

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

Charakterisierung von Connexin 43 im oralen Plattenepithelkarzinom

INAUGURAL-DISSERTATION

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

vorgelegt von

Denise Alexandra Sievers

aus

Talcahuano/Chile

Göttingen 2020

Dekan: Prof. Dr. med. W. Brück

Betreuungsausschuss

Betreuer/in: Prof. Dr. med. Dr. med. dent. H. Schliephake

Ko-Betreuer/in: PD Dr. med. J. Becker

Prüfungskommission

Referent/in: Prof. Dr. med. Dr. med. dent. H. Schliephake

Ko-Referent/in: PD Dr. med. J. Becker

Drittreferent/in: PD Dr. med. Felix Bremmer

Datum der mündlichen Prüfung: 27.08.2020

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Charakterisierung von Connexin 43 im oralen Plattenepithelkarzinom" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den

(Unterschrift)

Die Daten, auf denen die vorliegende Arbeit basiert, wurden teilweise publiziert:

Sievers D, Bunzendahl J, Frosch A, Perske C, Hemmerlein B, Schliephake H und Brockmeyer P (2017): Generation of highly differentiated BHY oral squamous cell carcinoma multicellular spheroids. *Mol Clin Oncol* 8, 323-325

Sievers D, Pantakani M, Bunzendahl J, Hemmerlein B, Schliephake H, Brockmeyer P: *Characterization of Connexin 43 in oral squamous cell carcinoma*. Vortrag im Rahmen des *24th Congress of the European Association for Cranio Maxillo Facial Surgery*, München, 17.09.-21.09.2018

Inhaltsverzeichnis**Abkürzungsverzeichnis III**

1	Einleitung.....	1
1.1	Allgemeine Aspekte des oralen Plattenepithelkarzinoms.....	1
1.1.1	Epidemiologie.....	1
1.1.2	Risikofaktoren und Ätiologie.....	1
1.2	Tumorprogression.....	2
1.2.1	Staging und histopathologisches Grading.....	2
1.2.2	Therapeutische Ansätze.....	3
1.3	Connexine und Gap-Junctional-Intercellular-Communication (GJIC).....	4
1.3.1	Struktur und Funktion von Connexinen.....	4
1.3.2	Lebenszyklus der Connexine.....	5
1.3.3	Connexin 43 und Gap-Junctional-Intercellular-Communication (GJIC).....	8
1.3.4	Connexin 43 und GJIC während der Tumorgenese und -progression.....	9
1.4	Zielsetzung.....	11
2	Material und Methoden.....	12
2.1	Labormaterialien.....	12
2.1.1	Technische Geräte.....	12
2.1.2	Software.....	13
2.1.3	Lösungen, Reagenzien und anderes Zubehör.....	14
2.1.4	Weiteres Zubehör.....	16
2.1.5	Zelllinien des oralen Plattenepithelkarzinoms.....	16
2.2	Methoden.....	16
2.2.1	Zelllinien und Zellkultur.....	16
2.2.2	Herstellung der multizellulären Tumorsphäroide.....	17
2.2.3	Charakterisierung der Connexin-43-Expression.....	18
3	Ergebnisse.....	26
3.1	Tumorverdopplungsraten und Ki-67-Färbung in der Monolayer-Zellkultur.....	26
3.2	Wachstum der multizellulären Tumorsphäroide.....	27
3.2.1	BHY.....	27
3.2.2	HN.....	28
3.2.3	CAL-27.....	29
3.3	Immunfluoreszenz.....	30
3.3.1	Connexin-43-Expression in der Monolayer-Zellkultur.....	30
3.3.2	Connexin-43-Expression in den multizellulären Tumorsphäroiden.....	32
3.4	Western-Blot.....	34
3.5	Real-Time-PCR.....	35
3.5.1	Connexin-43-Expression in der Monolayer-Zellkultur.....	35

3.5.2	Connexin-43-Expression in den multizellulären Tumorsphäroiden	37
4	Diskussion	39
5	Zusammenfassung	46
6	Literaturverzeichnis	47

Abkürzungsverzeichnis

AJCC	American Joint Committee on Cancer
BCA	<i>Bicinchoninic acid assay</i>
CGN	Cis-Golgi-Netzwerk
CK1	Casein-Kinase-1
CT	Computertomographie
Cx43	Connexin 43
DAPI	<i>4', 6-diamidino-2-phenylindole</i>
dH ₂ O	<i>Distilled water</i>
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i>
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraazetat
EGFr	Epidermale Wachstumsfaktorrezeptor
EMT	Epithelial-Mesenchymal-Transition
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERGIC	Endoplasmatischen-Retikulum-Golgi-Interkompartiment
FKS	Fötale Kälberserum
<i>for</i>	<i>Forward</i>
GAPH	<i>Glyceraldehyde 3-phosphatase dehydrogenase</i>
GJA1	Gap-Junction-Protein-Alpha-1
GJ	<i>Gap Junction</i>
GJIC	<i>Gap Junctional Intercellular Communication</i>
HBV	Hepatitis-B-Virus
HCV	Hepatitis-C-Virus
HPV	Humanes Papillomvirus

LDS	<i>Lithium dodecyl sulfate</i>
MRT	Magnetresonanztomographie
NCBI	National Center for Biotechnology
OSCC	<i>Oral squamous cell carcinoma</i>
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PFA	<i>Paraformaldehyde</i>
<i>rev</i>	<i>Reverse</i>
RIPA	<i>Radioimmunoprecipitation assay buffer</i>
SD	<i>Standard deviation</i>
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
SNB	Sentinel-Lymphknoten-Biopsie
TBST	<i>Tris-Buffered Saline with Tween®</i>
TGN	Trans-Golgi-Netzwerk
TLM	Transorale Laser-Mikrochirurgie
TNT	<i>Tunneling Nanotubes</i>
TORS	<i>Transoral robotic surgery</i>
UICC	<i>International Union for Cancer Control</i>
w/v	<i>Weight/volume</i>

1 Einleitung

1.1 Allgemeine Aspekte des oralen Plattenepithelkarzinoms

1.1.1 Epidemiologie

Tumoren der Kopf-Hals-Region sind die sechsthäufigsten Neoplasien weltweit und mit einer hohen Morbidität und Mortalität vergesellschaftet (Gadewal und Zingde 2011; Sarode et al. 2018). Histologisch handelt es sich bei ca. 90 % der Neoplasien in der Mundhöhle um Plattenepithelkarzinome (*oral squamous cell carcinoma*, OSCC) (Dumache 2017). Trotz verbesserter Therapieoptionen ist die Mortalität der Patienten mit OSCC im Vergleich zu anderen Tumorentitäten weiterhin hoch (Seki et al. 2011; Markopoulos 2012; Tang et al. 2015). Jährlich wird in Deutschland bei ca. 13.000 Patienten die Diagnose OSCC gestellt. Die Mortalität liegt bei ca. 5.000 Patienten pro Jahr (Baumann et al. 2016). Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt für beide Geschlechter bei etwa 50 % (Baumann et al. 2016). Diese Überlebensstatistiken haben sich über die letzten Dekaden nicht wesentlich verändert (Asadzadeh Vostakolaei et al. 2011; Oberaigner und Siebert 2011; Baumann et al. 2016). Obwohl die Untersuchung der Mundhöhle einfach durchgeführt werden kann, werden mehr als zwei Drittel der Karzinome erst in einem fortgeschrittenen Tumorstadium diagnostiziert (Mignogna et al. 2004; Baumann et al. 2016).

1.1.2 Risikofaktoren und Ätiologie

Die bedeutendsten Risikofaktoren, die in bis zu 90 % der Fälle für die Entstehung eines OSCC verantwortlich gemacht werden können, sind chronischer Tabak- und Alkoholkonsum (Argiris und Eng 2003; Dissanayaka et al. 2012; Rivera 2015). Die Kombination beider karzinogenen Stoffe wirkt synergistisch (Blot et al. 1988; Tuyns et al. 1988; Vineis et al. 2004; Koontongkaew 2013). Darüber hinaus wurden lokal demographische Faktoren wie das Kauen von Betelnuss (Tsai et al. 2004) und der Gebrauch von Schnupftabak (Proia et al. 2006) als ätiologische Faktoren beschrieben. Zuletzt wurde das humane Papillomvirus (HPV), hauptsächlich HPV Typ 16 und 18 (Kang et al. 2015), als weiterer ätiologischer Faktor beschrieben (Dalianis 2014). Andere Studien zeigen keine Assoziation zwischen dem oralen Plattenepithelkarzinom und dem HPV-Status, (Laborde et al. 2010). Im Gegensatz zum oralen Plattenepithelkarzinom, ist das HPV vor allem mit der Inzidenz des Oropharynx-

karzinoms assoziiert (Laborde et al. 2010). Diese HPV-Assoziation ist ein anerkannter prognostischer Marker für einen besseren klinischen Verlauf bei fortgeschrittenem Stadium (Kang et al. 2015).

Die häufigsten Lokalisationen eines oralen Plattenepithelkarzinoms sind Zunge, Lippen und Mundboden (Markopoulos 2012).

1.2 Tumorprogression

1.2.1 Staging und histopathologisches Grading

Um die Ausdehnung der Erkrankung einschätzen und ein individuelles Therapie-Konzept planen zu können, ist ein Tumor-Staging notwendig. Zu den gängigen Staging-Methoden zählen neben der Tumoranamnese und einer klinischen Untersuchung vor allem eine radiologische Beurteilung der Tumorausdehnung, die in der Regel durch eine Computertomographie (CT) der Kopf-Hals-Thorax-Region mit Kontrastmittel und/oder einer Magnetresonanztomographie (MRT) durchgeführt wird. Die häufigsten Lokalisationen, bei denen eine Fernmetastasierung nachgewiesen werden kann, sind die Lunge gefolgt von den mediastinalen Lymphknoten, der Leber und dem Skelettsystem (Argiris et al. 2008). In etwa 50 % der Fälle wird das OSCC in einem klinisch fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert, bei dem bei initialer klinischer Untersuchung schon Lymphknotenmetastasen diagnostiziert werden (Hamada et al. 2012; Morandi et al. 2015; Blatt et al. 2017). Neben der Tumorgröße ist das Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen ein wichtiger prognostischer Marker für den klinischen Verlauf der Patienten (Huang et al. 2012; Kono et al. 2013; Blatt et al. 2017; Sagheb et al. 2017). Das Tumor-Staging wird mit Hilfe der TNM-Klassifikation durchgeführt (Markopoulos 2012). Das American Joint Committee on Cancer (AJCC) und die International Union for Cancer Control (UICC) aktualisieren regelmäßig diese Klassifizierung, die aktuell in der achten Auflage zur Verfügung steht (Huang und O'Sullivan 2017). Das Hauptziel dieses Systems ist es, die Prognose der Patienten einzuschätzen, um das Therapie-Konzept anpassen zu können (Huang und O'Sullivan 2017). Neben der Ausdehnung des Primärtumors (T) wird das Vorhandensein von lokalen Lymphknotenmetastasen (N) und das Auftreten möglicher Fernmetastasen (M) bewertet (Huang und O'Sullivan 2017). Für die drei Hauptdimensionen T, N und M wurden verschiedene klinische Stadien beschrieben (Tumorstadium I-IV).

Darüber hinaus gibt es weitere histologische Kriterien, um den Differenzierungsgrad der Tumorzellen zu beurteilen (*Broders' grade*). Als G1 gradete Tumorzellen sind gut differenziert, ähneln dem Ausgangsepithel und haben eine geringe Wachstumsgeschwindigkeit.

Die Zellen eines G2-Tumors sind mäßig differenziert. G3-Tumorzellen sind niedrig differenziert und G4-Tumorzellen sind undifferenziert. Diese Zellen zeichnen sich durch eine hohe Wachstumsgeschwindigkeit und Malignität aus (Melo et al. 2014).

1.2.2 Therapeutische Ansätze

Die Therapie des OSCC wird interdisziplinär geplant und durchgeführt (Grobe et al. 2016). Das Ziel der Deutschen Krebsgesellschaft e.V. und anderer medizinischer und onkologischer Fachgesellschaften ist es, die Errichtung von interdisziplinären Tumorzentren mit spezifischen qualitativen und quantitativen Voraussetzungen zu fördern, um die medizinische Versorgung von Tumorpatienten zu verbessern (Grobe et al. 2016). In diesem Zusammenhang spielt die Tumorboard-Konferenz eine wichtige Rolle im Standardisierungsprozess der Diagnose- und Therapieplanung (Grobe et al. 2016). Die Komplexität des Krankheitsbildes bedarf einer multimodalen Therapie (Licitra et al. 2016).

Die chirurgische Tumorresektion ist die Standard-Therapie bei der Behandlung, die jedoch durch die anatomische Ausbreitung des Primärtumors beschränkt sein kann (Argiris et al. 2008). Zusätzlich wird eine zervikale Lymphadenektomie (*Neck Dissection*) durchgeführt, um zum einen dem Tumor präventiv den Lymphabfluss zu nehmen und zum anderen therapeutisch Metastasen zu entfernen (Argiris et al. 2008). Um die postoperative Morbidität einer *radical neck dissection* zu begrenzen, wurde die *selective neck dissection* eingeführt (Pagedar und Gilbert 2009), bei der selektiv die einzelnen Levelinhalte präpariert werden. Eine Sentinel-Lymphknoten-Biopsie (SNB) wird aktuell diskutiert, um okkulte Metastasen zu detektieren (Schilling et al. 2015) und die Komplikationen einer *neck dissection* zu minimieren (Thompson et al. 2013). Die transorale Laser-Mikrochirurgie (TLM) und die *transoral robotic surgery* (TORS) werden auch für die Resektion von Weichteiltumoren im HNO-Bereich verwendet (Karni et al. 2011; Patel et al. 2013; Fu et al. 2016). Sie ermöglichen eine komplette Resektion unter optimaler Visualisierung (Karni et al. 2011; Patel et al. 2013; Fu et al. 2016).

Die größte Herausforderung während des Eingriffs stellt die plastische und funktionelle Rekonstruktion des verloren gegangenen Gewebes dar (Kanazawa et al. 2011). Hierzu werden in der Regel freie mikrovaskulär reanastomosierte Transplantate eingesetzt. Als Beispiele für die Rekonstruktion eines reinen Weichteildefektes sind das radiale Forearm-Transplantat und der freie anterolaterale Oberschenkel-Lappen (ALT) zu nennen (Kanazawa et al. 2011). Knöcherne Defekte der Mandibula und Maxilla werden in der Regel mit einem Fibula-Transplantat (Verhelst et al. 2019), einem freien Beckenkammtransplantat (Hurvitz et al. 2006) oder einem Skapulatransplantat (Brown et al. 2010) rekonstruiert.

Neben der chirurgischen Exzision hat die Radiotherapie eine zentrale Rolle während der Therapie eingenommen. Diese kann entweder als alleinige oder als adjuvante Therapieoption durchgeführt werden (Argiris et al. 2008). Bei kapselüberschreitender Lymphknotenmetastase oder Fernmetastasierung wird sie mit einer zusätzlichen Chemotherapie kombiniert (Mazeron et al. 2009). Als Goldstandard bei der Therapie der Kopf-Hals-Karzinome werden immer noch die Platinderivate eingesetzt (Specenier und Vermorken 2009). Eine Cisplatin/Taxan-Kombination als Induktionschemotherapie ist eine Alternative bei fortgeschrittenen Plattenepithelkarzinomen (Mazeron et al. 2009). Seit einigen Jahren ist Cetuximab als Antikörper gegen den epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor (EGFr) für die Therapie zugelassen (Mazeron et al. 2009). Seit kurzem stehen die beiden Anti-PD-1-Antikörper Nivolumab und Pembrolizumab als *Second-line*-Therapeutika nach vorangegangener platinbasierter Therapie zu Verfügung, die aktuell in mehreren klinischen Studien untersucht werden (Ferris et al. 2016).

1.3 Connexine und Gap-Junctional-Intercellular-Communication (GJIC)

1.3.1 Struktur und Funktion von Connexinen

Gap-Junctions (GJ) sind interzelluläre Kanäle in der Plasmamembran zweier benachbarter Zellen (Abbildung 1), die eine interzelluläre Kommunikation (*Gap-Junctional-Intercellular-Communication*, GJIC) ermöglichen (Nielsen et al. 2012). Die morphologische Einheit eines GJ sind Connexone, symmetrische Hexamer-Strukturen, die als Halbkanäle die zytoplasmatischen Kompartimente zweier benachbarten Zellen miteinander verbinden (Löwenstein 1981). Durch die GJ ist die Passage kleiner Moleküle, wie Ionen (Na^+ , Ca^{+2} , K^+ , Cl^-), Signalmoleküle (cAMP, IP_3) oder Metaboliten (ATP) (Löwenstein 1981), bis zu einem Molekulargewicht von 1,2 kDa möglich. Dies spielt eine zentrale Rolle während der Homöostase, Zellwachstumskontrolle und Entwicklung (Leithe et al. 2018). Grundbaustein eines Connexons sind die Connexine. Connexone können entweder aus den gleichen Connexinen (homotypisch) oder aus verschiedenen Connexinen (heterotypisch) aufgebaut sein (Laird 2006; Pfenniger et al. 2011). Bisher sind 21 Connexine im menschlichen Proteom beschrieben worden, von denen Connexin 43 (Cx43) das am weitesten verbreitete ist und am häufigsten untersucht wurde (Leithe et al. 2018; Solan und Lampe 2018).

