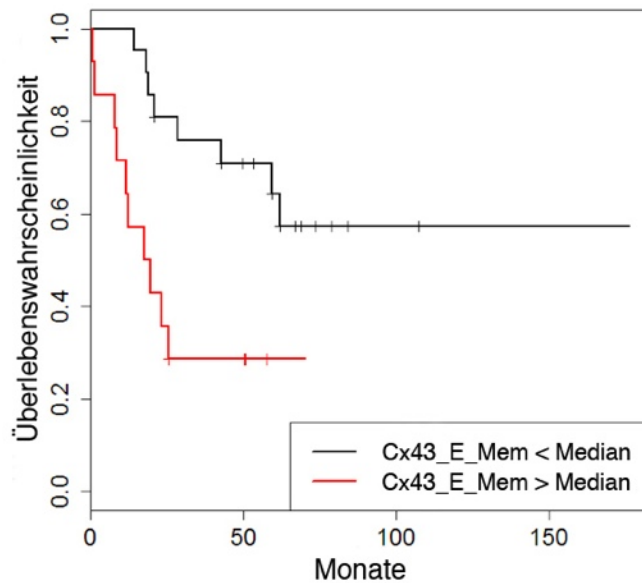
Bei der statistischen Auswertung wurden die immunhistochemischen Daten mit dem Gesamtüberleben mittels Cox-Proportional-Hazard-Regressionen korreliert. Die Stärke der membranösen Cx43-Expression in den Tumorzellen war mit einem verkürzten Gesamtüberleben assoziiert ( $p=0,0088$ ). Eine annähernd signifikante gleichartige Assoziation konnte für Keratinozyten des normalen Mundschleimhautepithels ( $p=0,0596$ ) nachgewiesen werden. Die Expression der Connexine 26 und 45 zeigte dagegen keinen signifikanten Zusammenhang mit der Überlebenszeit. Die Daten der Korrelationsanalyse sind in Tab. 9 dargestellt (siehe Anhang, Seite 68). Um den Einfluss allgemeiner Patientenparameter auf die Cx43-Expression zu untersuchen, wurden die immunhistochemischen Daten mit den klinischen Parametern korreliert, die ebenfalls mit einem verkürzten Gesamtüberleben assoziiert waren (T-Stadium, UICC-Stadium, mediane Primärtumorlokalisation). Die Cx43-Expression in der Tumorzellmembran war unabhängig von dem T-Stadium ( $p=0,06$ ), dem UICC-Stadium ( $p=0,07$ ) und der Primärtumorlokalisation ( $p=0,79$ ). Die Höhe der membranösen Cx43-Expressionsstärke innerhalb des normalen Epithels korrelierte positiv signifikant mit einem hohen T-Stadium ( $p<0,01$ ) und ei-

nem hohen UICC-Stadium ( $p < 0,01$ ), nicht aber mit der Tumorlokalisation ( $p = 0,89$ ). Die Daten dieser Korrelationsanalyse sind in Tab. 10 abgebildet (siehe Anhang, Seite 69). Die membranöse Cx43-Expression in den Tumorzellen war in der vorliegenden Untersuchung ein von allgemeinen klinischen Patientenparametern unabhängiger Marker für die Prognose der Patienten.



**Abb. 20:** Überlebenswahrscheinlichkeit nach Kaplan-Meier für die Cx43-Expression in der Tumorzellmembran ( $p = 0,0088$ ); Median der IRS-Werte=20; Werte oberhalb des Medians (rote Kurve); Werte unterhalb des Medians (schwarze Kurve)

Auf Abb. 20 ist der Zusammenhang der Überlebenswahrscheinlichkeit mit der membranösen Cx43-Expression dargestellt. Patienten mit einer hohen Cx43-Expression in der Tumorzellmembran (rote Kurve) zeigten eine niedrigere Überlebenswahrscheinlichkeit als die Patienten, bei denen weniger Cx43 in der Zellmembran exprimiert wurde (schwarze Kurve).



**Abb. 21:** Überlebenswahrscheinlichkeit nach Kaplan-Meier für die Cx43-Expression in der Zellmembran der Keratinozyten des normalen Epithels ( $p=0,0596$ ); Median der IRS-Werte=40; Werte oberhalb des Medians (rote Kurve); Werte unterhalb des Medians (schwarz Kurve)

Auf Abb. 21 ist der Zusammenhang der Überlebenswahrscheinlichkeit mit der membranösen Cx43-Expression innerhalb der Zellen des normalen Epithels abgebildet. Auch in diesem Fall zeigten die Patienten mit einer hohen membranösen Cx43-Expression (rote Kurve) ein kürzeres postoperatives Gesamtüberleben als die Patienten mit einer niedrigen membranösen Cx43-Expression (schwarze Kurve).

## 4 Diskussion

1979 wurde von Loewenstein erstmals die These aufgestellt, dass Connexine durch den Aufbau interzellulärer Gap-Junction-Kanäle und der dadurch möglichen GJIC, an der zellulären Wachstumskontrolle beteiligt sind und ein Verlust der GJIC die Tumorgenese unterstützen kann (Loewenstein 1979). Nachdem viele Untersuchungen durchgeführt wurden, ist jedoch klar, dass Connexine nicht mehr als nur reine Bausteine dieser interzellulären Kanäle zu verstehen sind, sondern auch komplexere Aufgaben innerhalb der Zelle wahrnehmen. Diese intrazellulären Funktionen sind bis heute jedoch nicht eindeutig verstanden.

Um die genauen zellulären Funktionen der einzelnen Connexin-Subtypen während der Tumorgenese und -progression besser verstehen zu können, ist eine differenzierte immunhistochemische Untersuchung der Expressions- und Lokalisationsprofile innerhalb der beteiligten Gewebetypen sinnvoll. Die Auswertung einer derartigen Untersuchung wird mit Hilfe eines immunreaktiven Scores (IRS) realisiert (Han et al. 2011). Die Aussagekraft der einzelnen Score-Systeme unterscheidet sich dabei stark voneinander. Einfache Score-Systeme teilen die untersuchten Tumorzellen lediglich in immunpositiv und -negativ ein, wodurch jedoch keine Aussage über die Expressionsstärke gemacht werden kann. Aus diesem Grund wurden komplexere Score-Systeme entwickelt, die den Prozentsatz einzelner Färbeintensitäten (in der Regel 0, 1, 2 und 3) der untersuchten Zellen angeben. Die wichtigste Information, die zelluläre Lokalisation, bleibt jedoch auch in diesen Systemen unberücksichtigt. Diese Information ist jedoch entscheidend, um die zelluläre Funktion des Proteins besser verstehen zu können. Ein Nachteil aller in der vorliegenden Untersuchungen zitierten immunhistochemischen Untersuchungen besteht darin, dass die Autoren bei der Auswertung keine differenzierte morphologische Evaluation der zellulären Connexin-Lokalisation durchgeführt haben. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden morphologischen Evaluation neben der prozentualen Verteilung der jeweiligen Färbeintensität die Connexin-Expression in jeder einzelnen Zelllokalisierung (Membran, Zytoplasma, Zellkern) separat untersucht, wodurch sich Anhaltspunkte auf die zelluläre Funktion ergeben, die in weiterführenden Untersuchungen analysiert werden können.

#### 4.1 Connexin 26

Im Rahmen der vorliegenden histologischen Evaluation wurde die Expression des Cx26 innerhalb der unterschiedlichen, an der Tumorprogression beteiligten Gewebe (Mundschleimhaut, Karzinom, Lymphknotenmetastase) und Zelllokalisationen (Membran, Zytoplasma, Zellkern) untersucht. Darüber hinaus wurden die Hypothesen getestet, dass es während der Tumorgenese zu einer Änderung der Cx26-Expression kommt, ein unterschiedliches morphologisches Verteilungsmuster innerhalb der verschiedenen Gewebe vorliegt und die Cx26-Expressionsstärke mit der Prognose der Patienten korreliert.

Connexin 26 wurde auf Proteinebene nicht in tumorfreier Mundschleimhaut exprimiert. Im Verlauf der Tumorgenese kam es jedoch zu einer schwachen intrazellulären Cx26-Anreicherung in den Tumorzellen. Die Signalstärke lag dennoch häufig an der unteren Nachweisgrenze. Morphologisch ist es, aufgrund der zytoplasmatischen Lokalisation, unwahrscheinlich, dass Cx26 in den Tumorzellen an dem Aufbau funktionstüchtiger Gap Junctions beteiligt ist. Eine membranöse Expression wurde nur vereinzelt nachgewiesen. Ähnliche Ergebnisse wurden von Qin et al. beschrieben. Die Arbeitsgruppe entwickelte eine GJIC-defiziente Brustkrebszelllinie (MDA-MB-435), die ein chimäres Cx26 exprimierte. Die Autoren fusionierten einen grün fluoreszierenden Farbstoff an die Aminogruppe dieses Cx26 (GFP-Cx26) und beobachtete daraufhin den Zusammenbau zu funktionslosen Gap Junctions. Wildtyp Cx26 und Cx26, bei denen der Farbstoff an der Carboxylgruppe fusionierte, führte dagegen zu funktionstüchtigen Kanälen, wodurch die GJIC in den Tumorzellen erhalten werden konnte (Qin et al. 2003). Im Vergleich zu den Connexinen 43 und 45 wurde Cx26 überwiegend in den keratinisierten Arealen des Tumorgewebes beobachtet. Eine im Vergleich zu dem normalen Epithel und zu dem Tumorgewebe der Primärtumoren signifikant ( $p < 0,01$ ) erhöhte Cx26-Expression konnte hingegen in den Lymphknotenmetastasen gemessen werden. Dort stieg neben der zytoplasmatischen auch die membranöse Cx26-Expression an. Eine nukleäre Cx26-Expression konnte in keinem der untersuchten Gewebetypen nachgewiesen werden. Eine direkte Korrelation der Cx26-Expressionsstärke mit dem Gesamtüberleben der Patienten lag nicht vor.