Jedes Connexin besteht aus vier Transmembrandomänen, einer zytoplasmatischen und zwei extrazellulären Schleifen. Das Amino- und Carboxylende befinden sich intrazellulär (Kumar und Gilula 1996). Der Hauptunterschied zwischen den einzelnen Connexin-Subtypen liegt in der Sequenz und Länge des Carboxylendes (Leithe et al. 2018). Das Carboxylende scheint

eine wichtige Rolle, nicht nur bei der Entstehung der GJ, sondern auch bei GJ unabhängigen, spezifischen Funktionen der Connexinen zu spielen (Leithe et al. 2018).

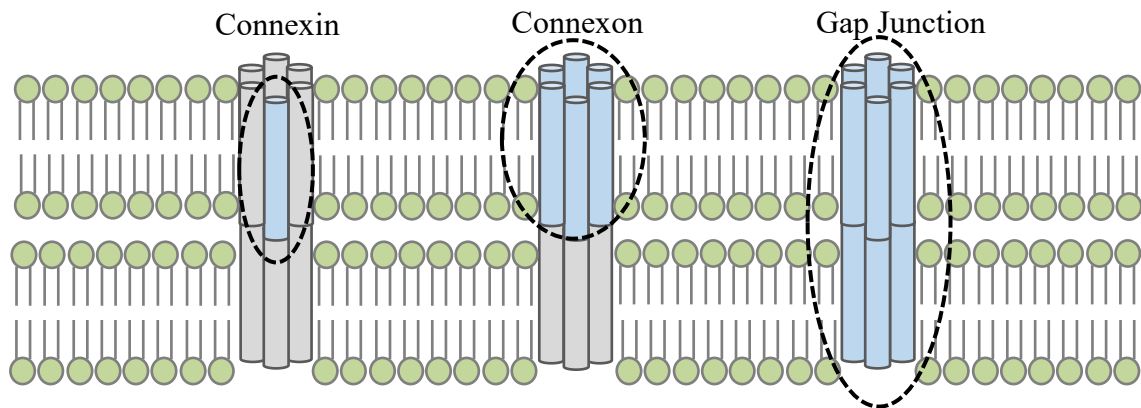


Abbildung 1: Schematischer Aufbau eines Connexin-Proteins in der Zellmembran. Sechs Connexine bilden einen Halbkanal (Connexon). Zwei Connexone benachbarter Zellen bilden den GJ-Kanal, der für die interzelluläre Kommunikation (GJIC) verantwortlich ist.

Cx43 scheint bei verschiedenen Regulationsmechanismen, wie beispielsweise der Zellzyklus-Regulation, der Tumorprogression, der Wundheilung, der Muskel-Differenzierung sowie der Gen-Regulation und Entwicklung beteiligt zu sein (Kardami et al. 2007; Vinken et al. 2012; Jiang und Penuela 2016; Aasen et al. 2017).

1.3.2 Lebenszyklus der Connexine

Connexine haben eine Halbwertszeit von wenigen Stunden (Fallon und Goodenough 1981; Laing und Beyer 1995; McLachlan et al. 2006). Beispielsweise wurde für Cx43 von einer Halbwertszeit zwischen eineinhalb und fünf Stunden in *In-vitro*- und *In-vivo*-Untersuchungen berichtet (Fallon und Goodenough 1981; Laird et al. 1991; Laird 2006). Wahrscheinlich sind Connexine auf einen kontinuierlichen Auf- und Abbau vorprogrammiert, um den GJ-Abbau den physiologischen Bedürfnissen anzupassen (Laird 2006).

Die Struktur des menschlichen Cx43 wird über das GJA1 Gen kodiert (Fishman et al. 1991). Es besteht aus zwei Exonen, welche von einem Intron unterschiedlicher Länge getrennt werden (Sullivan R et al. 1993; Pfeifer et al. 2004). Die vollständige Sequenz des Cx43-Proteins wird über das zweite Exon kodiert (Fishman et al. 1991). Für Cx43 wurden sechs verschiedene Transkripte (Pfeifer et al. 2004) sowie drei unterschiedliche Promotor-Regionen (P1, P2, P3) (Pfeifer et al. 2004) beschrieben, von denen die P1-Region die dominante Region ist (Carystinos et al. 2003).

Nach Transkription im Nukleus und Translation im Endoplasmatische Retikulum (ER), wird Cx43 in die Membran des ERs eingeschleust und post-translational modifiziert (Vanslyke und Musil 2002; Hesketh et al. 2009). Dabei kommt es zu mehreren Phosphorylierungen (Falk 2000). Nach Verifizierung in einzelnen Kontrollpunkten und Zusammenbau zu ionischen Kanälen, verlassen die Halbkanäle das ER und werden über Vesikel in das Endoplasmatisch-Retikulum-Golgi-Interkompartiment (ERGIC) transportiert (Watson et al. 2005). Hier laufen, während des Überganges vom Cis-Golgi-Netzwerk (CGN) in das Trans-Golgi-Netzwerk (TGN), weitere post-translational Modifikationen ab (Glick und Nakano 2009). Die funktionellen Connexone verlassen anschließend das TGN (Glick und Nakano 2009). Für Cx43 scheint die Oligomerisierung zu Hexameren im TGN statt zu finden (Musil und Goodenough 1993). Die fertigen Connexone werden anschließend über Vesikel in die Plasmamembran transportiert (Johnson et al. 2002; Lauf et al. 2002; Thomas et al. 2005), in der sie sich über laterale Diffusion bewegen können und in Verbindung mit dem Connexon einer benachbarten Zelle, einen GJ-Kanal bilden können. Zwischen zwei benachbarten Zellen können sich Regionen mit einer hohen Anzahl an GJ, sogenannte GJ-Plaques bilden, die aus Tausenden GJ-Kanälen bestehen und einen Durchmesser von mehreren Mikrometern haben können (Lauf et al. 2002). Zusätzlich wurde ein alternativer Transportweg als *Targeted Delivery* beschrieben (Epifantseva und Shaw 2018), in dem Connexone den Golgi-Apparat in Vesikeln verlassen und über Motorproteine an Mikrotubuli in die Membran transportiert werden (Shaw et al. 2007). Das beschriebene *Targeted Delivery* Modell könnte die kurze Halbwertszeit des Cx43 erklären (Shaw et al. 2007; Smyth et al. 2010; Epifantseva und Shaw 2018).

Es wurden unterschiedliche Proteine als intrazelluläre Reaktionspartner beschrieben. Für den Transport des Cx43 in die Plasmamembran wurde das EB1-Protein identifiziert, ein Bindungspartner am Mikrotubulus-Plus-Ende (Shaw et al. 2007), welches mit β -catenin und N-cadherin interagiert (Shaw et al. 2007). β -catenin ist ein Protein mit doppelter Funktion, das eine wichtige Rolle in der Zell-Adhäsion spielt (Bovolenta et al. 2008; Vyskocil et al. 2019). Es ist nur in der Membran und in den interzellulären Kanälen von physiologischen oralen Epithelzellen erkennbar (Cai et al. 2008; Vyskocil et al. 2019), wohingegen eine abnormale zytoplasmatische Expression mit Tumorprogression und Metastasierung korreliert (Vyskocil et al. 2019). N-cadherin gehört zu den Calcium-abhängigen-Adhäsionsmolekülen, die homotypische und heterotypische Zell-Zell-Adhäsion vermitteln (Mrozik et al. 2018). Die Funktion von N-cadherin wird durch post-translational Modifikationen reguliert

(Mrozik et al. 2018). Eine abnormale N-cadherin Expression ist mit einer Epithelial-Mesenchymalen-Transition (EMT) assoziiert, was zu einem aggressiveren Tumor-Phänotyp führt (Mrozik et al. 2018). Diese Transition ermöglicht es dem Tumorzellklon sich von dem primären Tumor loszulösen und in das umliegende Gewebe zu wandern (Mrozik et al. 2018). Das Cx43-Carboxylende wird mehrfach post-translational modifiziert, wodurch der intrazelluläre Transport und die GJ-Funktionen reguliert werden (Leithe et al. 2018). Das Cx43-Carboxylende besitzt verschiedene Domänen, die die Protein-Interaktionen bestimmen und Wechselwirkungen mit dem Cytoskelett ermöglichen (Leithe et al. 2018). Beispielsweise interagiert das Cx43-Carboxylende mit den 14-3-3 Proteinen (Park et al. 2006; Park et al. 2007), wodurch wahrscheinlich die Verteilung der neu synthetisierten Cx43 reguliert wird. Für diese Proteine wurden sieben Isoformen beschrieben, die an dem Zellwachstum und der Zellentwicklung beteiligt sind und deren Fehlregulation die Tumorgenese unterstützen kann (Morrison 2009; Freeman und Morrison 2011). Für die Interaktion des Cx43 mit den 14-3-3 Proteinen ist die Phosphorylierung an der Aminosäure Serin (Ser373) notwendig (Park et al. 2007). Die präzise Funktion der 14-3-3 Proteine während der Cx43-Regulierung ist noch nicht abschließend geklärt. Als wahrscheinlich gilt jedoch, dass sie an dem Transport des Cx43 ab dem ER oder dem TGN in die Plasmamembran beteiligt sind (Park et al. 2006; Park et al. 2007; Majoul et al. 2009; Batra et al. 2014; Leithe et al. 2018).

Für den Cx43-Abbau sind Proteasomen und Lysosomen wichtig (Falk et al. 2014). Das Carboxylende spielt eine entscheidende Rolle während dieses Prozesses (Leithe et al. 2018). Der proteasomale Abbauweg ist mit dem ER assoziiert (Su et al. 2012). Dieser ER-assozierte Abbau gilt als eine Art Qualitätskontrolle, in dem abnormale Proteine aus dem ER entfernt werden und in den Proteasomen abgebaut werden (Vembar und Brodsky 2008). Etwa 40 % der Cx43 durchlaufen diesen Prozess (Vanslyke et al. 2000; Vanslyke und Musil 2002). Alte membranöse Cx43 werden kontinuierlich aus den GJ-Plaques über Endozytose entfernt (Lauf et al. 2002). Diese findet nach Ubiquitinierung statt (Epifantseva und Shaw 2018). Nach erfolgreicher Endozytose, wurden zwei Cx43-Abbauwege beschrieben (Leithe et al. 2006; Lichtenstein et al. 2011; Fong et al. 2012). Zum einen über Autophagie oder über die Lysosomen (Leithe et al. 2006; Lichtenstein et al. 2011; Fong et al. 2012). Wahrscheinlich wird durch die post-translationalen Modifikationen, wie beispielsweise die Phosphorylierung (Leithe und Rivedal 2004; Remo et al. 2011) und Ubiquitinierung (Basheer et al. 2015; Martins-Marques et al. 2015) sowie die 14-3-3 Bindung (Smyth et al. 2014) der Abbauweg bestimmt.

1.3.3 Connexin 43 und Gap-Junctional-Intercellular-Communication (GJIC)

Neben dem schnellen interzellulären Molekül-Austausch spielt die Cx43 bedingte GJIC auch bei langsam ablaufenden physiologischen Prozessen, wie beispielsweise der neuronalen Entwicklung (Belousov et al. 2017), der Zellproliferation und Differenzierung, der Entwicklung der Augenlinse und Epidermis (Lilly et al. 2016; Berthoud und Ngezahayo 2017), der Entwicklung von Myoblasten und der Skelettmuskulatur (Merrifield und Laird 2016), eine entscheidende Rolle. Veränderungen der GJIC können mit unterschiedlichen Pathologien assoziiert sein (Smyth und Shaw 2013). Hierunter wären beispielsweise verschiedene Herzerkrankungen, wie kardiale Arrhythmie und Myokardischämie (Luke und Saffitz 1991; Smith et al. 1991; Beardslee et al. 2000; Akar et al. 2007), Bindegewebserkrankungen (Paznekas et al. 2003) und Tumorerkrankungen (Solan et al. 2012) zu nennen.

Da GJ und die GJIC in zahlreiche zelluläre und physiologische Prozesse involviert sind, sind Regulations-Mechanismen notwendig. Die Regulierung der GJIC erfolgt auf verschiedenen Ebenen, wie beispielsweise der Connexin-Genexpression, dem Lebenszyklus des Connexin-Protein-Levels, oder dem GJ-Aufbau und der Permeabilität (Gleisner et al. 2017). Der Schaltmechanismus der GJ-Kanäle spielt eine wichtige Rolle. Dieser kann zum einen durch Faktoren wie Spannung, pH-Wert und Kalziumkonzentration (Sosinsky und Nicholson 2005; Nielsen et al. 2012), aber auch durch post-translationale Modifikationen des Cx43-Carboxylendes sowie die Phosphorylierung an der Aminosäure Serin und Interaktionen zwischen Cx43 und andere Proteine reguliert werden (Leithe et al. 2018).

Ein niedriger intrazellulärer pH-Wert führt zu einem durch einen Partikel-Rezeptor (*particle-receptor*) Mechanismus vermittelten Verschluss der GJ-Kanäle. Bei diesem Mechanismus dient das Carboxylende als Schalt-Partikel und die zweite Hälfte der intrazellulären Schleife als Rezeptor, wodurch sich das Carboxylende mit der intrazellulären Schleife verbindet und den Kanal verschließt (Ek-Vitorín et al. 1996; Morley et al. 1996; Morley et al. 1997; Duffy et al. 2002; Seki 2004; Leithe et al. 2018). Ein ähnliches Modell wurde für den spannungsbedingten Schaltmechanismus beschrieben (Moreno et al. 2002). Andererseits wird die Öffnung der GJ-Kanäle über die Interaktion des Carboxylendes mit der intrazellulären Schleife vermittelt (Ponsaerts et al. 2010; D'hondt et al. 2013; Leithe et al. 2018).

Die GJIC kann auch über die Phosphorylierung des Cx43-Carboxylendes an der Aminosäure Serin reguliert werden. Zwei Studien haben eine mögliche Assoziation zwischen dem Phosphorylierungs-Status und der Fähigkeit der Zellen, GJ zu bilden (Musil et al. 1990; Musil und Goodenough 1991) beschrieben. Darüber hinaus sind verschiedene Kinasen in der Lage

die Cx43-Phosphorylierung zu regulieren (Solan und Lampe 2010; Leithe et al. 2018): Casein-Kinase-1 (CK1) ist an dem GJ-Aufbau über direkte Phosphorylierung des Cx43 beteiligt (Cooper und Lampe 2002). Es ist bekannt, dass Casein-Kinase-1 Isoformen die Tumordprogression beeinflussen können (Schittek und Sinnberg 2014). Diese scheinen jedoch eine unterschiedliche Wirkung bei den unterschiedlichen Tumorarten zu haben (Schittek und Sinnberg 2014).

Das Carboxylende interagiert zusätzlich mit dem Protein ZO1, eine membranständige Guanylatkinase. Die Interaktion Cx43/ZO1 reduziert die Größe der GJ und der Abbau dieser Interaktion führt zu einer Vergrößerung der GJ (Hunter et al. 2005; Rhett et al. 2011; Solan und Lampe 2018). Die Größe der GJ-Kanäle ist ein entscheidender Faktor für ihre Öffnungswahrscheinlichkeit (Bukauskas et al. 2000).

Die Funktion des Cx43 geht weit über seine Funktion als Membranprotein und die Regulierung der GJIC hinaus. In einer aktuellen Studie wurde beschrieben, dass Cx43 auch bei der Regulierung der Kommunikation zweier nicht-benachbarter Zellen beteiligt sein kann. In diesem Zusammenhang spielen *Tunneling Nanotubes* (TNT) und extrazelluläre Vesikel eine entscheidende Rolle (Wang et al. 2010; Oliveira-Costa et al. 2015; Ribeiro-Rodrigues et al. 2017). TNT ermöglichen die interzelluläre Kommunikation zwischen Zellen, deren Membranen über röhrenförmige Strukturen miteinander verbunden sind. Extrazelluläre Vesikel ermöglichen die Übertragung von Information zwischen getrennten Zellen, sodass eine Kommunikation über längere Entfernungen möglich ist (Ribeiro-Rodrigues et al. 2017).

1.3.4 Connexin 43 und GJIC während der Tumorgenese und -progression

Mutationen in Connexin-Genen und der damit verbundene Funktionsverlust der GJ können unterschiedliche Pathologien (Gleisner et al. 2017) und Tumorarten (Aasen et al. 2017) auslösen. Die Tumorgenese war eine der ersten Pathologien, die mit einer Schädigung der GJ assoziiert wurde (Jiang und Penuela 2016). Heutzutage weiß man, dass Connexine eine ambivalente Rolle in der Tumorgenese und -progression spielen (Sin et al. 2012). Aufgrund ihrer antiproliferativen Wirkung können sie einerseits bei Überexpression als Tumorsuppressoren wirken (Tittarelli et al. 2015). Andererseits scheinen sie in einigen Tumorarten über *junctionale* und *non-junctionale* Signalwege spezifische Stadien der Tumordprogression zu vermitteln (Aasen et al. 2017). Diese unterschiedliche Wirkung scheint von der Tumorart, dem Tumorstadium und dem Connexin-Isotyp abhängig zu sein (Naus und Laird 2010). Um die Rolle der Connexine richtig interpretieren zu können ist es wichtig die drei Phasen der Tumordprogression zu berücksichtigen. In den Phasen Tumorgenese, Tumordinvasion und

Metastasierung sind unterschiedliche Tumor-Phänotypen anzutreffen. Das Verhaltensmuster der GJ scheint sich zwischen den Phasen zu verändern. Die Tumorzellinvasion kann als eine Konsequenz der GJ-Unterbrechung gewertet werden, wodurch die Ablösung der Zellen ermöglicht wird. Für die Dissemination ist wiederum die Interaktion der Tumorzelle mit der endothelialen Barriere notwendig (Cronier et al. 2009).

Die genauen Funktionen des Cx43 während Tumorgenese und –progression sind noch nicht abschließend geklärt. Avanzo und Kollegen (2004) zeigten in ihrer Studie an Mäusen einen tumorsupprimierenden Effekt des Cx43 (Avanzo et al. 2004). In den Tieren mit niedriger Cx43-Expression konnte ein stärkeres Tumorwachstum nachgewiesen werden als in der Kontrollgruppe (Avanzo et al. 2004). Es konnte ein unterdrücktes Tumorwachstum bei Cx43-Überexpression in einer Mammakarzinom-Zelllinie nachgewiesen werden (McLachlan et al. 2007). Eine Cx43-Expression in Tumorzellen verhinderte den Tumorprogress (Cronier et al. 2009). Es wurde über eine erniedrigte Cx43-Expression bei Patienten mit Mammakarzinom (Laird et al. 1999) und zervikalen Dysplasien (King et al. 2000) berichtet. Li et al. (2008) beschrieben, dass eine erhöhte GJ-Entkopplung und Cx43-Expression zur Migration und Adhäsion der Zellen des Mammakarzinoms beisteuern (Li et al. 2008). Die Zell-Zell-Kommunikation könnte die Diapedese unterstützen (Pollmann et al. 2005). Elzarrad et al. (2008) zeigten, dass Cx43 die Metastasierung fördert, in dem die Adhäsion der Tumorzellen an den pulmonalen Endothelzellen steigt (Elzarrad et al. 2008). Dies weist darauf hin, dass Cx43 ein potenzieller Marker für Mikrometastasen sein kann (Elzarrad et al. 2008).

Zusammenfassend, hat Cx43 eine facettenreiche Funktion je nach Tumorstadium, mit einer niedrigeren Expression in Primärtumoren und einer höheren Expression in metastasierenden Tumoren (Jiang und Penuela 2016).

1.4 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Untersuchung ist es, verschiedene Mundhöhlenkarzinom-Zelllinien hinsichtlich ihrer Cx43-Expression zu charakterisieren. Die Untersuchungen sollen zum einen in der Monolayer-Zellkultur und zum anderen in multizellulären Tumorsphäroiden durchgeführt werden.

Folgende Hypothesen sollten getestet werden:

1. Es besteht ein unterschiedliches Connexin-43-Expressionsmuster zwischen den verwendeten Zelllinien (BHY, HN, CAL 27).
2. Es besteht ein unterschiedliches Cx43-Expressionsmuster zwischen der Monolayer-Zellkultur und der 3D Zellkultur (Tumorsphäroiden).
3. Das Cx43-Protein ist bei den Zelllinien vor allem intrazellulär lokalisiert.

2 Material und Methoden

2.1 Labormaterialien

2.1.1 Technische Geräte

Tabelle 1: Übersicht über die genutzten technischen Geräte.

Gerätebezeichnung	Hersteller
CO ₂ – Inkubator	Sanyo Electric Co., Osaka, Japan
Sterilbank HERA Safe	Heraeus Instruments, Düsseldorf, Deutschland
Zytozentrifuge Shandon Cytospin 3	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Gefrierschrank (-80 °C)	GFL, Burgwedel, Deutschland
Comfort-Gefrierschrank (-20 °C)	Liebherr, Bulle, Schweiz
Kühl- und Gefrierkombination (+4 °C und -20 °C)	Liebherr
Feinwaage	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Vortex Genie 2	Bander & Hohbein AG, Zürich, Schweiz
Paraffin Automat	Thermo Fisher Scientific
Mikroskop Axioskop 2 plus light	Zeiss, Göttingen, Deutschland
Magnetrührer (mit Heizschüttler) MAG RET	IKA-Kombi, Jahnke + Kunkel, Stauffen, Deutschland
Brutschrank (+40 °C)	Heraeus Instruments
ND-1000 Spektrophotometer	NanoDrop Technologies, Wilmington, USA
2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies Sles & Services GmbH & Co. KG., Waldbronn, Deutschland
MyIQ Real-Time-PCR Detection System	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Tischzentrifuge 5810 R	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Mikrozentrifugen 5815 R und 5815 D	Eppendorf
Gelelektrophoresesystem 13cm x 8cm	Bio-Rad Laboratories GmbH

Gerätebezeichnung	Hersteller
pH-Meter PB-11	Sartorius
Rotationsschüttler GFL 3005	GFL
Schüttelinkubator	IKA-Vibrax VXR, Jahnke + Kunkel, Stauffen, Deutschland
Scanner Fluorescent Image Analyzing System FLA-5100	Fujifilm, Düsseldorf, Deutschland

2.1.2 Software

Tabelle 2: Auflistung der benötigten Software.

Softwarebezeichnung	Hersteller
AxioVision 4.8	Zeiss
ImageJ	Java, NIH (National Institute of Health), USA
Primer Blast NCBI	National Center for Biotechnology Information, USA
Microsoft Excel	Microsoft Deutschland GmbH
Microsoft Word	Microsoft
IBM SPSS Statistics 23	IBM

2.1.3 Lösungen, Reagenzien und anderes Zubehör

Tabelle 3: Auflistung aller benötigten Reagenzien, anderes Zubehör.

Technik	Lösungen/Reagenzien/Zubehör
Zellkultur	<p>Zellkulturflaschen Tissue Culture Flask 25cm², 75cm² (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)</p> <p>Nährmedium DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) mit folgenden Zusätzen: 10 % <i>h.i. FKS (PAA)</i>; 1 % <i>Penicillin/Streptomycin</i></p> <p>Trypsin EDTA 0,5 % (In Vitrogen Corporation, GIBCO, Waltham, Massachusetts, USA)</p> <p>PBS – Puffer: <i>Natriumdihydrogenphosphat x H₂O</i> (Merck, Darmstadt, Deutschland), <i>Dinatriumhydrogenphosphat x 2 H₂O</i> (Merck), mit A.dest dH₂O.</p> <p>Zählkammer nach Neubauer (neoLab, Heidelberg, Deutschland)</p>
Ki-67 Färbung	<p>Monoclonal Mouse Anti Human Ki-67, MIB-1 (Dako A/S, Copenhagen, Dänemark)</p> <p>DAKO TechMate 500 plus (Dako A/S)</p>
Tumorsphäroide	<p>Standardagarose, Roti®garose (Roth, Karlsruhe, Deutschland)</p> <p>Formalin, 4 % gepuffert</p>
Immunfluoreszenz	<p>4 % Paraformaldehyd</p> <p>Triton X-100 (Sigma-Aldrich)</p> <p>Bovine Serum Albumin (Sigma-Aldrich)</p> <p>Fettarme Trockene Milch #9999 (Cell Signaling Technology, Europe B.V.)</p> <p>Primärantikörper: Connexin 43 Rabbit Antibody #3512 (Cell Signaling Technology)</p> <p>Sekundärantikörper: Anti-rabbit-IgG, NL577 Conjugated Donkey IgG (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)</p> <p>DAPI for nucleic acid staining D9542 (Sigma-Aldrich)</p> <p>Fluoromount™ Aqueous Mounting Medium (Sigma-Aldrich)</p>
Western-Blot	<p>BCA Protein Assay Kit (Pierce™, Thermo Fisher Scientific)</p> <p>Rotiphorese Gel 30 (Roth)</p> <p>Tris Buffered Saline (TBS) #12498 (Cell Signaling Technology)</p> <p>Bolt™ LDS Sample Puffer (4X) (Thermo Fischer Scientific)</p> <p>Bolt™ Sample Reducing Agent (10X) (Thermo Fischer Scientific)</p> <p>30 % Acrylamid/Bis Acrylamid (29:1) (Sigma-Aldrich)</p>

Technik	Lösungen/Reagenzien/Zubehör
	Ammonium Persulfate (APS) 10 % (Sigma-Aldrich)
	TEMED (Thermo Fischer Scientific)
	4x Laemmli Sample Buffer #1610747 (Bio Rad)
	SDS Sample Puffer #7722 (Cell Signaling Technology)
	Tris-Glycine SDS Running Puffer #4050 (Cell Signaling Technology)
	Tris-Glycine Transfer Puffer #12539 (Cell Signaling Technology)
	Tris Buffered Saline mit Tween® 20 (TBST) #9997 (Cell Signaling Technology)
	Fettarme Trockene Milch #9999 (Cell Signaling Technology)
	Blocking Puffer (1X TBST mit 5 % w/v fettarmer trockener Milch)
	Primary Antibody Dilution Puffer (TBST mit 5 % FKS)
	Biotinylated Protein Ladder Detection Pack #7727 (Cell Signaling Technology)
	Prestained Protein Marker, Broad Range (11 – 190 kDa) #13953 (Cell Signaling Technology)
	Blotting Membran und Papier #12369 (Cell Signaling Technology)
	Primärer Antikörper: Connexin 43 Rabbit Antibody #3512 (Cell Signaling Technology)
	Sekundärer Antikörper: Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody #7074 (Cell Signaling Technology)
	Chemilumineszenz Substrat West Pico, (Thermo Fischer Scientific)
	Stripping Puffer (Tris-HCl pH 6,8; 20 % SDS, β -mercaptoethanol)
RNA-Extraktion	RNeasy Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden)
	RLT – Lysispuffer (Qiagen GmbH)
	β – Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich)
	DNase, RNase-frei 50-375U/ μ l 18047-019 (Invitrogen)
Real-Time-PCR	iScript cDNA Synthesis Kit 170-8890 (Bio-Rad Laboratories)
	iQ SYBR Green Supermix 170-8882 (Bio-Rad Laboratories)

2.1.4 Weiteres Zubehör

Tabelle 4: Auflistung von weiterem Zubehör.

Produkt	Hersteller
96-Well-Platten	NUNC, Thermo Fisher Scientific
Pipetten	Eppendorf
Petri Schalen	NUNC, Thermo Fisher Scientific
Eppendorf-Mikroreaktionsgefäß	Eppendorf
Zellschaber	Sarstedt
Falcon Röhrchen	Sarstedt

2.1.5 Zelllinien des oralen Plattenepithelkarzinoms

Tabelle 5: Auflistung der verwendeten Zelllinien.

Name	Zelltyp	Quelle
BHY	Orales Plattenepithelkarzinom ACC 404	DSMZ, Braunschweig, Deutschland
HN	Orales Plattenepithelkarzinom ACC 417	DSMZ
CAL-27	Orales Plattenepithelkarzinom ACC 446	DSMZ

2.2 Methoden

2.2.1 Zelllinien und Zellkultur

Die Untersuchungen wurden an den drei Mundhöhlenkarzinom Zelllinien BHY, HN und CAL-27 (Tabelle 5) durchgeführt (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, DSMZ). Alle Zelllinien waren HPV-, HBV-, HCV- und EBV-negativ. Zusätzlich wurden die immortalisierte Maus Myoblasten Zelllinie C2C12 als Positiv- sowie die humane kolorektale Adenokarzinom Zelllinie CaCo2 als Negativkontrolle verwendet.

BHY-Zelllinie (DSMZ Nr. ACC 404): Plattenepithelkarzinom Zelllinie, isoliert von einem Karzinom des Unterkiefer-Alveolarfortsatzes eines 52-jährigen Japaners, aggressiv bis in den Unterkieferknochen und die angrenzende Mundbodenmuskulatur einwachsend. Diese Zelllinie wurde aufgrund der in der Literatur beschriebenen Fähigkeit, in angrenzendes Knochen einzudringen, ausgewählt (Uchida et al. 2001; Erdem et al. 2007).

HN-Zelllinie (DSMZ Nr. ACC 417): Plattenepithelkarzinom Zelllinie, isoliert aus einer zervikalen Lymphknotenmetastase die sieben Jahre nach Therapie eines Karzinoms des weichen Gaumens eines 60-jährigen Japaners aufgetreten ist. Es ist bekannt, dass HN zwar in den Lymphknoten, die Lungen und das Hirn metastasiert ist, jedoch die Fähigkeit verloren hat, in den lokalen Kieferknochen einzudringen (Erdem et al. 2007).

CAL-27-Zelllinie (DSMZ Nr. ACC 446): Mundhöhlenkarzinom Zelllinie, isoliert von einem Zungenkarzinom eines 56-jährigen Mannes. CAL-27 ist eine der meist verwendeten Zelllinien in der Tumorforschung (Jiang et al. 2009).

Alle Zelllinien wurden in 90 % Dulbecco's MEM (DMEM) (4,5 g/L Glukose) + 10 % h.i. FKS + 1 % Penicillin/Streptomycin (Tabelle 3) kultiviert und bei 37 °C mit 10 % CO₂ inkubiert.

Die Zellen wurden alle zwölf Stunden in einer Neubauer Kammer gezählt, um die Tumorverdopplungsrate zu bestimmen. Jedes Vorgehen und Experiment wurden im dreifachen Ansatz durchgeführt. Um die Proliferation der verschiedenen Zelllinien zu bestimmen, wurde zusätzlich Mithilfe des neuropathologischen Instituts der Universitätsmedizin Göttingen (Prof. Dr. Christine Stadelmann-Nessler) eine immunhistochemische Beurteilung der Zellen durchgeführt, die auf das Proliferations-Antigen Ki-67 positiv waren. Zu diesem Zweck wurde für jede einzelne Zelllinie eine Zellsuspension mit DMEM vorbereitet und in ein 50 ml Falcon Röhrchen (Tabelle 4) überführt. Der DMEM Überstand wurde abpipettiert und 20 ml 4 % Formalin wurden hinzugefügt. Die Fixierung wurde für fünf Stunden aufrechterhalten. Das Sediment wurde in einen 0,5 ml E-cup übertragen und mit einer 3 % Agarose-Lösung benetzt. Der resultierende Agarose-Block wurde anschließend für die Paraffin-Einbettung mit dem Paraffin Automat Excelsior ES (Thermo Fisher Scientific) verwendet (Tabelle 1). Die Ki-67 Färbung wurde nicht manuell, sondern im DAKO TechMate 500 plus (Dako) mit dem primären Maus-monoklonalen anti-Ki-67 Antikörper (Dako) durchgeführt. Für die Auswertung der Ki-67 Färbung wurden drei unterschiedliche Felder ausgewählt und insgesamt 1000 Zellen aufgezählt (Dowsett et al. 2011). Nur die nukleäre Ki-67 Färbungen wurden als positiv betrachtet (Dowsett et al. 2011). Der Ki-67 Index wurde als Prozentsatz der Ki-67 positiv gefärbten Zellen errechnet (Dowsett et al. 2011).

2.2.2 Herstellung der multizellulären Tumorsphäroide

Für die Herstellung der multizellulären Tumorsphäroide wurde die *liquid overlay technique* verwendet (Sievers et al. 2017). 50 µl einer Agarose-Lösung (0,15 g Agarose vermischt mit 10 ml DMEM + 10 % h.i. FKS + 1 % Penicillin/Streptomycin) wurde in jedes *Well* einer

96er *Well Plate* pipettiert und für 30 Minuten abgekühlt. Die Zellsuspension wurde mit Trypsin/EDTA vorbereitet. Die Zellen wurden in einer Neubauer Kammer ausgezählt. Insgesamt wurden 480.000 Zellen in 19,2 ml DMEM für die Tumorsphäroid-Herstellung benutzt. 200 µl der Zellsuspension wurden pro *Well* verwendet (5.000 Zellen per *Well*). Die Bildung von multizellulären Tumorsphäroiden wurde täglich in jeder *Well Plate* mit dem Mikroskop (Zeiss) kontrolliert. Um das Wachstumsverhalten zu charakterisieren (siehe Ergebnisteil) wurden die Tumorsphäroide täglich für insgesamt zwölf Tage mit der AxioVision Software Version 4.8 (Zeiss) fotografiert und der Durchmesser gemessen (AxioVision Software Version 4.8, Zeiss). Die Tumorsphäroide wurden geerntet, wenn sie optisch eine gewisse Kompaktheit und metrisch einen stabilen Durchmesser erreicht hatten (Siehe Ergebnisse). Die BHY-Tumorsphäroide wurden nach drei Tagen geerntet; Die HN-Tumorsphäroide wurden nach fünf Tagen und die CAL-27-Tumorsphäroide nach vier Tagen geerntet. Die Tumorsphäroide und ihr Überstand wurden mit einer Pasteur Pipette entnommen und in ein 50 ml Falcon Röhrchen überführt. Die so gewonnenen Tumorsphäroide wurden für die weiteren Analysen verwendet (Immunfluoreszenz, Western-Blot und Real-Time-PCR).