Ähnliche Ergebnisse wurden von Kanczuga-Koda et al. beschrieben. Die Arbeitsgruppe führte eine immunhistochemische Untersuchung der Cx26-Expression innerhalb der Tumorzellen des Mammakarzinoms und der dazugehörigen Lymphknotenmetastasen durch. Dabei beobachtete die Arbeitsgruppe in den Primärtumoren eine fast ausschließlich zytoplasmatische Cx26-Expression und beschrieb eine starke Erhöhung sowohl der zytoplasmatischen als auch der membranösen-Expression in den zugehörigen Lymphknotenmetastasen (Kanczuga-Koda et al. 2006). Auch Saito-Katsuragi et al. untersuchten immunhistochemisch die Beteiligung des Kanalproteins während der Metastasierung humaner maligner Melanome und beobachteten eine deutliche zytoplasmatische Cx26-Anreicherung in den untersuchten Tumorzellen und eine teilweise membranöse Expression in den tumornahen Lymphgefäßendothelien. In Kontrollpräparaten aus physiologischer Dermis und aus Naevuszellnaevi konnte dagegen keine Cx26-Expression nachgewiesen werden (Saito-Katsuragi et al. 2007).

Möglicherweise sind die maligne entarteten Tumorzellen in der Lage, eine Cx26-Expression in den Endothelzellen naheliegender Gefäße zu induzieren, wodurch sich homomere Gap Junctions zwischen beiden Zelltypen ausbilden können (Saito-Katsuragi et al. 2007). Eine derartige interzelluläre Verbindung könnte während der Diapedese die Anlagerung der Tumorzellen an die Gefäßwand und die Extravasation begünstigen. Erklärbar wäre diese Hypothese auch durch den in der vorliegenden Studie nachgewiesenen membranösen Cx26-Anstieg in den Tumorzellen der Lymphknotenmetastasen, nicht jedoch in den Tumorzellen der Primärtumore. Darüber hinaus scheint es so, als würde Cx26 auch bei der tumorassoziierten Angiogenese über die Regulierung Angiogenese-regulierender Gene durch GJIC-abhängige und -unabhängige Mechanismen eine Rolle spielen (Qin et al. 2003). Ein Screening 96 tumorassoziiertes Gene zeigte, dass durch Cx26 sowohl Transkription als auch Translation von Thrombospondin-1 (TSP-1), einem antiangiogenen Protein, in den Tumorzellen erhöht wurde (Qin et al. 2003). Durch Array-Analysen konnten 10 weitere Gene identifiziert werden, die durch Cx26 reguliert wurden. Zu diesen zählte der Bindegewebswachstumsfaktor CTGF, ebenfalls ein Angiogenese-regulierendes Molekül. Sowohl mRNA- als auch Proteinlevel des CTGF waren bei Cx26 erniedrigt (Qin et al. 2003).



Zusammenfassend deuten die Ergebnisse der vorliegenden Studie und die aktuelle Literatur darauf hin, dass eine Beteiligung des Connexin 26 während der Tumorgenese und -progression wahrscheinlich ist. Es scheint vor allem während der Metastasierung durch die Regulation der tumorassoziierten Angiogenese und der Ausbildung homomerer Gap Junctions zwischen Tumor- und Lymphgefäßendothelzelle eine Rolle zu spielen. Im Rahmen der durchgeführten Korrelationsanalyse konnte keine direkte Korrelation zwischen Cx26-Expressionsstärke und der Prognose der Patienten nachgewiesen werden. Trotzdem könnte Cx26 zu einer verstärkten lymphogenen Metastasierung und dadurch zu einem Unterschied zwischen der Prognose der Lymphknoten-positiven- und Lymphknoten-negativen Patienten führen.

#### **4.2 Connexin 43**

Unter allen bisher bekannten Connexinen kommt Cx43 am häufigsten vor und wurde in einer Vielzahl verschiedener Zelltypen wie Kardiomyozyten, Keratinozyten, Astrozyten, Endothelzellen, glatten Muskelzellen, Leydig-Zellen und Sertoli-Zellen beschrieben (Laird 2006). Kardial bildet es neben den homomeren, in Verbindung mit Cx45, auch heteromere Gap Junctions (Verheule et al. 1997). Viele Studien beschreiben eine Beteiligung des Cx43-Proteins bei der Genese und Progression in Tumoren der Lunge, der Astrozyten, der Zervix und der Brust (Avanzo et al. 2004, Iacobas et al. 2004, Iacobas et al. 2003, King et al. 2000, McLachlan et al. 2006).

Die Ergebnisse der vorliegenden immunhistochemischen Evaluation zeigen, dass Cx43 in der normalen Mundschleimhaut exprimiert wird. Morphologisch wurde das Protein überwiegend membranös im Stratum spinosum und zu einem geringeren Maße im Stratum basale und Stratum granulosum beobachtet. Möglicherweise nimmt die Cx43-Expression mit zunehmendem Keratinisierungsgrad vom Stratum spinosum, der Schicht mit der höchsten Dichte an interzellulären Verbindungen, zur obersten Zellschicht hin ab. Im Verlauf der Verhornung der Keratinozyten kommt es zu einer Reduzierung der Zellmembran (Tada und Hashimoto 1997), die wahrscheinlich zu einer Internalisierung und zum Abbau der aus Cx43 aufgebaut-

ten Connexone (Halbkanäle) führt. An diesem Vorgang sollen verschiedene Zytoskelettfilamente beteiligt sein (Murray et al. 1997).

Im Verlauf der Tumorprogression kam es in den Primärtumoren im Vergleich zu dem physiologischen Epithel über alle Zelllokalisationen zu einem Anstieg der Cx43-Expression. Morphologisch war jedoch ein Wechsel zwischen beiden Gewebetypen zu beobachten. In den Tumorzellen stieg die zytoplasmatische Expressionsstärke signifikant an ( $p < 0,01$ ), während die membranöse Cx43-Expression tendenziell abnahm ( $p = 0,24$ ).

Ähnliche Ergebnisse wurden von Tada und Hashimoto beschrieben (Tada und Hashimoto 1997). Die Autoren beschrieben die ultrastrukturelle Lokalisation des Cap Junction-Proteins Cx43 durch Immunfluoreszenz und Immunelektronenmikroskopie in normaler menschlicher Haut, in Basalzell- und Plattenepithelkarzinomen. Auch in dieser Lokalisationsanalyse wurde die stärkste Cx43-Expression innerhalb der Zellmembran der Keratinozyten im Stratum spinosum beobachtet. In den Proben beider Karzinomtypen war die Cx43-Expression geringer und punktueller ausgeprägt als in der physiologischen Haut. In diesen Präparaten lagen die Proteinkomplexe vorwiegend intrazellulär vor (Tada und Hashimoto 1997). Han et al. führten eine immunhistochemische Untersuchung der Cx43-Expression während der kolorektalen Adenom-Karzinom-Sequenz durch. Dabei beschrieben die Autoren eine verstärkte intrazelluläre Cx43-Anreicherung in den neoplastischen Läsionen. In dieser Untersuchung korrelierten die immunhistochemischen Daten mit dem Tumorstadium. Darüberhinaus wurde Cx43 auch im Tumorstroma in der Nähe der Invasionsfront nachgewiesen (Han et al. 2011). Auch Dubina et al. untersuchten die Beteiligung des Cx43 in fortgeschrittenen Stadien des Kolonkarzinoms und identifizierten mehrere Mutationen, die zu einer Leserasterverschiebung führten und in der Carboxylgruppe des Proteins lokalisiert waren. Die Expression dieser mutierten Proteine konnte nur in den invasiven Anteilen der Tumoren und dort zytoplasmatisch und membranös nachgewiesen werden (Dubina et al. 2002).

Während der Karzinogenese kommt es zu einem Verlust der aus Cx43 aufgebauten Gap Junctions und dadurch zu einem Verlust der GJIC. Bisher ist jedoch nicht abschließend geklärt, ob dieser Verlust durch einen erhöhten Abbau der interzellulären Kanäle oder fehlerhafte Transkriptionen und posttranskriptionale Modifikatio-

nen innerhalb der Connexine zustande kommt (Dubina et al. 2002). Eine aberrante zytoplasmatische Connexin-Lokalisation und die damit verbundene Störung der GJIC könnten jedoch wichtige Ereignisse während der Tumorgenese, Invasion und Metastasierung sein (el-Sabban und Pauli 1994, Nicolson et al. 1988). Darüber hinaus scheint es so, als wären diese intrazellulär lokalisierten Connexine in der Lage, mit diversen Bindungspartnern zu interagieren, wodurch sie eine Änderung in der Expression verschiedener Gene, wie z.B. Cyclin A, -D1, -D2 und Cyclin-abhängigen Kinasen (CDKs), bewirken können (Chen et al. 1995, Lecanda et al. 1998). Als Adhäsionsproteine ist die Beeinflussung intrazellulärer Signalwege denkbar (Lin et al. 2002). Giepmans et al. beschrieben den möglichen Zusammenhang des Cx43 und der als Protoonkogen bekannten aktivierten Tyrosinkinase Src (c-Src) (Giepmans et al. 2001a). Diese soll das Carboxylende des Proteins phosphorylieren, wodurch es zu einer stabilen Interaktion beider Bindungspartner und zu einem Verlust der GJIC kommt (Giepmans et al. 2001a).

Entgegen der Ergebnisse von Kanczuga-Koda et al., die die Cx43-Expression innerhalb des Mammakarzinoms und assoziierter Lymphknotenmetastasen untersuchten und eine überwiegend zytoplasmatisch erhöhte Cx43-Expression in den Metastasen im Vergleich zu den Primärtumoren beschrieben (Kanczuga-Koda et al. 2006), lag die Cx43-Expressionsstärke in der vorliegenden Untersuchung innerhalb der Lymphknoten signifikant unter der der Primärtumoren ( $p < 0,01$ ).

In der vorliegenden Korrelationsanalyse konnte ein signifikanter und von den übrigen klinischen Parametern unabhängiger Zusammenhang zwischen der Cx43-Expressionsstärke innerhalb der Tumorzellmembran und der Gesamtüberlebenszeit der Patienten ermittelt werden ( $p = 0,0088$ ). Entgegen der in der Literatur beschriebenen Annahme, dass der Verlust der membranösen Expression eine Entkopplung der Tumorzellen von der Wachstumskontrolle mit sich führt (Loewenstein 1979), lag die Überlebenszeit der Patienten mit einer niedrigen membranösen Cx43-Expression signifikant über der mit einer hohen membranösen Cx43-Expression.