Für die Paraffin-Einbettung, wurde der DMEM Überstand abpipettiert und 20 ml 4 % Formalin hinzugefügt. Die Fixierung wurde für fünf Stunden aufrechterhalten. Das Sediment wurde in einen 0,5 ml E-cup übertragen und mit einer 3 % Agarose-Lösung benetzt. Der resultierende Agarose-Block wurde anschließend für die Paraffin-Einbettung mit dem Paraffin Automat Excelsior ES (Thermo Fisher Scientific) verwendet.

2.2.3 Charakterisierung der Connexin-43-Expression

2.2.3.1 Immunfluoreszenz

Zunächst wurde eine Immunfluoreszenz der Cx43-Expression an der Monolayer-Zellkultur durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen mit 4 % Formaldehyd in PBS für 15 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Anschließend wurden sie mit PBS gewaschen und mit 0,1 % Triton X-100 für 30 Minuten permeabilisiert. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und dann mit PBS + 5 % (w/v) trockener Milch + 0,1 % Tween für eine Stunde inkubiert. Danach wurden sie mit dem primären Antikörper (Connexin 43 Rabbit Antibody #3512, Cell Signaling Technology) über Nacht inkubiert, mit PBS gewaschen und mit dem NL577 konjugierten sekundären Antikörper (Anti-rabbit-IgG, NL577 Conjugated Donkey IgG, R&D Systems) für eine Stunde inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und die Nuklei mit DAPI (1:1000 in PBS) gegengefärbt und mit dem Mounting Medium

(Fluoromount™Sigma) im Objektträger fixiert. Die Proben wurden anschließend mit dem Lichtmikroskop (Axioskop Apo Tome, Zeiss) ausgewertet. Abbildungen wurden mit der AxioVision Software Version 4.8 (Zeiss) erstellt.

Für die multizellulären Tumorsphäroide (3D Zellkultur), wurden die Tumorsphäroide wie unter Punkt 2.2.2 beschrieben vorbehandelt. Der DMEM Überstand wurde vorsichtig entfernt. 1 ml PBS wurde hinzugefügt, vermischt, für 15 Sekunden zentrifugiert und der Überstand abfiltriert. Für die Fixierung wurde 1 ml 4 % PFA hinzugefügt, vermischt und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen wurden anschließend zweimal mit PBS gewaschen. Ein Gemisch aus 3 % BSA (0,3 g), 0,1 % Triton X-100 und 10 ml PBS wurde hinzugefügt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. 2 µl des primären Antikörpers (Tabelle 3) wurden hinzugefügt und über Nacht bei 4 °C im Schwenkschüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen drei Mal mit 500 µl 0,1 % Triton X-100/PBS gewaschen. Anschließend wurde der sekundäre Antikörper (Tabelle 3) hinzugefügt (300 µl NL577 in PBS 1:2000), vermischt und für eine Stunde bei Raumtemperatur im Dunklen inkubiert. Die Zellen wurden drei Mal mit 500 µl 0,1 % Triton X-100/PBS gewaschen. 500 µl DAPI in dH₂O (1:1000) wurde hinzugefügt, vermischt und für fünf Minuten bei Raumtemperatur im Dunklen inkubiert. Danach wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Das Pellet wurde mit 100 µl Mounting Medium gemischt, auf dem Objektträger fixiert und für 20 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet. Die Proben wurden wie oben beschrieben mit dem Lichtmikroskop ausgewertet.

2.2.3.2 *Western-Blot*

Die Zellen der Monolayer-Zellkultur wurden wie unter Punkt 2.2.1 beschrieben vorbehandelt. Die Zellernte erfolgte durch einen Zellschaber (Sarstedt). Die Zellen der multizellulären Tumorsphäroide wurden wie unter Punkt 2.2.2 beschrieben vorbehandelt. Die Zellen wurden anschließend auf 10 cm Schalen ausgesät und über Nacht bei 37 °C in dem Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurden sie mit eiskaltem PBS gewaschen. 500 µl 1x RIPA Puffer (Tabelle 6 und Tabelle 7), Protease Inhibitoren und NP-40 wurden hinzugegeben. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber geerntet (Tabelle 4), in Eppendorf-Mikroreaktionsgefäße überführt und für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Um die Lyse zu vervollständigen, wurden die Zellen auf höchster Stufe für zehn Sekunden sonifiziert und für 15 Minuten bei 4 °C auf ca. 13000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Mikroreaktionsgefäß überführt.

Tabelle 6: 5x RIPA-Puffer.

Konzentration	Insgesamt 50 ml	Stock Lösung
50 mM Tris	25 ml	1M Tris pH 7,4
150 mM NaCl	15 ml	5M NaCl
1 mM EDTA	1 ml	500 mM EDTA pH 8,0
dH ₂ O	9 ml	(dH ₂ O)

Tabelle 7: Pipettierschema 1x RIPA-Puffer.

Lösung/Reagenzien	Menge
H ₂ O	760 ml
5x RIPA	200µl
100x Protease-Inhib.	20µl
10 % NP-40	20µl

Die Messung der Proteinkonzentration wurde mittels BCA-Assay durchgeführt. Dazu wurden die Standards vorbereitet und die Proteinproben im Verhältnis 1:10 verdünnt. Die Proben wurden mit dem BCA-Reagenz für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Extinktion bei 562 nm in einem Fotometer bestimmt (NanoDrop Technologies).

Für die weiteren Analysen wurde eine Proteinkonzentration von 30 µg/µl benötigt. Zur Vorbereitung der Proben wurde Milli-Q® Wasser (Millipore Merck) in mehreren Eppendorf Mikroreaktionsgefäße überführt. Pro Eppendorf Mikroreaktionsgefäß wurden die Protein Probe (20 µl), LDS Sample Puffer (7,5 µl) und Sample Reducing Agent (3 µl) vermischt und für fünf Minuten bei 95 °C aufgeköcht.

Für die Western-Blot-Technik wurden eigene Gele angesetzt. Diese bestanden aus einem 12 %igem Trenngel und einem 4 %igem Sammelgel (Tabelle 8 und Tabelle 9).

Tabelle 8: Pipettierschema für das SDS-Gel (zwei Trenngele, 12 %).

Trenngel	12,0 %
Lösung/Reagenzien	Menge
H ₂ O	3,5 ml
30 % AA/BisAA (29:1)	4 ml
4xLT w/SDS	2,5 ml
APS (10 %)	100 ml
TEMED	10 ml

Tabelle 9: Pipettierschema für das SDS-Gel (vier Sammelgele, 4 %).

Sammelgel	4,0 %
Lösung/Reagenzien	Menge
H ₂ O	6,5 ml
30 % AA/BisAA (29:1)	1,0 ml
4xUT w/SDS	2,5 ml
APS (10 %)	100 ml
TEMED	10 ml

Die Glasplatten wurden mit 70 % Ethanol gereinigt, zusammengesetzt und in der Gießstation befestigt. 4,8 ml des Trenngels wurden in den Zwischenraum der Glasplatten pipettiert, mit Isopropanol überschichtet und für 30 Minuten polymerisiert. Das Isopropanol wurde abgossen und dreimal mit Wasser gewaschen. Das Wasser wurde mit Hilfe eines Whatmanpapiers vollständig entfernt. Die Sammelgele wurden bis zur Oberkante der Glasplatte auf die Trenngele pipettiert. Um zehn Geltaschen mit einer Breite von 10 mm zu erzeugen wurde ein Trennkamm eingesetzt und die Gele für 30 Minuten polymerisiert. Anschließend wurden die Gele in die Halterung eingeklemmt und in die Kammer gestellt. Die Kammer wurde nun mit dem Laufpuffer aufgefüllt. Der Trennkamm wurde senkrecht aus dem Gel herausgezogen. Die Taschen wurden mit Puffer ausgespült und mit den Proben von Proteinlysaten/Mar-

ker (30 μ l) beladen. Nun wurden die beladenen Gele bei 100 V laufen gelassen, bis der Marker im Trenngel sichtbar war. Anschließend wurden die beladenen Gele bei 150 V laufen gelassen, bis die Lauffront vom Marker aus dem Gel herausgelaufen ist.

Der Blotpuffer (Tabelle 10) wurde im Kühlschrank bei 4 °C vorgekühlt. Whatmanpaper und Schwämme wurden in Blotpuffer equilibriert. Die PVDF-Membran wurde in Methanol aktiviert und in Blotpuffer gelegt. Die Gele wurden anschließend aus der Apparatur genommen und das Sammelgel abgetrennt.

Tabelle 10: Pipettierschema für den Blotpuffer.

Lösung/Reagenzien	Menge
10 x Blotpuffer	100 ml
Methanol	100 ml
H ₂ O	800 ml

Für die Vorbereitung für das Blotten wurde ein Gelkassettenhalter nach dem Sandwich-Prinzip bestückt. Die Rote Seite der Halterung wurde über den Kassettenhalter geklappt und festgeklemmt. Die Blotkammer wurde mit Blotpuffer befüllt und der bestückte Kassettenhalter in die Blotkammer gesteckt. Diese wurde erstmals für 15 Minuten bei 150 mA und anschließend für eine Stunde bei 300 mA geblottet. Danach wurde der Kassettenhalter auseinandergebaut und die Membran auf einem Schwenkschüttler für eine Stunde in 5 % Milchpulver in TBST blockiert.

Der primäre Antikörper (5 μ l) (Tabelle 3) wurde in 5 % BSA in TBST angesetzt. Die Blockierlösung wurde abgegossen und die Membran über Nacht mit dem primären Antikörper bei 4 °C auf einem Schwenkschüttler inkubiert. Der sekundäre Antikörper (Tabelle 3) wurde in ein Falconröhrchen überführt. Die Membran wurde dreimal für fünf Minuten mit TBST gewaschen und mit dem sekundären Antikörper (2,5 μ l in 5 ml) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Membran wurde drei Mal für fünf Minuten mit TBST gewaschen. Die Lumineszenz-Reagenzien wurden im 1:1-Verhältnis angesetzt und gleichmäßig auf die Membran aufpipettiert. Anschließend wurde die Membran mit dem Fuji-FLA-5100-Fluoreszenz-Laserscanner (Fujifilm) bei 635 nm gescannt.

2.2.3.3 *Real-Time-PCR*

Sowohl von der Monolayer-Zellkultur, als auch von den Tumorsphäroiden wurde RNA isoliert. Die Zellen der Monolayer-Zellkultur wurden wie unter Punkt 2.2.1 beschrieben vorbehandelt. Die Zellernte erfolgte durch einen Zellschaber. Die Zellen der Tumorsphäroide wurden wie unter Punkt 2.2.2 beschrieben vorbehandelt. Zur Zelllyse wurde der RLT-Puffer (350 µl) des Qiagen RNeasy Mini Kits® (Qiagen GmbH) auf das Zellpellet gegeben und vermischt, bis das Pellet gelöst wurde. 70 % Ethanol wurde im Verhältnis 1:1 zugegeben und vermischt. Das Gemisch wurde auf die RNeasy Spin-Säule überführt und für 15 Sekunden bei 8000 g zentrifugiert. Dadurch wurde die RNA in der Säule gebunden und der Überstand verworfen. 700 µl RW1-Puffer wurden auf die Säule gegeben, für 15 Sekunden bei 8000 g zentrifugiert und der Überstand verworfen. 500 µl RPE-Puffer wurden auf die Säule gegeben, für 15 Sekunden bei 8000 g zentrifugiert und der Überstand wurde verworfen. 500 µl RPE-Puffer wurden auf die Säule gegeben und für zwei Minuten bei 8000 g zentrifugiert. Die Säule wurde in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Mikroreaktionsgefäß überführt. 30 µl RNase freies Wasser wurden auf die Säule gegeben und für eine Minute bei 8000 g zentrifugiert, um die RNA zu eluieren. Der RNA-Gehalt wurde mit dem NanoDrop Spektralphotometer (NanoDrop Technologies) bestimmt.

Für das Umschreiben der mRNA in cDNA wurde das iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad Laboratories) benutzt. Pro Reaktion wurden jeweils 1 µg RNA-Probe mit 4 µl 5x iScript Reaction Mix, 1 µl iScript reverse Transkriptase und H₂O nukleasefrei gemischt, um 20 µl Gesamtvolumen zu erhalten. Die daraus resultierenden cDNA-Proben wurden für die Real-Time-PCR benutzt.

Die verwendeten Primer (Tabelle 11) wurden aus den Gensequenzen der National Center for Biotechnology Information (NCBI) Genbank entnommen (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Für jedes Primerpaar wurde die optimale Arbeitstemperatur von 60 °C verifiziert und mittels PCR die Funktionsfähigkeit getestet.

Tabelle 11: Auflistung der verwendeten Primer.

Primer	Sequenz
Connexin 43 <i>for</i>	5'-AGC AGT CTG CCT TTC GTT GT-3'
Connexin 43 <i>rev</i>	5'-TCT GCT TCA AGT GCA TGT CC-3'
GAPDH <i>for</i>	5'-GAG TCA ACG GAT TTG GTC GT-3'
GAPDH <i>rev</i>	5'-GAC AAG CTT CCC GTT CTC AG-3'

Der für die Real-Time-PCR benötigte Master-Mix wurde nach folgendem Pipettierschema (Tabelle 12) angesetzt:

Tabelle 12: Ansatz entsprechend einer Probe.

Lösung/Reagenzien	Menge
Wasser	7 μ l
iQ SYBR Green Supermix	10 μ l
Forward Primer (10 μ M)	1 μ l
Reverse Primer (10 μ M)	1 μ l
cDNA (10ng/ μ l)	1 μ l

Für jede Real-Time-PCR wurden versiegelte Probenplatten mit 96 Reaktionsgefäßen verwendet. Als Positiv-Kontrollen wurden C2C12 Proben verwendet. Als Negativ-Kontrollen wurden CaCo2 Proben und steriles Wasser verwendet.

Folgendes Programm (Tabelle 13) wurde am Bio-Rad iQ5 *Real-Time Detection-System* (Bio-Rad Laboratories GmbH) etabliert:

Tabelle 13: Bio-Rad Real-Time-PCR-Programm.

Phase	Temperatur und Zeit
1x Polymerase Aktivierung und DNA Denaturierung	95 °C, 3 min
40x Amplifikation	
Denaturierung	95 °C, 15 s
Annealing und Platte Messung	60 °C, 30 s

Dadurch wurden die Effizienz der Real-Time-PCR-Reaktion für Cx43 (Zielgen) und der Ct-Wert kalkuliert. Der *threshold cycle* (Ct) ist der PCR Zyklus, an dem die Fluoreszenzaktivität signifikant über die Hintergrundfluoreszenz ansteigt und die exponentielle Phase der DNA-Amplifikation beginnt. Die Real-Time-PCR des Referenzgens GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) wurde als interne Kontrolle durchgeführt. Die Cx43-Genexpression wurde nach der Formel von Pfaffl (Pfaffl 2001) auf GAPDH normalisiert und relativ quantifiziert:

$$R = \frac{E_{GOI}^{\Delta CT_{GOI} (Standard-Probe)}}{E_{GAPDH}^{\Delta CT_{GAPDH} (Standard-Probe)}}$$

Dabei ist E_{GOI} die Real-Time-PCR-Effizienz des Zielgens; E_{GAPDH} ist die Real-Time-PCR-Effizienz des Referenzgens. ΔCT oder *threshold cycle* markiert den Beginn der exponentiellen Phase der Reaktion. R ist der relative Expressionsquotient des Zielgens und wird auf der Basis von E und der Abweichung der Ct-Werte der unbekanntten Probe gegen die Kontrolle (Standard) berechnet. Somit wird es im Verhältnis zum Referenzgen GAPDH ausgedrückt.

Die statistische Auswertung wurde mit dem Programm SPSS (IBM Statistics 23, Tabelle 2) durchgeführt und mittels one way ANOVA und Zweistichproben-t-Test mit ungleichen Varianzen analysiert. Die p-Werte wurden mit der Bonferroni Methode adjustiert, um eine alpha-Fehler Kumulierung zu neutralisieren. Bei p-Werten unter 0,05 wurden signifikante Unterschiede angenommen.

3 Ergebnisse

3.1 Tumorverdopplungsraten und Ki-67-Färbung in der Monolayer-Zellkultur

Die Zelllinie BHY zeigte in der Monolayer-Zellkultur eine Verdopplungszeit von 72 Stunden; HN eine Zeit von 50 Stunden und CAL-27 eine Verdopplungszeit von 36 Stunden.

Die Zelllinie BHY zeigte 29 % Ki-67 positive Zellen; HN war zu 36 % Ki-67 positiv; CAL-27 wies einen Anteil von 52 % Ki-67 positiven Zellen auf (Tabelle 14).

Tabelle 14: Merkmale der verwendeten Zelllinien.