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung und die aktuelle Literatur darauf hin, dass Connexin 43 an der Tumorgenese und Tumorphysion beteiligt ist. Eine hohe membranöse Cx43-Expressionsstärke in den

Tumorzellen konnte als unabhängiger Marker für eine schlechte Prognose der Patienten mit oralem Plattenepithelkarzinom identifiziert werden. Darüber hinaus war auch eine hohe membranöse Expression innerhalb der tumorfreien Schleimhaut mit einer schlechten Prognose assoziiert. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Cx43 in einem sehr frühen Stadium der Tumorprogression in bereits vorgeschädigter Mundschleimhaut exprimiert wird. Bisher ist jedoch noch unklar, warum eine hohe zytoplasmatische Cx43-Expressionsstärke im Gegensatz zu einer niedrigeren membranösen Expression ohne prognostische Relevanz zu sein scheint.

### 4.3 Connexin 45

In der vorliegenden Untersuchung wurde eine starke Cx45-Anreicherung in der normalen Mundschleimhaut nachgewiesen. Im Gegensatz zu Cx43 nahm die Cx45-Expression im normalen Plattenepithel von basal nach luminal hin zu und lag fast ausschließlich intrazellulär vor. In der oberflächlichen Zellschicht konnte auch bei diesen Präparaten keine Cx45-Expression erkannt werden. Aufgrund der fast ausschließlich zytoplasmatischen Cx45-Expression ist die Ausbildung von Cx45-enthaltenden Gap Junctions in der Mundschleimhaut unwahrscheinlich. Das beschriebene Verteilungsmuster änderte sich auch in dem Tumorgewebe nicht. Auch hier wurden die meisten Cx45-Signale intrazellulär und dort vor allem perinukleär beobachtet. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der Cx45-Expressionsstärke innerhalb der Mundschleimhaut und der Primärtumoren nachgewiesen werden ( $p=0,26$ ). Die stärkste Cx45-Anreicherung wurde in den Lymphknotenmetastasen beobachtet. Dort nahm sowohl die zytoplasmatische als auch die membranöse Cx45-Expression im Vergleich zu dem physiologischen Epithel und den Primärtumoren signifikant zu ( $p<0,01$ ).

Über die Beteiligung des Cx45 während der Tumorgenese und Tumorprogression sind bisher nur wenige Studien durchgeführt worden. Zhang et al. untersuchten die Verbindung von Cx45 und Cx43 in homo- und heteromeren Gap Junctions in der Zellmembran sechs verschiedener Lungenkarzinomzelllinien und Fibroblasten der Lunge. Um die interzelluläre Transportkapazität zu analysieren, injizierten die Autoren Luzifer-Gelb und Calcein-Ester in die Zellen und bestimmten den Transfer

in die benachbarte Zelle unter dem Fluoreszenzmikroskop. Dabei beobachtete die Arbeitsgruppe einen deutlich erniedrigten interzellulären Transfer in den Karzinomen im Vergleich zu den physiologischen Fibroblasten (Zhang et al. 2004). Udaka et al. untersuchten die Expression der Connexine 43 und 45 mit Hilfe der quantitativen RT-PCR in gesundem Lungengewebe und fortgeschrittenen Lungenkarzinomen der Maus; sie beschrieben eine Überexpression des Cx45 im Vergleich zu Cx43. In frühen Tumorkläsionen konnte dagegen kein Cx45 nachgewiesen werden (Udaka et al. 2007).

Als wahrscheinlich erschien bisher eine erstmals im Ventrikelmyokard beobachtete Co-Lokalisation der Connexine 43 und 45 (Martinez et al. 2002). Diese führt zu einem reduzierten Kanaldurchmesser der gebildeten heteromeren Gap Junctions (Grikscheit et al. 2008), wodurch es zu einer verminderten interzellulären Diffusionskapazität kommen kann (Koval et al. 1995). Dies scheint besonders während der Progression der Herzinsuffizienz eine Rolle zu spielen. Wahrscheinlich kommt es bei gleichzeitiger Verminderung der Cx43-Expression zu einer Erhöhung der Cx45-Expression und dadurch zu einer Aufhebung des funktionellen Synzytiums, wodurch eine verzögerte Erregungsleitung und Arrhythmien auftreten können (Yamada et al. 2003). Darüber hinaus beschrieben Lecanda et al. durch intrazelluläre Injektion von Luzifer-Gelb und Calcein-Ester einen reduzierten interzellulären Transfer bei Erhöhung der Cx45-Expression in verschiedenen Osteoblastenzelllinien, die daraufhin einen veränderten Phänotyp zeigten. Eine vermehrte Cx43-Expression führte in diesen Zellen zu einem erhöhten interzellulären Transfer (Lecanda et al. 1998). Möglicherweise sind Tumorzellen in der Lage, diesen Effekt zu nutzen und sich so der externen Wachstumskontrolle zu entziehen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung zeigen, dass entgegen der Cx43-Expression, die im physiologischen Epithel überwiegend und im Tumorgewebe teilweise in der Zellmembran nachgewiesen werden konnte, Cx45 in beiden Gewebetypen fast ausschließlich intrazellulär exprimiert wurde. Eine membranöse Co-Lokalisation beider Connexine in heteromeren Gap Junctions ist aus diesem Grund in den untersuchten Gewebetypen unwahrscheinlich. Bei der durchgeführten Korrelationsanalyse konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Cx45-Expressionsstärke und der Prognose der Patienten ermittelt werden. Die Er-

gebnisse werfen die Frage auf, welche intrazellulären Funktionen Cx45 übernimmt und warum es zu einem signifikanten Anstieg der Cx45-Expression innerhalb der Lymphknotenmetastasen kommt.

#### 4.4 Myofibroblasten

Myofibroblasten sind neben den Entzündungs- und Immunzellen, Makrophagen und tumorassoziierten Fibroblasten ein wichtiger Bestandteil des Tumorstromas (Albini und Sporn 2007, Barth und Westhoff 2007) und zeichnen sich durch die Expression des  *$\alpha$ -smooth muscle actins* ( $\alpha$ SMA) aus (Darby et al. 1990). Erstmals wurden sie bei der Regeneration von Hautwunden beschrieben, bei der sie mit Hilfe dieser kontraktile Filamente die Wundränder annähern (Majno et al. 1971). Darüber hinaus können sie direkte Zell-Zell-Kontakte ausbilden oder Substanzen wie Matrix-Metalloproteinasen, Chemokine, Lipide oder Wachstumsfaktoren sezernieren und ihre spezifischen Rezeptoren exprimieren, wodurch sie das Stroma modulieren können (Hinz 2007, Powell et al. 2005).

Die Im Rahmen der vorliegenden Studie untersuchten Tumorgewebe zeigten in ihrer unmittelbaren Nähe vermehrt desmoplastische Stromareaktionen mit darin enthaltenen Myofibroblasten. Innerhalb dieser Zellen konnte neben der membranösen auch eine zytoplasmatische Cx43- und Cx45-Expression beobachtet werden. Cx26 wurde dagegen nicht nachgewiesen. Ähnliche Ergebnisse wurden von Jamieson et al. beschrieben. In der Studie untersuchten die Autoren immunhistochemisch die Cx26- und Cx43-Expression im normalen menschlichen Brustgewebe und im invasiven Mammakarzinom. Cx43 wurde in den Myofibroblasten des Tumorstromas aller Karzinome exprimiert. Cx26 konnte dagegen nicht nachgewiesen werden (Jamieson et al. 1998). Miragoli et al. untersuchten die Ausbildung heteromerer Gap Junctions in kardialen Myofibroblasten und deren Kopplung an Kardiomyozyten und erkannten eine verstärkte Cx43- und Cx45-Expression in den untersuchten Zellen (Miragoli et al. 2006).

In der vorliegenden Untersuchung konnten erstmals eine Cx43- und Cx45-Expression in Myofibroblasten des Tumorstromas innerhalb des oralen Plattenepithelkarzinoms beschrieben werden. Diese Zellen sollen an der Invasion der Tumorzellen

in das umliegende Bindegewebe entscheidend beteiligt sein (De Wever et al. 2008). Möglicherweise sind Myofibroblasten in der Lage, homo- und heteromere Gap Junctions zu etablieren (Miragoli et al. 2006), mit deren Hilfe sie untereinander- und mit dem umliegenden Gewebe in Verbindung treten und kommunizieren können.

## 5 Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Studie bestand darin, die Expressions- und Lokalisationsmuster der Connexine 26, 43 und 45 immunhistochemisch zu evaluieren und mit der Prognose der Patienten zu korrelieren. Hierzu wurde ein differenzierter quantitativer immunoreaktiver Score mit subzellulären Lokalisationen (Zellmembran, Zytoplasma, Zellkern) verwendet. In morphologisch gesunder Mundschleimhaut war kein Cx26 nachweisbar. In den Primärtumoren kam es zu einer Zunahme der zytoplasmatischen- ( $p < 0,01$ ) und vereinzelt der membranösen Cx26-Expressionsstärke ( $p < 0,01$ ). Die höchsten Werte wurden in den Lymphknotenmetastasen gemessen. Dort kam es zu einem signifikanten Anstieg der zytoplasmatischen ( $p < 0,01$ ) und membranösen ( $p < 0,01$ ) Cx26-Expression im Vergleich zu den Primärtumoren. Ein Zusammenhang mit der Überlebenszeit bestand nicht. Eine Beteiligung des Cx26 an der Metastasierung durch die Regulation der tumorassoziierten Angiogenese und der Ausbildung homomerer Gap Junctions zwischen Tumor- und Gefäßendothelzelle ist dennoch wahrscheinlich (Qin et al. 2003, Saito-Katsuragi et al. 2007).

Cx43 wurde in der gesunden Mundschleimhaut überwiegend membranös und teilweise zytoplasmatisch exprimiert. Die größte Expressionsstärke wurde im Stratum spinosum beobachtet und nahm zu den oberflächlichen Epithelschichten hin ab. In den Primärtumoren kam es, über alle Zelllokalisationen, zu einem Anstieg der Cx43-Expression. Dabei war jedoch eine Änderung der morphologischen Verteilung zu beobachten. Im Vergleich zu der gesunden Schleimhaut stieg die zytoplasmatische Expression signifikant an ( $p < 0,01$ ), während die membranöse Cx43-Expression tendenziell abnahm ( $p = 0,24$ ). Innerhalb der Lymphknotenmetastasen lagen sowohl die zytoplasmatische als auch die membranöse Cx43-Expression signifikant unter denen der Primärtumoren ( $p < 0,01$ ). Im Vergleich mit der oralen Schleimhaut konnte in den Lymphknoten ein Anstieg der zytoplasmatischen- ( $p < 0,01$ ) und ein Abfall der membranösen Cx43-Expressionsstärke ( $p < 0,01$ ) beobachtet werden. Der im Verlauf der Tumorprogression in den Primärtumoren und Lymphknotenmetastasen beobachtete Anstieg der zytoplasmatischen Expressionsstärke hatte keinen Einfluss auf die Prognose der Patienten. Die in



den Primärtumoren im Vergleich zu dem normalen Epithel tendenziell herabregulierte membranöse Expressionsstärke zeigte dagegen eine signifikante negative Korrelation mit der Überlebenszeit der Patienten ( $p=0,0088$ ). Eine annähernd signifikante gleichartige Assoziation konnte für die membranöse Cx43-Expression in den Keratinozyten der normalen Mundschleimhaut nachgewiesen werden ( $p=0,0596$ ). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Cx43 in einem sehr frühen Stadium der Tumorprogression in bereits vorgeschädigter Mundschleimhaut exprimiert wird.