Zelllinie	Verdopplungszeit	Ki-67	Wachstumsgeschwindigkeit
BHY	72 Stunden	29 %	Langsam wachsende OSCC-Zelllinie
HN	50 Stunden	36 %	Mäßig dynamisch wachsende OSCC-Zelllinie
CAL-27	36 Stunden	52 %	Schnell wachsende OSCC-Zelllinie

3.2 Wachstum der multizellulären Tumorsphäroide

3.2.1 BHY

Nach drei Tagen zeigten sich bei der BHY-Zelllinie kompakten Tumorsphäroide mit einem stabilen Durchmesser (Abbildung 2). Der Durchmesser lag im Durchschnitt bei 0,248 mm (SD=0,031mm) an Tag drei.

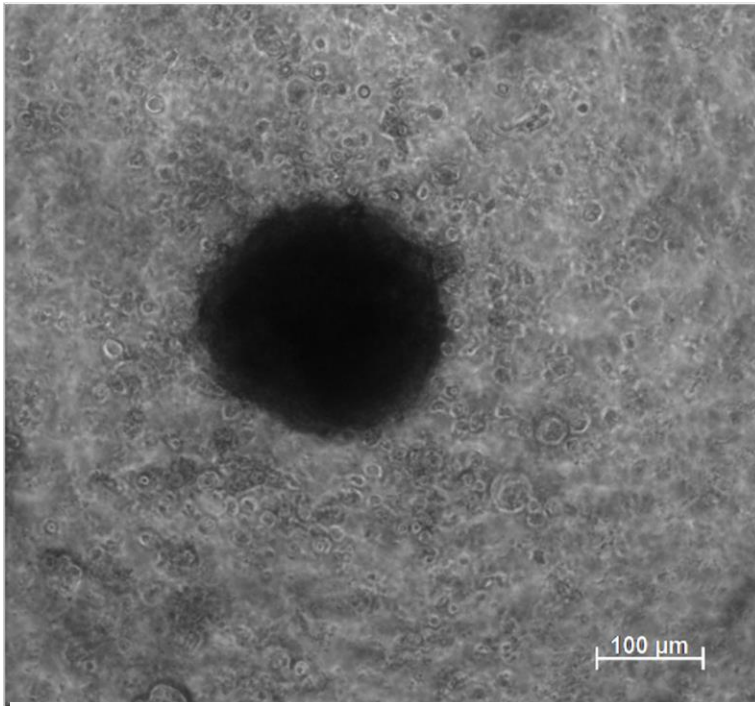


Abbildung 2: Exemplarische Darstellung eines drei Tage alten BHY-Tumorsphäroids mit einem Durchmesser von 0,231 mm.

3.2.2 HN

Die HN-Tumorsphäroide hatten den größten Durchmesser nach fünf Tagen erreicht (Abbildung 3). Im Durchschnitt lag er bei 0,192 mm (SD=0,044mm).

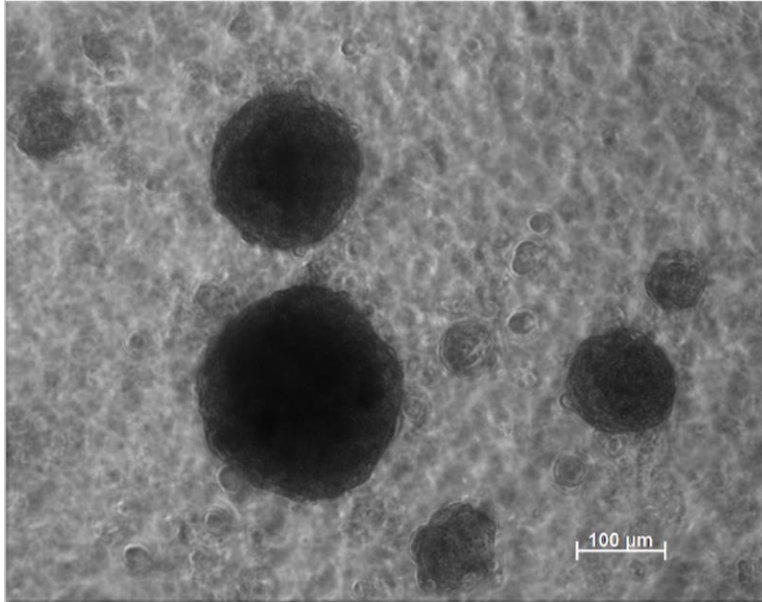


Abbildung 3: Exemplarische Darstellung fünf Tage alter HN-Tumorsphäroide, mit einem maximalen Durchmesser von 0,237 mm.

3.2.3 CAL-27

Bei der CAL-27-Zelllinie hatten die Tumorsphäroide den größten Durchmesser nach vier Tagen erreicht (Abbildung 4). Die Kompaktheit lag unter der der BHY- und HN-Tumorsphäroide. Im Durchschnitt lag der Durchmesser bei 0,397 mm (SD=0,038) an Tag vier.

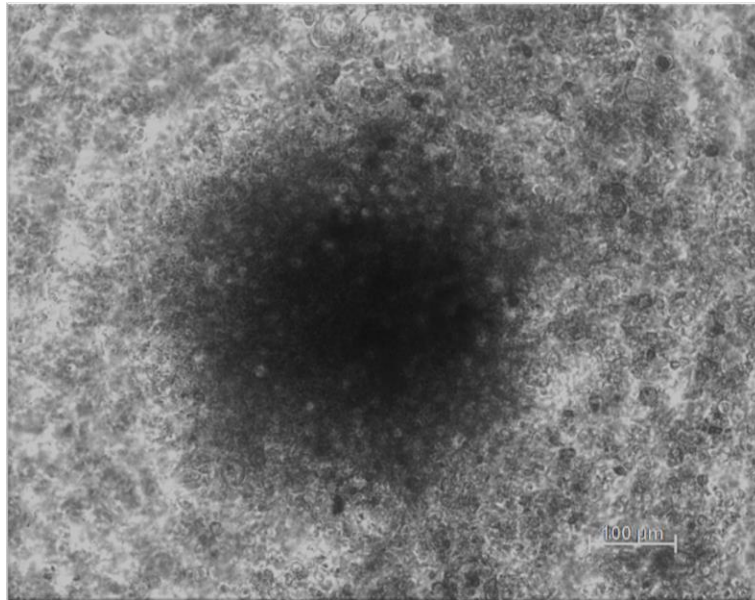


Abbildung 4: Exemplarische Darstellung eines vier Tage alten CAL-27-Tumorsphäroids mit einem Durchmesser von 0,424 mm.

3.3 Immunfluoreszenz

3.3.1 Connexin-43-Expression in der Monolayer-Zellkultur

In den Zellen der BHY-Zelllinie konnte in der Monolayer-Zellkultur keine Cx43-Expression nachgewiesen werden (Abbildung 5). HN-Zellen zeigten eine niedrige Cx43-Expression (Abbildung 6). Die höchste Cx43-Expression konnte in der CAL-27-Zelllinie nachgewiesen werden (Abbildung 7). Sowohl bei der HN- als auch bei der CAL-27-Zelllinie war die Cx43-Expression perinukleär lokalisiert.

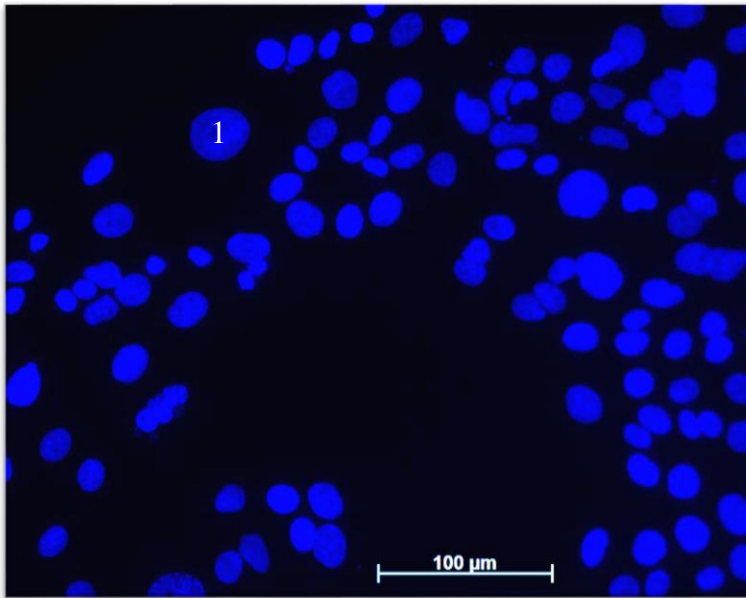


Abbildung 5: Exemplarische Darstellung der Cx43-Immunfluoreszenz der BHY-Zellen in der Monolayer-Zellkultur. DAPI gegengefärbte Nuklei (1). Originalvergrößerung x200.

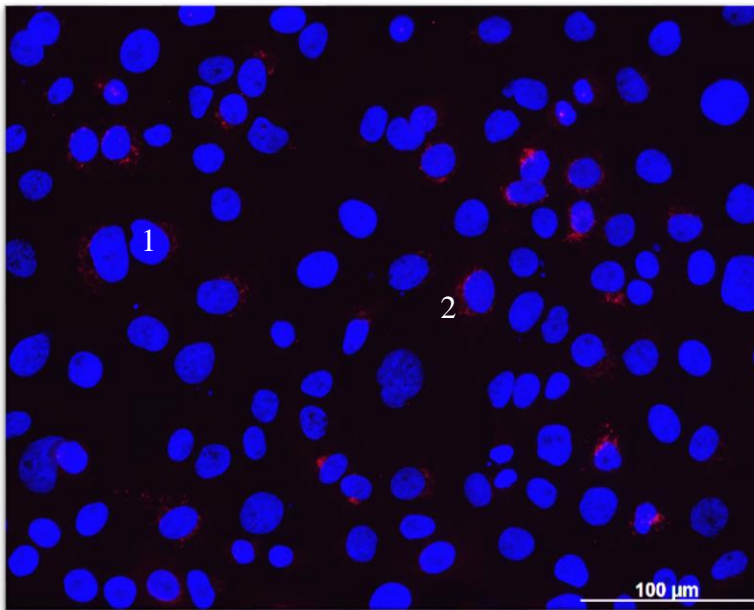


Abbildung 6: Exemplarische Darstellung der Cx43-Immunfluoreszenz der HN-Zellen in der Monolayer-Zellkultur. DAPI gegengefärbte Nuklei (1); Perinukleäre Cx43-Expression in Rot bei einigen Zellen (2). Originalvergrößerung x200.

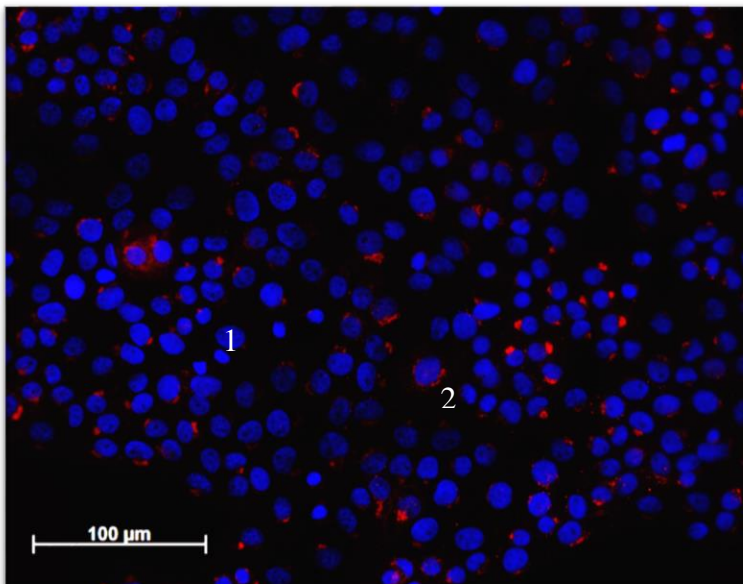


Abbildung 7: Exemplarische Darstellung der Cx43-Immunfluoreszenz der CAL-27-Zellen in der Monolayer-Zellkultur. DAPI gegengefärbte Nuklei (1); Cx43 perinukleär in Rot (2). Originalvergrößerung x200.

3.3.2 Connexin-43-Expression in den multizellulären Tumorsphäroiden

Im Gegensatz zur Monolayer-Zellkultur, in der keine Cx43-Expression in der BHY-Zelllinie nachgewiesen wurde, konnte in den BHY-Tumorsphäroiden eine geringe Expression erkannt werden (Abbildung 8). Sowohl in den HN- (Abbildung 9) als auch in den CAL-27- (Abbildung 10) Tumorsphäroiden war eine geringe Cx43-Expression nachweisbar.

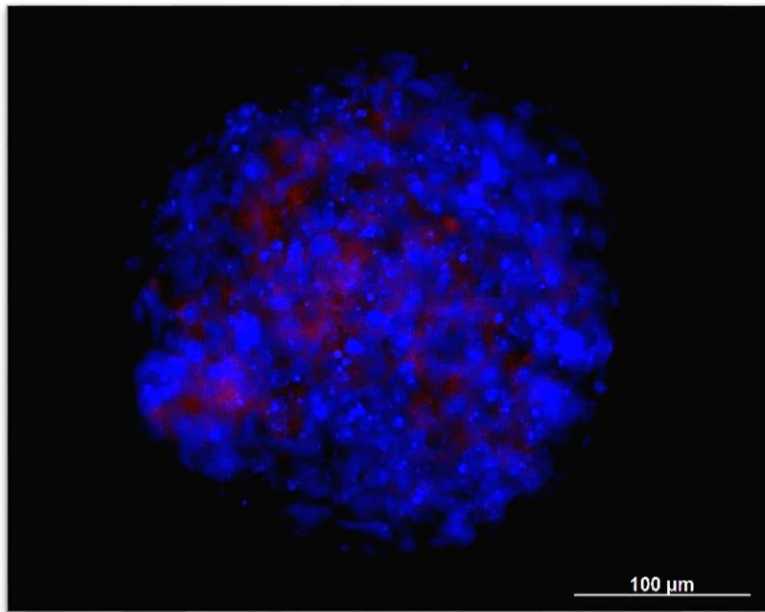


Abbildung 8: BHY-multizelluläres-Tumorsphäroid mit unklarer Färbung in Rot (Antikörper gegen Cx43). In Blau sind die DAPI gegengefärbten Nuklei zu erkennen. Originalvergrößerung x200.

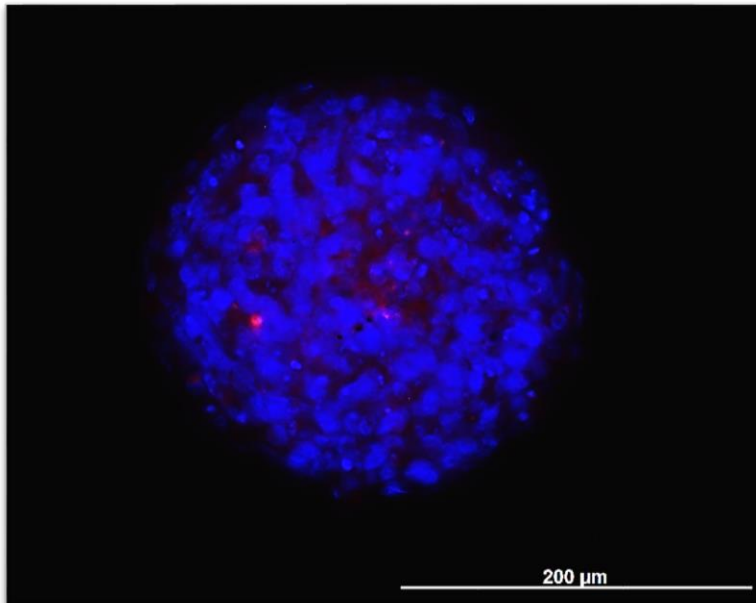


Abbildung 9: HN-multizelluläres-Tumorsphäroid mit unklarer Färbung in Rot (Antikörper gegen Cx43). In Blau sind die DAPI gegengefärbten Nuklei zu erkennen. Originalvergrößerung x200.

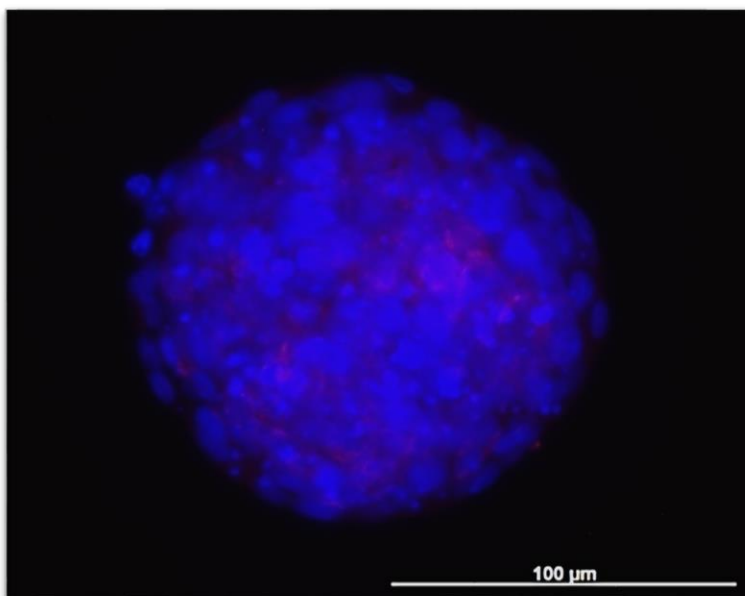


Abbildung 10: CAL-27-multizelluläres-Tumorsphäroid mit einer unklaren Färbung in Rot (Antikörper gegen Cx43). In Blau sind die DAPI gegengefärbten Nuklei zu erkennen. Originalvergrößerung x200.