Cx45 wurde im tumorfreien Epithel und in den Primärtumoren fast ausschließlich intrazellulär exprimiert. Ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gewebetypen bestand nicht ( $p=0,26$ ). In den Lymphknotenmetastasen nahm die intrazelluläre Cx45-Expression signifikant zu ( $p<0,01$ ). Ein Zusammenhang mit der Überlebenszeit der Patienten konnte nicht nachgewiesen werden. In der vorliegenden Studie wurde Cx45 in allen Gewebetypen fast ausschließlich intrazellulär exprimiert, eine in der Literatur beschriebene Co-Lokalisation von Cx43 und Cx45 (Martinez et al. 2002) ist in diesen Gewebetypen daher unwahrscheinlich.

Bisher ist die Funktion der Connexine und GJIC während der Tumorgenese und -progression nur unzureichend verstanden. Mit der vorliegenden Untersuchung wurde erstmals eine detaillierte Expressions- und Lokalisationsanalyse innerhalb der bei der Ausbildung eines oralen Plattenepithelkarzinoms beteiligten Gewebetypen durchgeführt. Zum ersten Mal konnte eine signifikante negative Korrelation zwischen der membranösen Cx43-Expression im Tumorgewebe und der Prognose der Patienten nachgewiesen werden. Um die genaue Funktion der beschriebenen Connexin-Subtypen besser verstehen zu können, sind jedoch weitere Untersuchungen notwendig.

## 6 Ausblick

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie werfen Fragen auf, die in weiterführenden Untersuchungen abgeklärt werden sollten. Bisher ist nicht eindeutig geklärt, warum es im Verlauf der Tumorgenese zu einer intrazellulären Connexin-Anreicherung kommt oder welche Funktionen diese Proteine genau innerhalb der Zelle übernehmen. Zwei verschiedene Ansätze wären denkbar. Zum einen haben schon Dubina et al. auf mögliche Mutationen hingewiesen (Dubina et al. 2002), welche über fehlerhaft translatierte Connexine zu einer intrazellulären Akkumulation führen könnten. Eine intrazelluläre Anreicherung könnte Signalwege innerhalb der Zelle stark beeinflussen. Aus diesem Grund wäre eine Mutationsanalyse der untersuchten Connexin-Subtypen sinnvoll. Auf der anderen Seite ist die intrazelluläre Interaktion mit verschiedenen Bindungspartnern möglich, die den Transport in die Plasmamembran verhindern könnte. Eine Suche nach Connexin-Bindungspartnern wäre sinnvoll. Eine weitere abklärungsbedürftige Fragestellung liegt in der Rolle der Connexine während der Metastasierung. Besonders Cx26 steht in dem Verdacht, die Metastasierung zu fördern, wodurch sich die Prognose der Patienten entscheidend verschlechtern kann. Die Verbindung der Tumorzellen mit Endothelzellen von Lymph- und Blutgefäßen, wie sie von Saito-Katsuragi et al. beschrieben wurde (Saito-Katsuragi et al. 2007), sollte Gegenstand einer weiterführenden Untersuchung sein.

## 7 Literaturverzeichnis

- Ai Z, Fischer A, Spray DC, Brown AM, Fishman GI (2000): Wnt-1 regulation of connexin43 in cardiac myocytes. *J Clin Invest* 105, 161-171
- Albini A, Sporn MB (2007): The tumour microenvironment as a target for chemoprevention. *Nat Rev Cancer* 7, 139-147
- Annertz K, Anderson H, Biorklund A, Moller T, Kantola S, Mork J, Olsen JH, Wennerberg J (2002): Incidence and survival of squamous cell carcinoma of the tongue in Scandinavia, with special reference to young adults. *Int J Cancer* 101, 95-99
- Argiris A, Brockstein BE, Haraf DJ, Stenson KM, Mittal BB, Kies MS, Rosen FR, Jovanovic B, Vokes EE (2004): Competing causes of death and second primary tumors in patients with locoregionally advanced head and neck cancer treated with chemoradiotherapy. *Clin Cancer Res* 10, 1956-1962
- Argiris A, Eng C (2003): Epidemiology, staging, and screening of head and neck cancer. *Cancer Treat Res* 114, 15-60
- Argiris A, Karamouzis MV, Raben D, Ferris RL (2008): Head and neck cancer. *Lancet* 371, 1695-1709
- Avanzo JL, Mesnil M, Hernandez-Blazquez FJ, Mackowiak, II, Mori CM, da Silva TC, Oloris SC, Garate AP, Massironi SM, Yamasaki H (2004): Increased susceptibility to urethane-induced lung tumors in mice with decreased expression of connexin43. *Carcinogenesis* 25, 1973-1982
- Barth PJ, Westhoff CC (2007): CD34+ fibrocytes: morphology, histogenesis and function. *Curr Stem Cell Res Ther* 2, 221-227
- Beardslee MA, Laing JG, Beyer EC, Saffitz JE (1998): Rapid turnover of connexin43 in the adult rat heart. *Circ Res* 83, 629-635
- 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* 290, 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* 48, 3282-3287
- Brink P (2000): Gap junction voltage dependence. A clear picture emerges. *J Gen Physiol* 116, 11-12
- Brunner E, Domhof S, Langer F: Nonparametric Analysis of Longitudinal Data in Factorial Experiments. John Wiley and Sons, New York 2002
- 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* 99, 7113-7118
- Butkevich E, Hulsmann S, Wenzel D, Shirao T, Duden R, Majoul I (2004): Drebrin is a novel connexin-43 binding partner that links gap junctions to the sub-membrane cytoskeleton. *Curr Biol* 14, 650-658
- Carystinos GD, Kandouz M, Alaoui-Jamali MA, Batist G (2003): Unexpected induction of the human connexin 43 promoter by the ras signaling pathway is

- mediated by a novel putative promoter sequence. *Mol Pharmacol* **63**, 821-831
- 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* **6**, 681-690
- Cohen EE, Lingen MW, Vokes EE (2004): The expanding role of systemic therapy in head and neck cancer. *J Clin Oncol* **22**, 1743-1752
- Colevas AD (2006): Chemotherapy options for patients with metastatic or recurrent squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Clin Oncol* **24**, 2644-2652
- Cronier L, Crespin S, Strale PO, Defamie N, Mesnil M (2009): Gap junctions and cancer: new functions for an old story. *Antioxid Redox Signal* **11**, 323-338
- Crow DS, Beyer EC, Paul DL, Kobe SS, Lau AF (1990): Phosphorylation of connexin43 gap junction protein in uninfected and Rous sarcoma virus-transformed mammalian fibroblasts. *Mol Cell Biol* **10**, 1754-1763
- D'Souza G, Kreimer AR, Viscidi R, Pawlita M, Fakhry C, Koch WM, Westra WH, Gillison ML (2007): Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer. *N Engl J Med* **356**, 1944-1956
- Darby I, Skalli O, Gabbiani G (1990): Alpha-smooth muscle actin is transiently expressed by myofibroblasts during experimental wound healing. *Lab Invest* **63**, 21-29
- Darrow BJ, Laing JG, Lampe PD, Saffitz JE, Beyer EC (1995): Expression of multiple connexins in cultured neonatal rat ventricular myocytes. *Circ Res* **76**, 381-387
- De Andres L, Brunet J, Lopez-Pousa A, Burgues J, Vega M, Tabernero JM, Mesia R, Lopez JJ (1995): Randomized trial of neoadjuvant cisplatin and fluorouracil versus carboplatin and fluorouracil in patients with stage IV-M0 head and neck cancer. *J Clin Oncol* **13**, 1493-1500
- De Wever O, Demetter P, Mareel M, Bracke M (2008): Stromal myofibroblasts are drivers of invasive cancer growth. *Int J Cancer* **123**, 2229-2238
- DeRosa AM, Xia CH, Gong X, White TW (2007): The cataract-inducing S50P mutation in Cx50 dominantly alters the channel gating of wild-type lens connexins. *J Cell Sci* **120**, 4107-4116
- Ding M, Newman F, Raben D (2005): New radiation therapy techniques for the treatment of head and neck cancer. *Otolaryngol Clin North Am* **38**, 371-395, vii-viii
- Dubina MV, Iatckii NA, Popov DE, Vasil'ev SV, Krutovskikh VA (2002): Connexin 43, but not connexin 32, is mutated at advanced stages of human sporadic colon cancer. *Oncogene* **21**, 4992-4996
- Eghbali B, Kessler JA, Spray DC (1990): Expression of gap junction channels in communication-incompetent cells after stable transfection with cDNA encoding connexin 32. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 1328-1331
- Eghbali B, Kessler JA, Reid LM, Roy C, Spray DC (1991): Involvement of gap junctions in tumorigenesis: transfection of tumor cells with connexin 32 cDNA retards growth in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 10701-10705
- Eisbruch A, Marsh LH, Dawson LA, Bradford CR, Teknos TN, Chepeha DB, Worden FP, Urba S, Lin A, Schipper MJ (2004): Recurrences near base of skull after IMRT for head-and-neck cancer: implications for target delineation in

- high neck and for parotid gland sparing. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 59, 28-42
- el-Sabban ME, Pauli BU (1994): Adhesion-mediated gap junctional communication between lung-metastatic cancer cells and endothelium. *Invasion Metastasis* 14, 164-176
- Elfgang C, Eckert R, Lichtenberg-Frate H, Butterweck A, Traub O, Klein RA, Hülser DF, Willecke K (1995): Specific permeability and selective formation of gap junction channels in connexin-transfected HeLa cells. *J Cell Biol* 129, 805-817
- Elzarrad MK, Haroon A, Willecke K, Dobrowolski R, Gillespie MN, Al-Mehdi AB (2008): Connexin-43 upregulation in micrometastases and tumor vasculature and its role in tumor cell attachment to pulmonary endothelium. *BMC Med* 6, 20
- Falk MM (2000): Biosynthesis and structural composition of gap junction intercellular membrane channels. *Eur J Cell Biol* 79, 564-574
- Fallon RF, Goodenough DA (1981): Five-hour half-life of mouse liver gap-junction protein. *J Cell Biol* 90, 521-526
- Forastiere AA, Metch B, Schuller DE, Ensley JF, Hutchins LF, Triozzi P, Kish JA, McClure S, VonFeldt E, Williamson SK (1992): Randomized comparison of cisplatin plus fluorouracil and carboplatin plus fluorouracil versus methotrexate in advanced squamous-cell carcinoma of the head and neck: a Southwest Oncology Group study. *J Clin Oncol* 10, 1245-1251
- Fujimoto K, Nagafuchi A, Tsukita S, Kuraoka A, Ohokuma A, Shibata Y (1997): Dynamics of connexins, E-cadherin and alpha-catenin on cell membranes during gap junction formation. *J Cell Sci* 110 ( Pt 3), 311-322
- Garavello W, Randi G, Bosetti C, Dal Maso L, Negri E, Barzan L, Franceschi S, La Vecchia C (2006): Body size and laryngeal cancer risk. *Ann Oncol* 17, 1459-1463
- Geimonen E, Jiang W, Ali M, Fishman GI, Garfield RE, Andersen J (1996): Activation of protein kinase C in human uterine smooth muscle induces connexin-43 gene transcription through an AP-1 site in the promoter sequence. *J Biol Chem* 271, 23667-23674
- George CH, Kendall JM, Evans WH (1999): Intracellular trafficking pathways in the assembly of connexins into gap junctions. *J Biol Chem* 274, 8678-8685
- Ghoshroy S, Goodenough DA, Sosinsky GE (1995): Preparation, characterization, and structure of half gap junctional layers split with urea and EGTA. *J Membr Biol* 146, 15-28
- Giepmans BN (2004): Gap junctions and connexin-interacting proteins. *Cardiovasc Res* 62, 233-245
- Giepmans BN, Hengeveld T, Postma FR, Moolenaar WH (2001a): Interaction of c-Src with gap junction protein connexin-43. Role in the regulation of cell-cell communication. *J Biol Chem* 276, 8544-8549
- Giepmans BN, Verlaan I, Hengeveld T, Janssen H, Calafat J, Falk MM, Moolenaar WH (2001b): Gap junction protein connexin-43 interacts directly with microtubules. *Curr Biol* 11, 1364-1368
- Gillison ML (2007): Current topics in the epidemiology of oral cavity and oropharyngeal cancers. *Head Neck* 29, 779-792

- Gollob MH (2006): Cardiac connexins as candidate genes for idiopathic atrial fibrillation. *Curr Opin Cardiol* 21, 155-158
- Goodenough DA, Gilula NB (1974): The splitting of hepatocyte gap junctions and zonulae occludentes with hypertonic disaccharides. *J Cell Biol* 61, 575-590
- 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* 15, 185-193
- Gros DB, Jongsma HJ (1996): Connexins in mammalian heart function. *Bioessays* 18, 719-730
- Habermann H, Ray V, Habermann W, Prins GS (2002): Alterations in gap junction protein expression in human benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. *J Urol* 167, 655-660
- Han Y, Zhang PJ, Chen T, Yum SW, Pasha T, Furth EE (2011): Connexin43 Expression Increases in the Epithelium and Stroma along the Colonic Neoplastic Progression Pathway: Implications for Its Oncogenic Role. *Gastroenterol Res Pract* 2011, 561719
- Hinz B (2007): Formation and function of the myofibroblast during tissue repair. *J Invest Dermatol* 127, 526-537
- Hobbs CG, Sterne JA, Bailey M, Heyderman RS, Birchall MA, Thomas SJ (2006): Human papillomavirus and head and neck cancer: a systematic review and meta-analysis. *Clin Otolaryngol* 31, 259-266
- Homma N, Alvarado JL, Coombs W, Stergiopoulos K, Taffet SM, Lau AF, Delmar M (1998): A particle-receptor model for the insulin-induced closure of connexin43 channels. *Circ Res* 83, 27-32
- Iacobas DA, Urban-Maldonado M, Iacobas S, Scemes E, Spray DC (2003): Array analysis of gene expression in connexin-43 null astrocytes. *Physiol Genomics* 15, 177-190
- Iacobas DA, Scemes E, Spray DC (2004): Gene expression alterations in connexin null mice extend beyond the gap junction. *Neurochem Int* 45, 243-250
- 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* 234, 239-248
- Jacob A, Beyer EC (2001): Mouse connexin 45: genomic cloning and exon usage. *DNA Cell Biol* 20, 11-19
- Jamieson S, Going JJ, D'Arcy R, George WD (1998): Expression of gap junction proteins connexin 26 and connexin 43 in normal human breast and in breast tumours. *J Pathol* 184, 37-43
- Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D (2011): Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 61, 69-90
- Jiang JX, Goodenough DA (1998): Phosphorylation of lens-fiber connexins in lens organ cultures. *Eur J Biochem* 255, 37-44
- 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* 59, 429-433
- Karamouzis MV, Grandis JR, Argiris A (2007): Therapies directed against epidermal growth factor receptor in aerodigestive carcinomas. *JAMA* 298, 70-82

- King TJ, Fukushima LH, Donlon TA, Hieber AD, Shimabukuro KA, Bertram JS (2000): Correlation between growth control, neoplastic potential and endogenous connexin43 expression in HeLa cell lines: implications for tumor progression. *Carcinogenesis* 21, 311-315
- 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* 79, 347-354
- 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* 130, 987-995
- Kreimer AR, Clifford GM, Boyle P, Franceschi S (2005): Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14, 467-475
- Krutovskikh V, Yamasaki H (2000): Connexin gene mutations in human genetic diseases. *Mutat Res* 462, 197-207
- Kumar NM, Gilula NB (1996): The gap junction communication channel. *Cell* 84, 381-388
- Laird DW (1996): The life cycle of a connexin: gap junction formation, removal, and degradation. *J Bioenerg Biomembr* 28, 311-318
- Laird DW (2006): Life cycle of connexins in health and disease. *Biochem J* 394, 527-543
- Lampe PD, Lau AF (2000): Regulation of gap junctions by phosphorylation of connexins. *Arch Biochem Biophys* 384, 205-215
- Lampe PD, Kurata WE, Warn-Cramer BJ, Lau AF (1998): Formation of a distinct connexin43 phosphoisoform in mitotic cells is dependent upon p34cdc2 kinase. *J Cell Sci* 111 ( Pt 6), 833-841
- Lauf U, Giepmans BN, Lopez P, Braconnot S, Chen SC, Falk MM (2002): Dynamic trafficking and delivery of connexons to the plasma membrane and accretion to gap junctions in living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 10446-10451
- Lecanda F, Towler DA, Ziambaras K, Cheng SL, Koval M, Steinberg TH, Civitelli R (1998): Gap junctional communication modulates gene expression in osteoblastic cells. *Mol Biol Cell* 9, 2249-2258
- Lin JH, Takano T, Cotrina ML, Arcuino G, Kang J, Liu S, Gao Q, Jiang L, Li F, Lichtenberg-Frate H (2002): Connexin 43 enhances the adhesivity and mediates the invasion of malignant glioma cells. *J Neurosci* 22, 4302-4311
- Liu XZ, Yuan Y, Yan D, Ding EH, Ouyang XM, Fei Y, Tang W, Yuan H, Chang Q, Du LL (2009): Digenic inheritance of non-syndromic deafness caused by mutations at the gap junction proteins Cx26 and Cx31. *Hum Genet* 125, 53-62
- Loewenstein WR (1979): Junctional intercellular communication and the control of growth. *Biochim Biophys Acta* 560, 1-65
- Loewenstein WR, Penn RD (1967): Intercellular communication and tissue growth. II. Tissue regeneration. *J Cell Biol* 33, 235-242
- Lucke T, Choudhry R, Thom R, Selmer IS, Burden AD, Hodgins MB (1999): Upregulation of connexin 26 is a feature of keratinocyte differentiation in hyper-