3.4 Western-Blot

Das Cx43-Protein konnte mittels Western-Blot in allen drei Zelllinien, sowohl in der Monolayer-Zellkultur, als auch in den multizellulären Tumorsphäroiden, nicht nachgewiesen werden (Abbildung 11).

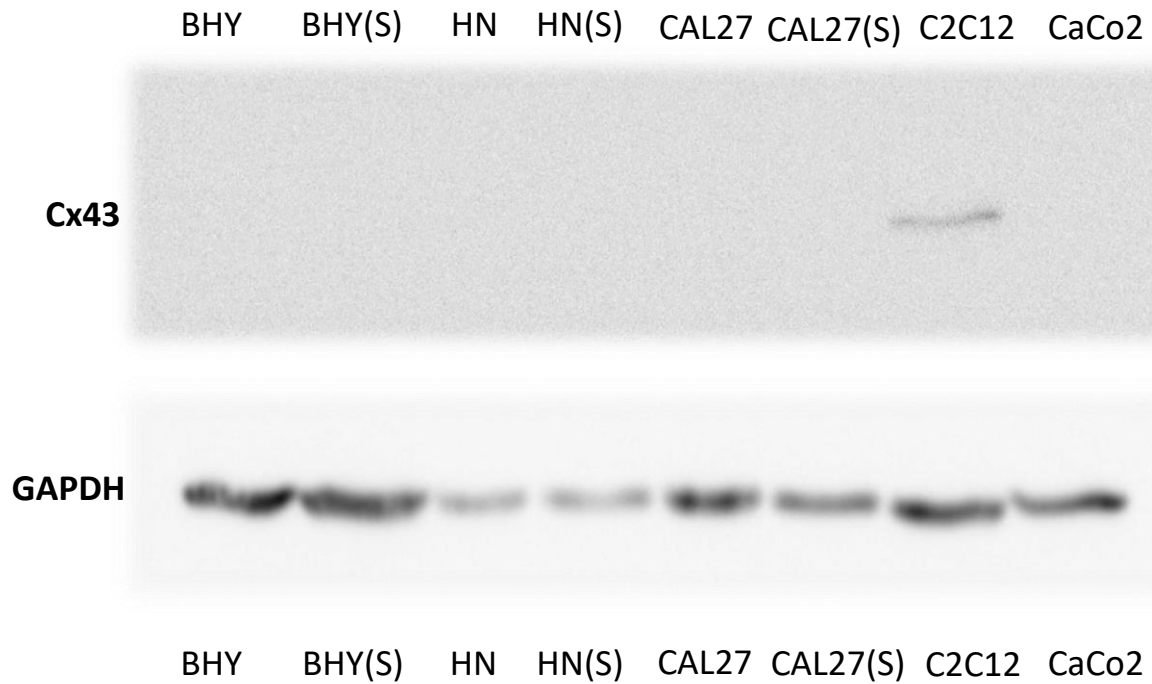


Abbildung 11: Exemplarische Darstellung der Western-Blot-Analyse. Cx43 war bei den drei Zelllinien sowohl in der Monolayer-Zellkultur, als auch in den multizellulären Tumorsphäroiden nicht nachweisbar. In der Positivkontrolle (C2C12) war eine zarte Bande zu erkennen.

3.5 Real-Time-PCR

3.5.1 Connexin-43-Expression in der Monolayer-Zellkultur

BHY zeigte in der Monolayer-Zellkultur einen 0,00461-fach höheren Cx43-mRNA-Gehalt als die Kontrollprobe GAPDH (SD=0,00117). HN zeigte in der Monolayer-Zellkultur einen 0,01156-fach höheren Cx43-mRNA-Gehalt als die Kontrollprobe GAPDH (SD=0,00389). CAL-27 zeigte in der Monolayer-Zellkultur einen 0,05037-fach höheren Cx43-mRNA-Gehalt als die Kontrollprobe GAPDH (SD=0,00849). Die Medianwerte sind in der Abbildung 12 dargestellt.

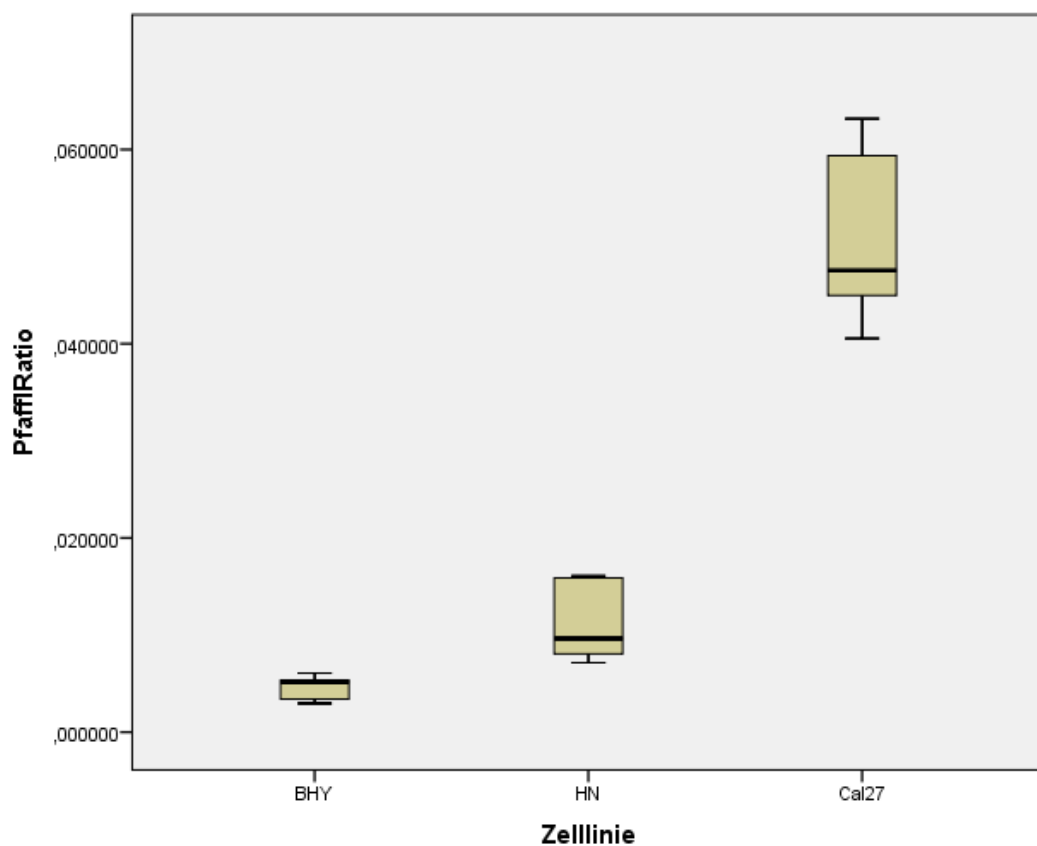


Abbildung 12: Boxplot mit den Medianwerten der Pfaffl-Ratio der Zelllinien BHY, HN und CAL-27 in der Monolayer-Zellkultur. Cx43-mRNA-Gehalt im Vergleich zu dem jeweiligen *Housekeeping*-Gen GAPDH.

Mit der *One-way*-ANOVA-Analyse konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den drei Zelllinien nachgewiesen werden ($p < 0,0001$, Tabelle 15).

Tabelle 15: Statistische Analyse für den Vergleich der Zelllinien in der Monolayer-Zellkultur.

	df	Sum Sq	Mean Sq	F Value	Pr (>F)
Gruppen_ Mono_ Test_ Zelllinie	2	0,010946	0,005473	185,5	2,53e-15
Residuals	24	0,000708	0,000030		

Da ein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden konnte, wurden die Werte zusätzlich nach der Bonferroni-Methode adjustiert. Hierfür wurden bei p-Werten unter 0,025 signifikante Unterschiede angenommen. In der Monolayer-Zellkultur ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen der BHY- und HN-Zelllinie ($p = 0,036$, Tabelle 16); zwischen BHY und CAL-27 und CAL-27 und HN waren signifikante Unterschiede nachweisbar ($p < 0,0001$ und $p < 0,0001$, Tabelle 16).

Tabelle 16: p-Werte für den statistischen Vergleich der Zelllinien in der Monolayer-Zellkultur.

	BHY	HN
HN	$p = 0,036$	-
CAL-27	$p < 0,0001$	$p < 0,0001$

3.5.2 Connexin-43-Expression in den multizellulären Tumorsphäroiden

BHY zeigte in den multizellulären Tumorsphäroiden einen 0,16771-fach höheren Cx43-mRNA-Gehalt als die Kontrollprobe GAPDH (SD=0,05952). HN zeigte in den multizellulären Tumorsphäroiden einen 0,97321-fach höheren Cx43-mRNA-Gehalt als die Kontrollprobe GAPDH (SD=0,06612). CAL-27 zeigte in den Tumorsphäroiden einen 1,31304-fach höheren Cx43-mRNA-Gehalt als die Kontrollprobe GAPDH (SD=0,20643). Die Medianwerte sind in der Abbildung 13 abgebildet.

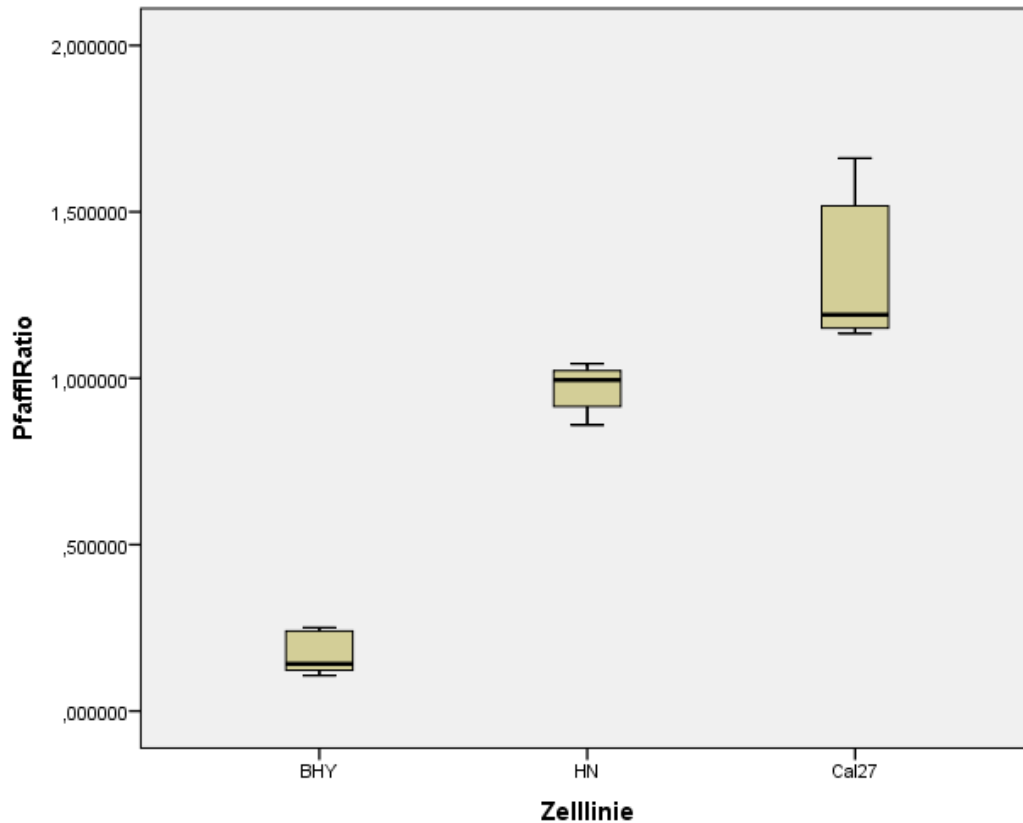


Abbildung 13: Boxplot mit den Medianwerten der Pfaffl-Ratio der Zelllinien BHY, HN und CAL-27 in den multizellulären Sphäroiden. Cx43-mRNA-Gehalt im Vergleich zu dem jeweiligen *Housekeeping*-Gen GAPDH.

Die *One-way*-ANOVA-Analyse ergab einen signifikanten Unterschied zwischen den drei verwendeten Zelllinien ($p < 0,0001$, Tabelle 17).

Tabelle 17: Statistische Analyse für den Vergleich der Zelllinien in den multizellulären Tumorsphäroiden.

	df	Sum Sq	Mean Sq	F Value	Pr (>F)
Gruppen_3D_Test_Zelllinie	2	6,228	3,1141	184,9	2.63e-15
Residuals	24	0,404	0,0168		

Da ein signifikanter Unterschied beobachtet werden konnte, wurden die Werte nach der Bonferroni-Methode adjustiert. Hierfür wurden für p-Werte unter 0,025 signifikante Unterschiede angenommen. Zwischen den drei Zelllinien konnten signifikante Unterschiede festgestellt werden, deren p-Werte in Tabelle 18 dargestellt sind.

Tabelle 18: p-Werte für den statistischen Vergleich der Zelllinien in den multizellulären Tumorsphäroiden.

	BHY	HN
HN	$p < 0,0001$	-
CAL-27	$p < 0,0001$	$p < 0,001$

4 Diskussion

Tumoren der Kopf-Hals-Region sind eine heterogene Gruppe an Neoplasien, die sich in ihrem Mutationsprofil unterscheiden (Vossen et al. 2018). Obwohl das OSCC einer klinischen Untersuchung leicht zugänglich ist und eine frühe Diagnose und Therapie möglich ist, hat sich die Mortalität in den letzten Jahren nur geringfügig verbessert (Chinn und Myers 2015; Pan et al. 2017). Die Erforschung neuer therapeutischer Ansätze ist Gegenstand aktueller Untersuchungen (Krisanaprakornkit und Iamaroon 2012). Die Metastasierung des OSCC hat einen signifikanten prognostischen Einfluss und repräsentiert das größte Hindernis der Tumorthherapie (Singh et al. 2018). Um invasiv in das umliegende Gewebe einzuwachsen und abzuwandern zu können, müssen die Tumorzellen ihren epithelialen Phänotyp hin zu einem mesenchymalen Phänotyp ändern, was als Epithelial-Mesenchymale-Transition (EMT) bezeichnet wird (Forte et al. 2017; Singh et al. 2018). Bei diesem Vorgang müssen sich die Zellen aus dem Zellverband lösen, was nur durch das Auflösen interzellulärer Verbindungen, wie beispielsweise *adherens junctions*, Desmosomen, *tight junctions*, Hemidesmosomen und auch GJ möglich ist (Banyard und Bielenberg 2015).

Unabhängig von ihrer Rolle als Bausteine der GJ-Kanäle, können Connexine das Tumorzellwachstum beeinflussen (Zhang et al. 2003; Jiang und Penuela 2016). In Connexonen haben Connexine andere Funktionen als in komplett zusammengebauten GJ (Schalper et al. 2014). Connexine können GJ zwischen den Tumorzellen und/oder zwischen verschiedenen Zelltypen innerhalb der Mikroumgebung des Tumors aufbauen, wodurch die Tumorprogression unterschiedlich beeinflusst werden kann (Gleisner et al. 2017). Die aktuelle Literatur deutet darauf hin, dass die Connexin-Expression in Tumorzellen die Tumorprogression sowohl fördern, als auch unterbrechen kann, je nachdem welche Zelltypen in der Mikroumgebung des Tumors involviert sind (Gleisner et al. 2017). GJIC zwischen Tumor- und Immunzellen können eine Reaktion gegen den Tumor fördern, während Interaktionen mit Stromazellen das Tumorzellwachstum entweder hemmen oder verstärken können (Gleisner et al. 2017).

In fortgeschrittenen Tumorstadien können Connexine die Tumorprogression fördern (Gleisner et al. 2017). Heterotypisch aufgebaute GJ zwischen Tumorzellen und Endothelzellen können Invasion und Metastasierung unterstützen (Gleisner et al. 2017). Beispielsweise wurde von Villares et al. (2009) gezeigt, dass Cx43 im malignen Melanom die Zell-Diapyknose und Bindung zwischen Tumorzelle und Endothelzelle vermitteln kann (Villares

et al. 2009). Die Cx43 bedingte GJIC fördert Migration, Invasion und hämatogene Metastasierung zwischen Tumorzellen des Mammakarzinoms und Endothelzellen (Gleisner et al. 2017). GJIC zwischen Tumorzellen und Immunzellen ermöglichen eine Reihe von interzellulären Interaktionen, die das Tumorzellwachstum einschränken können (Gleisner et al. 2017). Interaktionen zwischen Tumorzellen und anderen Stromazellen, wie beispielsweise Endothelzellen, mesenchymalen Stammzellen oder Osteoblasten können die Tumorprogression inhibieren (Gleisner et al. 2017).