- proliferative epidermis, vaginal epithelium, and buccal epithelium. *J Invest Dermatol* **112**, 354-361
- Maeda S, Nakagawa S, Suga M, Yamashita E, Oshima A, Fujiyoshi Y, Tsukihara T (2009): Structure of the connexin 26 gap junction channel at 3.5 Å resolution. *Nature* **458**, 597-602
- Majno G, Gabbiani G, Hirschel BJ, Ryan GB, Statkov PR (1971): Contraction of granulation tissue in vitro: similarity to smooth muscle. *Science* **173**, 548-550
- Martin PE, Blundell G, Ahmad S, Errington RJ, Evans WH (2001): Multiple pathways in the trafficking and assembly of connexin 26, 32 and 43 into gap junction intercellular communication channels. *J Cell Sci* **114**, 3845-3855
- Martin PE, Evans WH (2004): Incorporation of connexins into plasma membranes and gap junctions. *Cardiovasc Res* **62**, 378-387
- Martinez AD, Hayrapetyan V, Moreno AP, Beyer EC (2002): Connexin43 and connexin45 form heteromeric gap junction channels in which individual components determine permeability and regulation. *Circ Res* **90**, 1100-1107
- Marur S, D'Souza G, Westra WH, Forastiere AA (2010): HPV-associated head and neck cancer: a virus-related cancer epidemic. *Lancet Oncol* **11**, 781-789
- 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* **66**, 9886-9894
- Mesnil M, Krutovskikh V, Piccoli C, Elfgang C, Traub O, Willecke K, Yamasaki H (1995): Negative growth control of HeLa cells by connexin genes: connexin species specificity. *Cancer Res* **55**, 629-639
- Meyer RA, Laird DW, Revel JP, Johnson RG (1992): Inhibition of gap junction and adherens junction assembly by connexin and A-CAM antibodies. *J Cell Biol* **119**, 179-189
- Miragoli M, Gaudesius G, Rohr S (2006): Electrotonic modulation of cardiac impulse conduction by myofibroblasts. *Circ Res* **98**, 801-810
- Murray SA, Williams SY, Dillard CY, Narayanan SK, McCauley J (1997): Relationship of cytoskeletal filaments to annular gap junction expression in human adrenal cortical tumor cells in culture. *Exp Cell Res* **234**, 398-404
- Musil LS, Cunningham BA, Edelman GM, Goodenough DA (1990): Differential phosphorylation of the gap junction protein connexin43 in junctional communication-competent and -deficient cell lines. *J Cell Biol* **111**, 2077-2088
- Musil LS, Le AC, VanSlyke JK, Roberts LM (2000): Regulation of connexin degradation as a mechanism to increase gap junction assembly and function. *J Biol Chem* **275**, 25207-25215
- Nicolson GL, Dulski KM, Trosko JE (1988): Loss of intercellular junctional communication correlates with metastatic potential in mammary adenocarcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 473-476
- Ogawa K, Pitchakarn P, Suzuki S, Chewonarin T, Tang M, Takahashi S, Naiki-Ito A, Sato S, Takahashi S, Asamoto M (2012): Silencing of connexin 43 suppresses invasion, migration and lung metastasis of rat hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Sci* **103**, 860-867
- 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* 27, 2189-2195
- Patel SG, Shah JP (2005): TNM staging of cancers of the head and neck: striving for uniformity among diversity. *CA Cancer J Clin* 55, 242-258; quiz 261-242, 264
- Paznekas WA, Boyadjiev SA, Shapiro RE, Daniels O, Wollnik B, Keegan CE, Innis JW, Dinulos MB, Christian C, Hannibal MC (2003): Connexin 43 (GJA1) mutations cause the pleiotropic phenotype of oculodentodigital dysplasia. *Am J Hum Genet* 72, 408-418
- Pfeifer I, Anderson C, Werner R, Oltra E (2004): Redefining the structure of the mouse connexin43 gene: selective promoter usage and alternative splicing mechanisms yield transcripts with different translational efficiencies. *Nucleic Acids Res* 32, 4550-4562
- Powell DW, Adegboyega PA, Di Mari JF, Mifflin RC (2005): Epithelial cells and their neighbors I. Role of intestinal myofibroblasts in development, repair, and cancer. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 289, G2-7
- Proia NK, Paszkiewicz GM, Nasca MA, Franke GE, Pauly JL (2006): Smoking and smokeless tobacco-associated human buccal cell mutations and their association with oral cancer--a review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 15, 1061-1077
- Puranam KL, Laird DW, Revel JP (1993): Trapping an intermediate form of connexin43 in the Golgi. *Exp Cell Res* 206, 85-92
- 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* 10, 387-393
- Rose B, Loewenstein WR (1975): Permeability of cell junction depends on local cytoplasmic calcium activity. *Nature* 254, 250-252
- Saez JC, Berthoud VM, Branes MC, Martinez AD, Beyer EC (2003): Plasma membrane channels formed by connexins: their regulation and functions. *Physiol Rev* 83, 1359-1400
- 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* 110, 1162-1172
- Salameh A (2006): Life cycle of connexins: regulation of connexin synthesis and degradation. *Adv Cardiol* 42, 57-70
- Sawey MJ, Goldschmidt MH, Risek B, Gilula NB, Lo CW (1996): Perturbation in connexin 43 and connexin 26 gap-junction expression in mouse skin hyperplasia and neoplasia. *Mol Carcinog* 17, 49-61
- Segretain D, Falk MM (2004a): Regulation of connexin biosynthesis, assembly, gap junction formation, and removal. *Biochim Biophys Acta* 1662, 3-21
- Segretain D, Fiorini C, Decrouy X, Defamie N, Prat JR, Pointis G (2004b): A proposed role for ZO-1 in targeting connexin 43 gap junctions to the endocytic pathway. *Biochimie* 86, 241-244
- Severs NJ, Shovel KS, Slade AM, Powell T, Twist VW, Green CR (1989): Fate of gap junctions in isolated adult mammalian cardiomyocytes. *Circ Res* 65, 22-42

- Shangina O, Brennan P, Szeszenia-Dabrowska N, Mates D, Fabianova E, Fletcher T, t'Mannetje A, Boffetta P, Zaridze D (2006): Occupational exposure and laryngeal and hypopharyngeal cancer risk in central and eastern Europe. *Am J Epidemiol* **164**, 367-375
- Shiboski CH, Schmidt BL, Jordan RC (2005): Tongue and tonsil carcinoma: increasing trends in the U.S. population ages 20-44 years. *Cancer* **103**, 1843-1849
- Sohl G, Willecke K (2004): Gap junctions and the connexin protein family. *Cardiovasc Res* **62**, 228-232
- Sonntag S, Sohl G, Dobrowolski R, Zhang J, Theis M, Winterhager E, Bukauskas FF, Willecke K (2009): Mouse lens connexin23 (Gj1) does not form functional gap junction channels but causes enhanced ATP release from HeLa cells. *Eur J Cell Biol* **88**, 65-77
- Su V, Cochrane K, Lau AF (2012): Degradation of connexins through the proteasomal, endolysosomal and phagolysosomal pathways. *J Membr Biol* **245**, 389-400
- Suarez C, Rodrigo JP, Ferlito A, Cabanillas R, Shaha AR, Rinaldo A (2006): Tumours of familial origin in the head and neck. *Oral Oncol* **42**, 965-978
- Tabernero A, Sanchez-Alvarez R, Medina JM (2006): Increased levels of cyclins D1 and D3 after inhibition of gap junctional communication in astrocytes. *J Neurochem* **96**, 973-982
- Tada J, Hashimoto K (1997): Ultrastructural localization of gap junction protein connexin 43 in normal human skin, basal cell carcinoma, and squamous cell carcinoma. *J Cutan Pathol* **24**, 628-635
- Teunissen BE, Bierhuizen MF (2004): Transcriptional control of myocardial connexins. *Cardiovasc Res* **62**, 246-255
- Thomas T, Jordan K, Simek J, Shao Q, Jedeszko C, Walton P, Laird DW (2005): Mechanisms of Cx43 and Cx26 transport to the plasma membrane and gap junction regeneration. *J Cell Sci* **118**, 4451-4462
- Trosko JE, Chang CC, Upham BL, Tai MH (2004): Ignored hallmarks of carcinogenesis: stem cells and cell-cell communication. *Ann N Y Acad Sci* **1028**, 192-201
- Tu ZJ, Kiang DT (1998): Mapping and characterization of the basal promoter of the human connexin26 gene. *Biochim Biophys Acta* **1443**, 169-181
- Tuyns AJ, Esteve J, Raymond L, Berrino F, Benhamou E, Blanchet F, Boffetta P, Crosignani P, del Moral A, Lehmann W (1988): Cancer of the larynx/hypopharynx, tobacco and alcohol: IARC international case-control study in Turin and Varese (Italy), Zaragoza and Navarra (Spain), Geneva (Switzerland) and Calvados (France). *Int J Cancer* **41**, 483-491
- Udaka N, Miyagi Y, Ito T (2007): Connexin expression in mouse lung tumor. *Cancer Lett* **246**, 224-229
- Unwin PN (1987): Gap junction structure and the control of cell-to-cell communication. *Ciba Found Symp* **125**, 78-91
- VanSlyke JK, Musil LS (2002): Dislocation and degradation from the ER are regulated by cytosolic stress. *J Cell Biol* **157**, 381-394
- 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* **80**, 673-681

- 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* **110**, 374-381
- Vineis P, Alavanja M, Buffler P, Fontham E, Franceschi S, Gao YT, Gupta PC, Hackshaw A, Matos E, Samet J (2004): Tobacco and cancer: recent epidemiological evidence. *J Natl Cancer Inst* **96**, 99-106
- Voynov G, Heron DE, Burton S, Grandis J, Quinn A, Ferris R, Ozhasoglu C, Vogel W, Johnson J (2006): Frameless stereotactic radiosurgery for recurrent head and neck carcinoma. *Technol Cancer Res Treat* **5**, 529-535
- Wang B, Wen Q, Xie X, Liu S, Liu M, Tao Y, Li Z, Suo P, Shen A, Wang J (2010): Mutation analysis of Connexin43 gene in Chinese patients with congenital heart defects. *Int J Cardiol* **145**, 487-489
- Warnakulasuriya S (2002): Areca nut use following migration and its consequences. *Addict Biol* **7**, 127-132
- 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* **383**, 725-737
- Wittekind C, Bootz F, Meyer HJ: *TNM-Klassifikation maligner Tumoren. 7*; Wiley-Blackwell, Weinheim 2010
- Xia X, Batra N, Shi Q, Bonewald LF, Sprague E, Jiang JX (2010): Prostaglandin promotion of osteocyte gap junction function through transcriptional regulation of connexin 43 by glycogen synthase kinase 3/beta-catenin signaling. *Mol Cell Biol* **30**, 206-219
- Yamada KA, Rogers JG, Sundset R, Steinberg TH, Saffitz J (2003): Up-regulation of connexin45 in heart failure. *J Cardiovasc Electrophysiol* **14**, 1205-1212
- Yano T, Hernandez-Blazquez FJ, Omori Y, Yamasaki H (2001): Reduction of malignant phenotype of HEPG2 cell is associated with the expression of connexin 26 but not connexin 32. *Carcinogenesis* **22**, 1593-1600
- Yeager M, Nicholson BJ (1996): Structure of gap junction intercellular channels. *Curr Opin Struct Biol* **6**, 183-192
- 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* **20**, 4138-4149
- 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* **25**, 473-482