Die Literatur zeigt heterogene Ergebnisse über die Assoziation zwischen Cx43-Expression und verschiedenen Tumorarten (Liang et al. 2010; Benko et al. 2011; Sirnes et al. 2012; Teleki et al. 2014; Aasen et al. 2017). In einigen Untersuchungen korreliert eine erhöhte Cx43-Expression mit einer signifikant besseren Prognose (Aasen et al. 2017), beispielsweise im Prostata- (Benko et al. 2011), Pankreas- (Liang et al. 2010), Mamma- (Teleki et al. 2014) und Kolorektalen-Karzinom (Sirnes et al. 2012). Im Gegensatz dazu, wurde in mehreren Studien gezeigt, dass eine erhöhte Cx43-Expression mit einer schlechteren Prognose oder einer verkürzten Überlebenszeit korreliert. Beispielsweise wurde dies für Cx43 im Ösophaguskarzinom (Tanaka et al. 2016) und in urothelialen Blasenkarzinomen (Poyet et al. 2015) gezeigt. Spezifisch bei Karzinomen der Kopf-Hals Region ergab die Untersuchung der Expression und Funktion des Cx43 teilweise widersprüchliche Ergebnisse (Sun et al. 2004; Frank et al. 2006; Wang et al. 2013; Brockmeyer et al. 2014; Brockmeyer et al. 2015; Dános et al. 2016). Die Heterogenität der unterschiedlichen Ergebnissen könnte auch dadurch erklärt werden, dass Connexine nicht nur im Tumor, sondern auch in der Tumormikroumgebung (TME) exprimiert werden (Aasen et al. 2017).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, verschiedene humane orale Plattenepithelkarzinom-Zelllinien hinsichtlich ihrer Cx43-Expression zu charakterisieren, um im Anschluss daran weiterführende funktionelle Untersuchungen durchführen zu können. Die Cx43-Expression wurde sowohl in der Monolayer-Zellkultur, als auch in multizellulären Tumorsphäroiden auf Gen- und Proteinebene analysiert. Ein dreidimensionales Zellkulturmodell, in Form von multizellulären Tumorsphäroiden, gilt als wichtiges Werkzeug der Tumorforschung (Friedrich et al. 2009; Metzger et al. 2011; Adcock 2015), mit der die komplexen Vorgänge innerhalb eines Tumors besser abgebildet werden können (Santini und Rainaldi 1999; Ivascu und Kubbies 2006; Metzger et al. 2011).

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass sich die Cx43-Expression zwischen den verwendeten Zelllinien unterscheidet, obwohl es bei allen drei Zelllinien um Tumorzellen des oralen

Plattenepithelkarzinoms handelt. Diese Daten unterstützen die eingangs vorgestellte Meinung, dass Tumoren der Kopf-Hals-Region eine heterogene Gruppe an Neoplasien ist (Vossen et al. 2018). Zusätzlich zeigte sich eine positive Korrelation zwischen Proliferationsrate und Cx43-Expression. Die Zelllinie CAL-27, mit der höchsten Proliferationsrate, zeigte in der Monolayer-Zellkultur die höchste Cx43-Expression, sowohl auf mRNA-Level, als auch auf der Proteinebene.

Die langsam wachsende Zelllinie BHY zeigte insgesamt die niedrigste Cx43-Expression auf mRNA-Level; auf Proteinebene konnte in der Monolayer-Zellkultur kein Cx43 nachgewiesen werden. Die mäßig dynamisch wachsende Zelllinie HN, Tumorzellen einer lokalen Lymphknotenmetastase, zeigte sowohl auf der Gen- als auch auf der Proteinebene in der Monolayer-Zellkultur eine niedrige Cx43-Expression. Die schnell wachsende Zelllinie CAL-27 zeigte unter allen verwendeten Zelllinien die insgesamt höchste Cx43-Expression sowohl auf der Gen-, als auch auf der Proteinebene. Im Vergleich zu der Monolayer-Zellkultur kam es in den multizellulären Tumorsphäroiden in allen drei verwendeten Zelllinien auf der mRNA-Ebene zu einem signifikanten Anstieg der Cx43-Expression. Das Cx43-Protein konnte in dieser Studie in den Zelllinien HN und CAL-27 hauptsächlich intrazellulär nachgewiesen werden, was auf eine zusätzliche intrazelluläre Funktion neben dem Aufbau der GJIC hindeutet.

Die Ergebnisse mehrerer Studien können mit unserer Arbeit verglichen werden. Frank et al. (2006) untersuchten die Cx43-Expression in vier Plattenepithelkarzinom Zelllinien der Kopf-Hals-Region mit Hilfe der Immunfluoreszenz (Frank et al. 2006). Mit einem molekularen Fluoreszenzfarbstoff bestimmten sie die GJIC Aktivität der Zellen. Die Cx43-Expression korrelierte mit der GJIC (Frank et al. 2006). Die Zelllinien TU167, MSK922 und MDA1483 zeigten keine Cx43-Expression (Frank et al. 2006), wie die in unserer Arbeit verwendete langsam wachsende Zelllinie BHY. Vermutlich hat die langsam wachsende Zelllinie BHY keine GJIC Aktivität. Die Zelllinien TU159 und MDA686LN der Studie von Frank et al. (2006) zeigten sowohl eine positive GJIC Aktivität, als auch eine membranöse Cx43-Expression (Frank et al. 2006). Bei der mäßig dynamisch wachsende Zelllinie HN und der schnell wachsenden Zelllinie CAL-27 unserer Untersuchung war eine Cx43-Expression zwar in der Monolayer-Zellkultur erkennbar, diese jedoch nur zytoplasmatisch lokalisiert. Eine Bestimmung der GJIC Aktivität wäre in der aktuellen Studie sinnvoll gewesen, um den verschiedenen Zelllinien spezifischer zu charakterisieren. Die Proliferationsrate wurde von Frank et al. (2006) nicht erforscht. Bei physiologischen oralen Epithelzellen konnten Frank et al. (2006) eine Cx43-Expression nachweisen (Frank et al. 2006). Die Autoren postulierten,

dass Tumorzellen der Kopf-Hals-Region mit vorhandener GJIC-Aktivität, eine höhere Ansprechrate gegenüber Apoptose-induzierenden Therapien, in Form einer Strahlen- und/oder Chemotherapie, haben könnten (Frank et al. 2006). Schneider et al. (2002) haben die Cx43-Expression in 60 Tumorgewebeproben von Patienten mit Larynxkarzinom mit Hilfe der Immunfluoreszenz untersucht und mit normaler Mukosa und dysplastischem Gewebe verglichen (Schneider et al. 2002). Dabei konnten sie ein inhomogenes Cx43-Expressionsmuster im Tumorgewebe nachweisen (Schneider et al. 2002). Dieses Ergebnis ist mit den Ergebnissen der Tumorsphäroide der aktuellen Studie vergleichbar. Die Immunfluoreszenz zeigte bei den multizellulären Tumorsphäroiden eine unklare Cx43-Expression. In der Studie von Schneider et al. (2002) zeigten Proben aus dysplastischem Gewebe eine ähnliche Connexin-Expression im Vergleich zu denen aus physiologischer Larynx Mukosa (Schneider et al. 2002). Bei diesen Proben war Cx43 überwiegend in den Basal-, Parabasal- und in den unteren Zwischenschichten nachweisbar. Die Autoren vermuten, dass es bei dysplastischen Geweben zu einer höheren Cx43-Expression kommt (Schneider et al. 2002). Sun et al. (2004) haben die Gewebeproben von Patienten mit Larynxkarzinom immunhistochemisch analysiert und mit der Expression in physiologischem Epithel der Tumorumgebung verglichen (Sun et al. 2004). Dabei konnte kein signifikant prognostischer Einfluss nachgewiesen werden. Zellen des Larynxkarzinoms zeigten eine Inaktivierung des Cx43-Gens (GJA1) und eine reduzierte Expression des Cx43-Proteins (Sun et al. 2004). Die mäßig dynamisch wachsende Zelllinie HN der aktuellen Studie, zeigt auch eine niedrige Cx43-Protein-Expression in der Immunfluoreszenz, was mit der Studie von Sun et al. (2004) vergleichbar ist.

In einer Studie von Brockmeyer et al. (2014) wurden die Gewebeproben von 35 Patienten mit primärem oralem Plattenepithelkarzinom (OSCC) hinsichtlich ihrer Connexin-26-, Cx43- und Connexin-45-Expression immunhistochemisch evaluiert und mit der Prognose der Patienten korreliert (Brockmeyer et al. 2014). Zusätzlich wurde die Untersuchung auf tumorfreie orale Mukosa und, wenn vorhanden, Lymphknotenmetastasen ausgeweitet (Brockmeyer et al. 2014). Bei der oralen Mukosa konnte eine Cx43-Expression überwiegend in der Zellmembran der Epithelzellen des Stratum Spinosum nachgewiesen werden. Beim primären OSCC kam es im Vergleich zur oralen Mukosa zu einem Abbau der membranösen und einer Zunahme der zytoplasmatischen Cx43-Expression (Brockmeyer et al. 2014). In der aktuellen Untersuchung konnte in den Monolayer-Zellkulturen der Zelllinien HN und CAL-27 auch eine zytoplasmatische Cx43-Expression nachgewiesen werden. Dános et al. (2016) untersuchten die Cx43-Expression in den Gewebeproben von Patienten mit Plattenepithelkarzinom der Kopf-Hals-Region (HNSCC) immunhistochemisch und verglichen

diese mit physiologischer oraler Mukosa (Dános et al. 2016). Bei den Epithelzellen der Mundschleimhaut und einigen HNSCC Proben konnten Cx43-Plaques in der Zellmembran nachgewiesen werden. Auch in dieser Untersuchung zeigten die Proben des HNSCC häufiger zytoplasmatische Signale (Dános et al. 2016). Brockmeyer et al. (2014) postulierten, dass zytoplasmatisches Cx43 als „Lager“ dienen könnte und nur das membranös lokalisierte Cx43 bei der Bildung der GJ bzw. der GJIC mit prognostischen Relevanz beteiligt ist (Brockmeyer et al. 2014). Dános et al. (2016) fassten zusammen, dass eine höhere Cx43-Expression mit einer besseren Prognose und eine niedrige Cx43-Expression mit einer schlechteren Prognose assoziiert ist (Dános et al. 2016). In der Untersuchung von Brockmeyer et al. (2014) war dagegen eine höhere membranöse Cx43-Expression signifikant mit einer verkürzten Überlebenszeit der Patienten assoziiert (Brockmeyer et al. 2014).

In einer Pilot-Studie von Brockmeyer et al. (2015), in der die Expression der Connexine 26, 43 und 45 auf mRNA-Level mit Hilfe der Real-Time-PCR in den Gewebeproben von Patienten mit OSCC nachgewiesen und mit oraler Mukosa verglichen wurde, zeigte sich bei dem primären OSCC eine geringgradig erhöhte Cx43-Genexpression im Vergleich zur oralen Mukosa (Brockmeyer et al. 2015). Die Daten der Real-Time-PCR-Analyse der aktuellen Untersuchung zeigen eine signifikant erhöhte Cx43-Expression in den multizellulären Tumorsphäroiden der Zelllinien HN und CAL-27, im Vergleich zur Monolayer-Zellkultur.

Wang et al. (2013) haben die zwei OSCC-Zelllinien SCC9 und Tca8113 mit Hilfe einer Real-Time-PCR, eines Western-Blots und einer Immunfluoreszenz Analyse untersucht und mit physiologischen oralen Epithelzellen verglichen. Unter dem Gesichtspunkt, dass bei OSCC-Zellen eine fehlerhafte GJIC vorliegt, haben die Autoren die antitumorale Wirkung von All-Trans-Retinsäure (ATRA) untersucht. Sie postulierten, dass eine höhere Cx43-Expression mit einer antitumoralen Wirkung in Verbindung steht. ATRA konnte eine Cx43-Expression induzieren und die GJIC fördern. Die Autoren zeigten, dass bei physiologischen oralen Epithelzellen eine gute GJIC vorliegt und dass die GJIC und das Cx43-Level in den OSCC-Zellen reduziert ist (Wang et al. 2013). Die Ergebnisse von Wang et al. (2013) in den unbehandelten Zellen sind vergleichbar mit den Ergebnissen unserer Studie. Die Real-Time-PCR-Daten der Zelllinien SCC9 und Tca8113 zeigen eine niedrige Cx43-Expression, wie bei den Zelllinien HN und CAL-27 in Monolayer-Zellkultur unserer Untersuchung. Mit Hilfe einer Western-Blot-Analyse zeigten Wang et al. (2013) in beiden Zelllinien ein niedrigeres Cx43-Protein-Level, im Vergleich zu den physiologischen Epithelzellen (Wang et al.

2013). In der Immunfluoreszenz zeigte die unbehandelte Zelllinie SCC9 ein ähnliches Verteilungsmuster wie die Zelllinie HN in der Monolayer-Zellkultur unserer Untersuchung (Wang et al. 2013).

Der Cx43-Metabolismus sowie die Kanalfunktionen der GJ werden vor allem über posttranslationale Modifikationen am C-terminalen Ende des Proteins reguliert (Laird et al. 2015). In diesem Zusammenhang spielt besonders die Phosphorylierung eine entscheidende Rolle (Solan und Lampe 2014; Epifantseva und Shaw 2018), die auch jeden Schritt des Cx43-Lebenszyklus reguliert (Solan und Lampe 2014). Zusätzlich zu seiner Funktion in den GJ-Kanälen gibt es Hinweise dafür, dass die Cx43-mRNA eine alternative Translation durchläuft, wodurch mehrere verkürzte Isoformen entstehen (Fu et al. 2017). Unter diesen ist besonders die GJA1-20k-Isoform untersucht worden (Fu et al. 2017). Sie befindet sich in verschiedenen Zellkompartimenten und im Nukleus (Esseltine und Laird 2016) und es wurde gezeigt, dass sie als Transkriptionsfaktor bei der Regulation von N-Cadherin eine entscheidende Rolle spielt (Kotini et al. 2018). Das N-cadherin Protein ist erforderlich für die Zellmigration (Kotini et al. 2018). Die Epithelial-Mesenchymale-Transition (EMT) spielt eine wichtige Rolle während Tumorinvasion und -metastasierung (Krisanaprakornkit und Iamaroon 2012). Während der EMT kommt es zu einem E-cadherin/N-cadherin *switch*, mit Abnahme der E-cadherin- und Zunahme der N-cadherin-Expression (Krisanaprakornkit und Iamaroon 2012). Zu Beginn der Invasion und Initiierung der Metastasierung müssen interzelluläre Verbindungen abgebaut werden, wodurch sich die Tumorzellen aus dem Zellverband lösen können (Krisanaprakornkit und Iamaroon 2012).

In der aktuellen Studie konnte kein Cx43-Protein mit Hilfe der Western-Blot-Technik nachgewiesen werden. Der Grund dafür ist unklar. Möglicherweise hatte der verwendete Antikörper an eine verkürzte Isoform gebunden, wodurch keine Expression bei 43 kD nachweisbar wäre.

Zusammenfassend konnten wir in der vorliegenden Studie zeigen, dass eine unterschiedliche Cx43-Expression zwischen den drei OSCC-Zelllinien vorliegt, die aus verschiedenen Lokalisationen stammen und unterschiedliche Proliferationsraten haben. Das deutet darauf hin, dass es bei manchen Zellklonen bereits zu einem Verlust des Cx43 gekommen ist und bei anderen nicht. Darüber hinaus scheinen die Regulation der GJIC sowie weitere intrazelluläre Funktionen des Cx43 stark abhängig zu sein von der Tumorart und dem Tumorstadium. Die genauen Mechanismen sind bisher nicht eindeutig verstanden. Im Verlauf der Tumorprogression und Metastasierung kommt es wahrscheinlich zu einem Verlust der membranösen

Connexin-Expression sowie zu einem Abbau der GJIC. Erste Hinweise deuten darauf hin, dass diese Modifikation der Connexin-Expression im Rahmen einer Epithelial-Mesenchymalen-Transition stattfindet. Weitere funktionelle Untersuchungen sind jedoch erforderlich, um die genauen Zusammenhänge besser zu verstehen. Ein besseres Verständnis würde möglicherweise wichtig sein, um in Zukunft neuartige Therapiestrategien zu entwickeln.

5 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Studie war es, die drei oralen Plattenepithelkarzinom-Zelllinien BHY, HN und CAL-27 hinsichtlich ihrer Cx43-Expression zu charakterisieren. Dabei sollte zunächst der Frage nachgegangen werden, ob eine unterschiedliche Cx43-Expression zwischen den Zelllinien vorliegt und ob ein Unterschied zwischen der Monolayer-Zellkultur und den Tumorsphäroiden vorhanden ist. Zu diesem Zweck wurden verschiedene Analysen durchgeführt. Um die Expression auf der Proteinebene zu untersuchen, wurden eine Immunfluoreszenz- und Western-Blot-Analyse durchgeführt. Das Cx43-mRNA-Level wurde mit Hilfe der Real-Time-PCR untersucht.