## 8 Anhang

### 8.1 Immunreaktiver Score

P	Tod	Überl	T_Kern	T_Mem	T_Zyto	E_Kern	E_Mem	E_Zto	L_Kern	L_Mem	L_Zto
1	0	5,86	0	3	3	0	0	0			
2	0	2,32	0	0	0	0	0	0			
3	0	4,98	0	0	1	0	0	0			
4	0	4,64	0	0	10	0	0	0			
5	1	1,01	0	0	5	0	0	0	0	45	45
6	0	6,12	0	0	10	0	0	0			
7	0	4,79	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	0	4,22	0	0	0	0	0	0	0	40	10
9	0	4,20	0	0	0	0	0	0			
10	0	5,72	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11	1	0,10	0	0	0	0	0	0	0	0	5
12	1	1,44	0	0	1	0	0	0			
13	1	1,62	0	0	0	0	0	0			
14	0	5,73	0	0	0	0	0	0			
15	1	0,97	0	0	0	0	0	0	0	1	1
16	1	0,06	0	0	10	0	0	0	0	1	5
17	1	0,70	0	0	5	0	0	0	0	1	5
18	1	1,75	0	0	1	0	0	0	0	0	1
19	1	0,64	0	1	1	0	0	0	0	0	1
20	1	1,93	0	2	2	0	0	0	0	0	0
21	0	7,02	0	1	40	0	0	0	0	5	10
22	0	14,68	0	0	0	0	0	0	0	0	0
23	0	8,94	0	1	1	0	0	0	0	0	80
24	1	1,56	0	1	1	0	0	0	0	1	10
25	1	2,13	0	20	20	0	0	0	0	0	5
26	1	3,56	0	5	5	0	0	0			
27	1	4,94	0	0	0	0	0	0			
28	1	1,19	0	0	5	0	0	0			
29	0	4,12	0	0	0	0	0	0			
30	0	4,43	0	0	0	0	0	0			
31	1	5,15	0	0	0	0	0	0			
32	1	2,38	0	0	0	0	0	0			
33	1	1,51	0	0	5	0	0	0			
34	0	5,58	0	0	0	0	0	0			
35	0	6,56	0	0	20	0	0	0			

**Tab. 4:** Immunreaktiver Score der Cx26-Expression

P	Tod	Überl	T_Kern	T_Mem	T_Zyto	E_Kern	E_Mem	E_Zto	L_Kern	L_Mem	L_Zto
1	0	5,86	0	30	120	0	110	20			
2	0	2,32	0	20	180	0	10	40			
3	0	4,98	0	0	120	0	20	40			
4	0	4,64	0	10	180	0	10	50			
5	1	1,01	0	90	180	0	100	50	0	5	10
6	0	6,12	0	10	10	0	30	10			
7	0	4,79	0	100	90	0	80	70	0	160	80
8	0	4,22	0	50	160	0	100	50	0	65	20
9	0	4,20	0	50	110	0	50	50			
10	0	5,72	0	20	160	0	40	30	0	0	70
11	1	0,10	0	0	160	0	60	50	0	10	25
12	1	1,44	0	40	180	0	120	50			
13	1	1,62	0	50	140	0	90	120			
14	0	5,73	0	10	140	0	40	90			
15	1	0,97	0	50	130	0	50	40	0	10	50
16	1	0,06	0	180	190	0	60	10	0	25	170
17	1	0,70	0	60	80	0	65	60	0	80	80
18	1	1,75	0	35	75	0	40	30	0	25	95
19	1	0,64	0	30	105	0	120	60	0	10	115
20	1	1,93	0	15	90	0	70	90	0	10	120
21	0	7,02	0	40	140	0	20	40	0	55	100
22	0	14,68	0	5	10	0	0	10	0	45	30
23	0	8,94	0	20	115	0	30	30	0	10	5
24	1	1,56	0	45	130	0	0	20	0	10	95
25	1	2,13	0	80	80	0	70	90	0	70	80
26	1	3,56	0	60	80	0	0	10			
27	1	4,94	0	10	30	0	20	10			
28	1	1,19	0	10	10	0	0	0			
29	0	4,12	0	0	5	0	40	10			
30	0	4,43	0	2	5	0	0	5			
31	1	5,15	0	2	50	0	30	100			
32	1	2,38	0	5	30	0	5	5			
33	1	1,51	0	5	10	0	30	10			
34	0	5,58	0	35	30	0	15	20			
35	0	6,56	0	5	5	0	0	0			

**Tab. 5:** Immunreaktiver Score der Cx43-Expression

P	Tod	Überl	T_Kern	T_Mem	T_Zyto	E_Kern	E_Mem	E_Zto	L_Kern	L_Mem	L_Zto
1	0	5,86	0	0	190	0	0	180			
2	0	2,32	0	40	250	0	0	140			
3	0	4,98	0	0	170	0	0	120			
4	0	4,64	0	0	240	0	0	256			
5	1	1,01	0	0	210	0	0	160	0	0	160
6	0	6,12	0	0	280	0	0	140			
7	0	4,79	0	0	290	0	0	170	0	30	220
8	0	4,22	10	0	290	0	0	170	0	0	130
9	0	4,20	0	0	150	0	0	110			
10	0	5,72	10	0	140	0	0	150	0	0	80
11	1	0,10	10	0	260	0	0	45	0	0	190
12	1	1,44	0	0	90	0	0	180			
13	1	1,62	0	0	160	0	0	140			
14	0	5,73	0	0	190	0	0	120			
15	1	0,97	0	10	180	0	0	180	0	0	230
16	1	0,06	0	0	210	0	0	105	0	0	230
17	1	0,70	0	0	115	0	0	260	0	0	140
18	1	1,75	0	0	210	0	0	200	0	0	147
19	1	0,64	0	0	195	0	0	125	0	0	240
20	1	1,93	0	0	160	0	0	240	0	0	220
21	0	7,02	0	0	155	0	0	185	0	0	185
22	0	14,68	0	0	175	0	0	200	0	0	180
23	0	8,94	0	0	200	0	0	200	0	0	170
24	1	1,56	0	0	160	0	3	200	0	0	125
25	1	2,13	0	0	160	0	0	180	0	5	210
26	1	3,56	0	0	230	0	0	160			
27	1	4,94	0	0	160	0	0	185			
28	1	1,19	0	0	105	0	0	125			
29	0	4,12	0	0	40	0	0	175			
30	0	4,43	0	0	195	0	0	185			
31	1	5,15	0	0	110	0	0	185			
32	1	2,38	0	0	125	0	0	190			
33	1	1,51	0	0	165	0	0	100			
34	0	5,58	0	0	120	0	0	115			
35	0	6,56	0	0	240	0	0	185			

**Tab. 6:** Immunreaktiver Score der Cx45-Expression

## 8.2 Statistische Daten

Parameter	Verteilung
Geschlecht: männlich Geschlecht: weiblich	23 (66%) 12 (34%)
Alter bei Erstdiagnose (Jahre)	56,5 +/- 11,1 58,0 (31,0; 79,0)
Nachbeobachtungszeit (Monate)	45,4 +/- 35,4 49,5 (0,7; 176,1)
Nikotinabusus: nein Nikotinabusus: ja	7 (20%) 28 (80%)
Alkoholabusus: nein Alkoholabusus: ja Keine Angabe	14 (42%) 19 (58%) 2
limitierender Allgemeinzustand: nein limitierender Allgemeinzustand: ja	20 (57%) 15 (43%)
Tis T1 T2 T3 T4	1 (3%) 5 (14%) 9 (26%) 2 (6%) 18 (51%)
N0 N1 N2	19 (54%) 8 (23%) 8 (23%)
Stage 0 Stage 1 Stage 2 Stage 3 Stage 4	1 (3%) 5 (14%) 6 (17%) 4 (11%) 19 (54%)
R0 R1 R2	35 (100%) 0 (0%) 0 (0%)
G1 G2 G3	4 (11%) 29 (83%) 2 (6%)
Lokalrezidiv: keins Lokalrezidiv > 0	24 (69%) 11 (31%)
Radiatio: nein Radiatio: ja	20 (57%) 15 (43%)

Dauer bis Radiatio (Monate)	13,0 +/- 27,2 2,0 (0,0; 99,0)
Chemotherapie: nein Chemotherapie: ja	26 (74%) 9 (26%)
Dauer bis Chemotherapie (Monate)	4,3 +/- 4,9 2,5 (0,0; 15,0)
Seite der Tumorlokalisierung: links Seite der Tumorlokalisierung: rechts Seite der Tumorlokalisierung: median Keine Angabe	10 (29%) 15 (44%) 9 (26%) 1
Lokalisation (ICD-10): 1 Lokalisation (ICD-10): 2,1 Lokalisation (ICD-10): 4 Lokalisation (ICD-10): 4,1 Lokalisation (ICD-10): 4,8 Lokalisation (ICD-10): 5,1 Lokalisation (ICD-10): 5,8 Lokalisation (ICD-10): 10,8 Lokalisation (ICD-10): 31 Lokalisation (ICD-10): 41,1	1 (3%) 9 (26%) 8 (24%) 6 (18%) 2 (6%) 1 (3%) 2 (6%) 1 (3%) 1 (3%) 1 (3%) 3 (9%)
Neck Dissection links: keine Neck Dissection links: submandubulär Neck Dissection links: konservierend Neck Dissection links: funktionell Neck Dissection links: radikal Keine Angabe	14 (42%) 8 (24%) 4 (12%) 4 (12%) 3 (9%) 2
Neck Dissection rechts: keine Neck Dissection rechts: submandubulär Neck Dissection rechts: konservierend Neck Dissection rechts: funktionell Neck Dissection rechts: radikal Keine Angabe	8 (24%) 13 (38%) 7 (21%) 3 (9%) 3 (9%) 1
Rekonstruktion: lokal Rekonstruktion: Radialis-Lappen Rekonstruktion: Fibula-Lappen Rekonstruktion: Pectoralis-Lappen Rekonstruktion: Lat. dorsi-Lappen Rekonstruktion: sonstige Keine Angabe	12 (36%) 14 (42%) 2 (6%) 1 (3%) 1 (3%) 3 (9%) 2

**Tab. 7:** Verteilung der Patientencharakteristika. Angegeben sind entweder der Mittelwert +/- Standardabweichung, der Median (Minimum; Maximum) oder absolute (relative) Häufigkeiten



Parameter	Hazard Ratio	95%-Konfidenzintervall	P (paarweiser Vergleich)	P
Geschlecht: weiblich	1,2	[0,4; 3,1]		0,75
Alter bei Erstdiagnose (Jahre)	1,00	[0,95; 1,05]		0,90
Nikotinabusus: ja	2,3	[0,5; 10,2]		0,26
Alkoholabusus: ja	0,7	[0,3; 1,9]		0,51
limit. Allgemeinzustand: ja	0,9	[0,4; 2,4]		0,86
T				
- T2 versus T1	0,3	[0,0; 3,0]	0,28	<0,01
- T4 versus T1	3,9	[0,9; 17,5]	0,08	
N				
- N1 versus N0	1,4	[0,4; 4,7]	0,58	0,12
- N2 versus N0	3,3	[1,1; 9,6]	0,03	
Stage				
- Stage 2 versus 1	0,4	[0,0; 4,8]	0,50	0,03
- Stage 3 versus 1	0,7	[0,1; 8,0]	0,79	
- Stage 4 versus 1	3,3	[0,7; 14,7]	0,12	
Radiatio: ja	2,0	[0,8; 5,0]		0,15
Dauer bis Radiatio (Monate)	0,96	[0,88; 1,04]		0,34
Chemotherapie: ja	2,3	[0,8; 6,1]		0,11
Dauer bis Chemothera. (Monate)	1,03	[0,85; 1,23]		0,79
Seite der Tumorlokalisierung				
- rechts versus links	1,1	[0,3; 4,6]	0,84	0,02
- median versus links	4,6	[1,2; 17,7]	0,03	
- median versus rechts	4,5	[1,5; 14,1]	<0,01	
Neck Dissection links - submandibulär versus keine	0,9	[0,3; 3,4]		0,93
Neck Dissection rechts - submandibulär versus keine - konservierend versus keine	2,2 2,9	[0,5; 10,8] [0,5; 15,6]	0,32 0,23	0,42
Rekonstruktion - Radialis-Lappen versus lokal	3,4	[0,9; 13,0]		0,07

**Tab. 8:** Einflüsse allgemeiner Patientenparameter auf das Gesamtüberleben

Paramter	HR	HR.lower	HR.upper	P
Cx26_Tumor_Kern	1,00	1,00	1,00	NA
Cx26_Epithel_Kern	1,00	1,00	1,00	NA
Cx26_Lymphknoten_Kern	1,00	1,00	1,00	NA
Cx43_Tumor_Kern	1,00	1,00	1,00	NA
Cx43_Epithel_Kern	1,00	1,00	1,00	NA
Cx43_Lymphknoten_Kern	1,00	1,00	1,00	NA
Cx45_Tumor_Kern	0,96	0,79	1,18	0.6986
Cx45_Epithel_Kern	1,00	1,00	1,00	NA
Cx45_Lymphknoten_Kern	1,00	1,00	1,00	NA
Cx26_Tumor_Membran	1,04	0,94	1,15	0.4648
Cx26_Epithel_Membran	1,00	1,00	1,00	NA
Cx26_Lymphknoten_Membran	0,99	0,94	1,04	0.7483
Cx43_Tumor_Membran	1,02	1,00	1,03	0,0088
Cx43_Epithel_Membran	1,01	1,00	1,02	0,0596
Cx43_Lymphknoten_Membran	0,99	0,97	1,01	0.1984
Cx45_Tumor_Membran	0,98	0,88	1,09	0.6877
Cx45_Epithel_Membran	1,48	0,74	2,95	0.2637
Cx45_Lymphknoten_Membran	0,91	0,71	1,16	0.4298
Cx26_Tumor_Zytosol	0,98	0,92	1,04	0.5562
Cx26_Epithel_Zytosol	1,00	1,00	1,00	NA
Cx26_Lymphknoten_Zytosol	0,99	0,95	1,03	0.5186
Cx43_Tumor_Zytosol	1,00	1,00	1,01	0.4277
Cx43_Epithel_Zytosol	1,01	0,99	1,02	0.3379
Cx43_Lymphknoten_Zytosol	1,02	1,00	1,03	0.1195
Cx45_Tumor_Zytosol	1,00	0,99	1,00	0.2803
Cx45_Epithel_Zytosol	1,00	0,98	1,01	0.6068
Cx45_Lymphknoten_Zytosol	1,01	0,99	1,03	0.2083

**Tab. 9:** Einflüsse der Connexin-Expression auf das Gesamtüberleben. HR.lower und HR.upper markieren die Grenzen eines 95%-Konfidenzintervalls

Parameter	Cx43_T_Mem	P	Cx43_E_Mem	P
Tis	20,0 (20,0; 20,0)		10,0 (10,0; 10,0)	
T1	10,0 (0,0; 60,0)	0,06	15,0 (0,0; 40,0)	<0,01
T2	10,0 (0,0; 40,0)		30,0 (0,0; 110,0)	
T3	6,0 (2,0; 10,0)		0,0 (0,0; 0,0)	
T4	47,5 (0,0; 180,0)		62,5 (0,0; 120,0)	
Stage 0	20,0 (20,0; 20,0)		10,0 (10,0; 10,0)	
Stage 1	10,0 (0,0; 60,0)	0,07	15,0 (0,0; 40,0)	<0,01
Stage 2	10,0 (0,0; 30,0)		30,0 (10,0; 110,0)	
Stage 3	7,5 (2,0; 40,0)		0,0 (0,0; 20,0)	
Stage 4	45,0 (0,0; 180,0)		60,0 (0,0; 120,0)	
Seite der Tumorlokalisierung: links	25,0 (0,0; 180,0)		0,79	
Seite der Tumorlokalisierung: rechts	15,0 (2,0; 100,0)	30,0 (0,0; 110,0)		
Seite der Tumorlokalisierung: median	35,0 (0,0; 90,0)	40,0 (0,0; 120,0)		

**Tab. 10:** Korrelation zwischen der Cx43-Expression in der Tumorzellmembran (Cx43\_T\_Mem) und der Zellmembran im normalen Epithel (Cx43\_N\_Mem) zu Parametern, die ebenfalls mit dem Gesamtüberleben korreliert sind

Connexin	Effekt	P
Cx26	Gewebe	<0,01
	Zelllokalisierung	<0,01
	Interaktion (Gewebe x Zelllokalisierung)	<0,01
Cx43	Gewebe	<0,01
	Zelllokalisierung	<0,01
	Interaktion (Gewebe x Zelllokalisierung)	<0,01
Cx45	Gewebe	<0,01
	Zelllokalisierung	<0,01
	Interaktion (Gewebe x Zelllokalisierung)	<0,01

**Tab. 11:** Einfluss des Gewebetyps, der Zelllokalisierung und deren Wechselwirkung auf die Connexin-Expression

Connexin	Zelllokalisierung	Gewebevergleich	P
Cx26	Zellmembran	Lymphknoten versus Epithel	<0,01
		Lymphknoten versus Tumor	<0,01
		Epithel versus Tumor	<0,01
	Zellkern	Lymphknoten versus Epithel	<0,01
		Lymphknoten versus Tumor	<0,01
		Epithel versus Tumor	k.A.
	Zytoplasma	Lymphknoten versus Epithel	<0,01
		Lymphknoten versus Tumor	<0,01
		Epithel versus Tumor	<0,01

Cx43	Zellmembran	Lymphknoten versus Epithel	<0,01
		Lymphknoten versus Tumor	<0,01
		Epithel versus Tumor	0,24
	Zellkern	Lymphknoten versus Epithel	<0,01
		Lymphknoten versus Tumor	<0,01
		Epithel versus Tumor	k.A.
	Zytoplasma	Lymphknoten versus Epithel	<0,01
		Lymphknoten versus Tumor	<0,01
		Epithel versus Tumor	<0,01
Cx45	Zellmembran	Lymphknoten versus Epithel	<0,01
		Lymphknoten versus Tumor	<0,01
		Epithel versus Tumor	0,53
	Zellkern	Lymphknoten versus Epithel	<0,01
		Lymphknoten versus Tumor	<0,01
		Epithel versus Tumor	0,07
	Zytoplasma	Lymphknoten versus Epithel	<0,01
		Lymphknoten versus Tumor	<0,01
		Epithel versus Tumor	0,26

**Tab. 12:** Paarvergleich der Connexin-Expression zwischen den einzelnen Gewebetypen, getrennt nach Zelllokalisation

Connexin	Gewebetyp	Vergleich_Zelllokalisation	P
Cx26	Lymphknoten	Zellmembran versus Zellkern	0,13
		Zellmembran versus Zytoplasma	<0,01
		Zellkern versus Zytoplasma	<0,01
	Epithel	Zellmembran versus Zellkern	k.A.
		Zellmembran versus Zytoplasma	k.A.
		Zellkern versus Zytoplasma	k.A.
	Tumor	Zellmembran versus Zellkern	<0,01
		Zellmembran versus Zytoplasma	<0,01
		Zellkern versus Zytoplasma	<0,01
Cx43	Lymphknoten	Zellmembran versus Zellkern	0,47
		Zellmembran versus Zytoplasma	<0,01
		Zellkern versus Zytoplasma	<0,01
	Epithel	Zellmembran versus Zellkern	<0,01
		Zellmembran versus Zytoplasma	0,80
		Zellkern versus Zytoplasma	<0,01
	Tumor	Zellmembran versus Zellkern	<0,01
		Zellmembran versus Zytoplasma	<0,01
		Zellkern versus Zytoplasma	<0,01

Cx45	Lymphknoten	Zellmembran versus Zellkern	0,04
		Zellmembran versus Zytoplasma	<0,01
		Zellkern versus Zytoplasma	<0,01
	Epithel	Zellmembran versus Zellkern	0,31
		Zellmembran versus Zytoplasma	<0,01
		Zellkern versus Zytoplasma	<0,01
	Tumor	Zellmembran versus Zellkern	0,67
		Zellmembran versus Zytoplasma	<0,01
		Zellkern versus Zytoplasma	<0,01

**Tab. 13:** Paarvergleich der Connexin-Expression zwischen den einzelnen Zelllokalisationen, getrennt nach Gewebetyp

## Danksagung

An dieser Stelle bedanke ich mich besonders bei Herrn PD Dr. med. Bernhard Hemmerlein für die Vergabe des Themas, die herausragende Betreuung und die Gesprächsbereitschaft in jeglicher Situation, wodurch mir die Abhandlung dieser Dissertation sehr viel Freude und wissenschaftliche Erkenntnis bereitet hat. Herrn Prof. Dr. Heinz-Joachim Radzun danke ich für die Erlaubnis, die Einrichtungen und Geräte des Pathologischen Instituts für die Untersuchungen nutzen zu dürfen. Frau Dr. med. Christina Perske danke ich für die sehr gute Zusammenarbeit und die umfangreiche Unterstützung bei der histologischen Auswertung. Aus der Abteilung Medizinische Statistik der Universität Göttingen danke ich Herrn PD Dr. Klaus Jung für die statistischen Berechnungen der Messergebnisse sowie die umfassende Betreuung. Ganz besonders danke ich den MTAs des Immunhistologiela-bors, Frau Martin-Ortega und Frau Neumann, für die Unterstützung bei der Durchführung der immunhistochemischen Färbungen.