Sowohl auf Protein- als auch auf der Genebene ergab sich ein unterschiedliches Cx43-Expressionslevel sowohl in der Monolayer-Zellkultur als auch in den Tumorsphäroiden. BHY, die am langsamsten wachsende Zelllinie, zeigte in der Monolayer-Zellkultur keine Cx43-Protein-Expression und eine sehr niedrige Cx43-Genexpression. HN, die mäßig dynamisch wachsende und CAL-27, die am schnellsten wachsende der drei Zelllinien, zeigten im Monolayer eine Cx43-Protein-Expression, die lediglich mit der Immunfluoreszenz nachgewiesen werden konnte. Warum keine Cx43-Expression mit Hilfe der Western-Blot-Analyse nachgewiesen werden konnte, bleibt bisher unklar. Auf Genebene ergab sich eine signifikant differentielle Cx43-Genexpression in der Monolayer-Zellkultur zwischen den verwendeten Zelllinien. In den multizellulären Tumorsphäroiden konnte das Cx43-Protein in den drei Zelllinien nicht nachgewiesen werden. Auch hier ist unklar warum. Es konnte eine signifikant differentielle Cx43-Genexpression zwischen den drei Zelllinien und innerhalb der Zelllinien zwischen der Monolayer-Zellkultur und den Tumorsphäroiden gezeigt werden.

Die Cx43-Expression und die damit verbundene GJIC scheinen sich je nach Tumorstadium, Tumorart, Isoform und Mikroumgebung zu verändern. Die Funktion des Cx43 geht höchst wahrscheinlich weit über seine Funktion als Membranprotein hinaus (Ribeiro-Rodrigues et al. 2017). Cx43 interagiert über sein C-terminales Ende mit verschiedenen Interaktionspartnern, die seine Bildung, seinen Transport innerhalb der Zelle in die korrekte Subdomäne der Plasmamembran und den Aufbau und Abbau in der Plasmamembran regulieren (Epifantseva und Shaw 2018). Die Regulierung der Cx43-Expression und der GJIC könnte im Rahmen einer Epithelial-Mesenchymalen-Transition stattfinden. Weitere funktionelle Untersuchungen sind erforderlich, um die genaueren Hintergründe besser zu verstehen und um in Zukunft möglicherweise neuartige Therapiestrategien zu entwickeln.

6 Literaturverzeichnis

- Aasen T, Mesnil M, Naus CC, Lampe PD, Laird DW (2017): Gap junctions and cancer: communicating for 50 years. *Nat Rev Cancer* 16, 775–788
- Adcock AF (2015): Three-Dimensional (3D) Cell Cultures in Cell-based Assays for in-vitro Evaluation of Anticancer Drugs. *J Anal Bioanal Tech* 06, 1–12
- Akar FG, Nass RD, Hahn S, Cingolani E, Shah M, Hesketh GG, DiSilvestre D, Tunin RS, Kass D a, Tomaselli GF (2007): Dynamic changes in conduction velocity and gap junction properties during development of pacing-induced heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293, 1223–1230
- Argiris A, Eng C (2003): Epidemiology, staging, and screening of head and neck cancer. *Cancer Treat Res* 114, 15–60
- Argiris A, Karamouzis M V, Raben D, Ferris RL (2008): Argiris, 2004-Head and neck cancer. *Lancet* 371, 1695–1709
- Asadzadeh Vostakolaei F, Karim-Kos HE, Janssen-Heijnen MLG, Visser O, Verbeek ALM, Kiemeny LALM (2011): The validity of the mortality to incidence ratio as a proxy for site-specific cancer survival. *Eur J Public Health* 21, 573–577
- Avanzo JL, Mesnil M, Hernandez-Blazquez FJ, Mackowiak II, Mori CMC, da Silva TC, Oloris SCS, Garate AP, Massironi SMG, Yamasaki H, Dagli MLZ (2004): Increased susceptibility to urethane-induced lung tumors in mice with decreased expression of connexin43. *Carcinogenesis* 25, 1973–1982
- Banyard J, Bielenberg DR (2015): The role of EMT and MET in cancer dissemination. *Connect Tissue Res* 56, 403–413
- Basheer WA, Harris BS, Mentrup HL, Abreha M, Thames EL, Lea JB, Swing DA, Copeland NG, Jenkins NA, Price RL, Matesic LE (2015): Cardiomyocyte-specific overexpression of the ubiquitin ligase Wwp1 contributes to reduction in Connexin 43 and arrhythmogenesis. *J Mol Cell Cardiol* 88, 1–13
- Batra N, Riquelme MA, Burra S, Jiang JX (2014): 14-3-3 Facilitates Plasma Membrane Delivery and Function of Mechanosensitive Connexin 43 Hemichannels. *J Cell Sci* 127, 137–146
- Baumann E, Koller M, Wiltfang J, Wenz HJ, Möller B, Hertrampf K (2016): Challenges of early detection of oral cancer: Raising awareness as a first step to successful campaigning. *Health Educ Res* 31, 136–145
- Beardslee MA, Lerner DL, Tadros PN, Laing JG, Beyer EC, Yamada KA, Kleber AG, Schuessler RB, Saffitz JE (2000): Dephosphorylation and intracellular redistribution of ventricular connexin43 during electrical uncoupling induced by ischemia. *Circ Res* 87, 656–662
- Belousov AB, Fontes JD, Freitas-Andrade M, Naus CC (2017): Gap junctions and hemichannels: Communicating cell death in neurodevelopment and disease. *BMC Cell Biol* 18, 1–11
- Benko G, Spajić B, Demirović A, Štimac G, Krušlin B, Tomas D (2011): Prognostic value of connexin43 expression in patients with clinically localized prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 14, 90–95
- Berthoud VM, Ngezahayo A (2017): Focus on lens connexins. *BMC Cell Biol* 18, 1–10
- Blatt S, Krüger M, Ziebart T, Sagheb K, Schiegnitz E, Goetze E, Al-Nawas B, Pabst AM

- (2017): Biomarkers in diagnosis and therapy of oral squamous cell carcinoma: A review of the literature. *J Craniomaxillofac Surg* 45, 722–730
- Blot WJ, McLaughlin JK, Winn DM, Austin DF, Greenberg RS, Preston-Martin S, Bernstein L, Schoenberg JB, Stemhagen A, Fraumeni JFJ (1988): Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. *Cancer Res* 48, 3282–3287
- Bovolenta P, Esteve P, Ruiz JM, Cisneros E, Lopez-Rios J (2008): Beyond Wnt inhibition: new functions of secreted Frizzled-related proteins in development and disease. *J Cell Sci* 121, 737–746
- Brockmeyer P, Jung K, Perske C, Schliephake H, Hemmerlein B (2014): Membrane connexin 43 acts as an independent prognostic marker in oral squamous cell carcinoma. *Int J Oncol* 45, 273–281
- Brockmeyer P, Hemmerlein B, Jung K, Fialka F, Brodmann T, Gruber R, Schliephake H, Kramer F (2015): Connexin subtype expression during oral carcinogenesis: A pilot study in patients with oral squamous cell carcinoma. *Mol Clin Oncol* 4, 298–302
- Brown J, Bekiroglu F, Shaw R (2010): Indications for the scapular flap in reconstructions of the head and neck. *Br J Oral Maxillofac Surg* 48, 331–337
- Bukauskas FF, Jordan K, Bukauskiene a, Bennett M V, Lampe PD, Laird DW, Verselis VK (2000): Clustering of connexin 43-enhanced green fluorescent protein gap junction channels and functional coupling in living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 2556–2561
- Cai Z, Shi X, Gao Y, Wei M, Wang C, Yu G (2008): beta-catenin expression pattern in primary oral squamous cell carcinoma. *Chin Med J (Engl)* 121, 1866–1870
- Carystinos GD, Kandouz M, Alaoui-Jamali M a, 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
- Chinn SB, Myers JN (2015): Oral Cavity Carcinoma: Current Management, Controversies, and Future Directions. *J Clin Oncol* 33, 3269–3276
- Cooper CD, Lampe PD (2002): Casein kinase 1 regulates connexin-43 gap junction assembly. *J Biol Chem* 277, 44962–44968
- Cronier L, Crespin S, Strale P-O, Defamie N, Mesnil M (2009): Gap junctions and cancer: new functions for an old story. *Antioxid Redox Signal* 11, 323–338
- D'hondt C, Iyyathurai J, Wang N, Gourdie RG, Himpens B, Leybaert L, Bultynck G (2013): Negatively charged residues (Asp378 and Asp379) in the last ten amino acids of the C-terminal tail of Cx43 hemichannels are essential for loop/tail interactions. *Biochem Biophys Res Commun* 432, 707–712
- Dalianis T (2014): Human papillomavirus and oropharyngeal cancer, the epidemics, and significance of additional clinical biomarkers for prediction of response to therapy (review). *Int J Oncol* 45, 1799–1805
- Dános K, Brauswetter D, Birtalan E, Pató A, Bencsik G, Krenács T, Peták I, Tamás L (2016): The Potential Prognostic Value of Connexin 43 Expression in Head and Neck Squamous Cell Carcinomas. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 24, 476–481
- Dissanayaka WL, Pitiyage G, Kumarasiri PVR, Liyanage RLPR, Dias KD, Tilakaratne WM (2012): Clinical and histopathologic parameters in survival of oral squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 113, 518–525

- Dowsett M, Nielsen TO, A'Hern R, Bartlett J, Coombes RC, Cuzick J, Ellis M, Henry NL, Hugh JC, Lively T, et al. (2011): Assessment of Ki67 in Breast Cancer: Recommendations from the international Ki67 in breast cancer working Group. *J Natl Cancer Inst* 103, 1656–1664
- Duffy HS, Sorgen PL, Girvin ME, O'Donnell P, Coombs W, Taffet SM, Delmar M, Spray DC (2002): pH-dependent intramolecular binding and structure involving Cx43 cytoplasmic domains. *J Biol Chem* 277, 36706–36714
- Dumache R (2017): Early Diagnosis of Oral Squamous Cell Carcinoma by Salivary microRNAs. *Clin Lab* 63, 1771–1776
- Ek-Vitorín JF, Calero G, Morley GE, Coombs W, Taffet SM, Delmar M (1996): pH regulation of connexin43: Molecular analysis of the gating particle. *Biophys J* 71, 1273–1284
- Elzarrad MK, Haroon A, Willecke K, Dobrowolski R, Gillespie MN, Al-Mehdi A-B (2008): Connexin-43 upregulation in micrometastases and tumor vasculature and its role in tumor cell attachment to pulmonary endothelium. *BMC Med* 6, 1–18
- Epifantseva I, Shaw RM (2018): Intracellular trafficking pathways of Cx43 gap junction channels. *Biochim Biophys Acta Biomembr* 1860, 40–47
- Erdem NF, Carlson ER, Gerard DA, Ichiki AT (2007): Characterization of 3 Oral Squamous Cell Carcinoma Cell Lines With Different Invasion and/or Metastatic Potentials. *J Oral Maxillofac Surg* 65, 1725–1733
- Esseltine JL, Laird DW (2016): Next-Generation Connexin and Pannexin Cell Biology. *Trends Cell Biol* 26, 944–955
- Falk MM (2000): Biosynthesis and structural composition of gap junction intercellular membrane channels. *Eur J Cell Biol* 79, 564–574
- Falk MM, Kells RM, Berthoud VM (2014): Degradation of connexins and gap junctions. *FEBS Lett* 588, 1221–1229
- Fallon RF, Goodenough DA (1981): Five-hour half-life of mouse liver gap-junction protein. *J Cell Biol* 90, 521–526
- Ferris RL, Blumenschein GJ, Fayette J, Guigay J, Colevas AD, Licitra L, Harrington K, Kasper S, Vokes EE, Even C, et al. (2016): Nivolumab for Recurrent Squamous-Cell Carcinoma of the Head and Neck. *N Engl J Med* 375, 1856–1867
- Fishman GI, Eddy RL, Shows TB, Rosenthal L, Leinwand LA (1991): The human connexin gene family of gap junction proteins: Distinct chromosomal locations but similar structures. *Genomics* 10, 250–256
- Fong JT, Kells RM, Gumpert AM, Marzillier JY, Davidson MW, Falk MM (2012): Internalized gap junctions are degraded by autophagy. *Autophagy* 8, 794–811
- Forte E, Chimenti I, Rosa P, Angelini F, Pagano F, Calogero A, Giacomello A, Messina E (2017): EMT/MET at the Crossroad of Stemness, Regeneration and Oncogenesis: The Ying-Yang Equilibrium Recapitulated in Cell Spheroids. *Cancers (Basel)* 9, 98
- Frank DK, Szymkowiak B, Hughes CA (2006): Connexin expression and gap junctional intercellular communication in human squamous cell carcinoma of the head and neck. *Otolaryngol Head Neck Surg* 135, 736–743
- Freeman AK, Morrison DK (2011): 14-3-3 Proteins: diverse functions in cell proliferation and cancer progression. *Semin Cell Dev Biol* 22, 681–687

- Friedrich J, Seidel C, Ebner R, Kunz-Schughart LA (2009): Spheroid-based drug screen: Considerations and practical approach. *Nat Protoc* 4, 309–324
- Fu TS, Foreman A, Goldstein DP, de Almeida JR (2016): The role of transoral robotic surgery, transoral laser microsurgery, and lingual tonsillectomy in the identification of head and neck squamous cell carcinoma of unknown primary origin: a systematic review. *J Otolaryngol Head Neck Surg* 45, 28
- Fu Y, Zhang S-S, Xiao S, Basheer WA, Baum R, Epifantseva I, Hong T, Shaw RM (2017): Cx43 Isoform GJA1-20k Promotes Microtubule Dependent Mitochondrial Transport. *Front Physiol* 8, 905
- Gadewal NS, Zingde SM (2011): Database and interaction network of genes involved in oral cancer: Version II. *Bioinformatics* 6, 169–170
- Gleisner MA, Navarrete M, Hofmann F, Salazar-Onfray F, Tittarelli A (2017): Mind the gaps in tumor immunity: Impact of connexin-mediated intercellular connections. *Front Immunol* 8, 1–17
- Glick B, Nakano A (2009): Membrane traffic within the Golgi apparatus. *Annu Rev Cell Dev Biol* 25, 113–132
- Grobe A, Rybak L, Schon G, Smeets R, Tribius S, Schafhausen P, Clauditz TS, Hanken H, Heiland M (2016): Outcome and fewer indications for adjuvant therapy for patients with oral squamous cell carcinomas under standardized tumor board conditions. *J Cancer Res Clin Oncol* 142, 505–520
- Hamada T, Wakamatsu T, Miyahara M, Nagata S, Nomura M, Kamikawa Y, Yamada N, Batra SK, Yonezawa S, Sugihara K (2012): MUC4: A novel prognostic factor of oral squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 130, 1768–1776
- Hesketh GG, Van Eyk JE, Tomaselli GF (2009): Mechanisms of gap junction traffic in health and disease. *J Cardiovasc Pharmacol* 54, 263–272
- Huang S-F, Wei F-C, Liao C-T, Wang H-M, Lin C-Y, Lo S, Huang J-J, Chen I-H, Kang C-J, Chien H-T, Chen H-H (2012): Risk stratification in oral cavity squamous cell carcinoma by preoperative CRP and SCC antigen levels. *Ann Surg Oncol* 19, 3856–3864
- Huang SH, O’Sullivan B (2017): Overview of the 8th Edition TNM Classification for Head and Neck Cancer. *Curr Treat Options Oncol* 18, 40
- Hunter AW, Barker RJ, Zhu C, Gourdie RG (2005): Zonula occludens-1 alters connexin43 gap junction size and organization by influencing channel accretion. *Mol Biol Cell* 16, 5686–5698
- Hurvitz KA, Kobayashi M, Evans GRD (2006): Current options in head and neck reconstruction. *Plast Reconstr Surg* 118, 122–133
- Ivascu A, Kubbies M (2006): Rapid Generation of Single-Tumor Spheroids for High-Throughput Cell Function and Toxicity Analysis. *J Biomol Screen* 11, 922–932
- Jiang JX, Penuela S (2016): Connexin and pannexin channels in cancer. *BMC Cell Biol* 17, 106–150
- Jiang L, Ji N, Zhou Y, Li J, Liu X, Wang Z, Chen Q, Zeng X (2009): CAL 27 is an oral adenosquamous carcinoma cell line. *Oral Oncol* 45, 204–207
- Johnson RG, Meyer RA, Li XR, Preus DM, Tan L, Grunenwald H, Paulson AF, Laird DW, Sheridan JD (2002): Gap junctions assemble in the presence of cytoskeletal inhibitors,

- but enhanced assembly requires microtubules. *Exp Cell Res* 275, 67–80
- Kanazawa T, Sarukawa S, Fukushima H, Takeoda S, Kusaka G, Ichimura K (2011): Current reconstructive techniques following head and neck cancer resection using microvascular surgery. *Ann Vasc Dis* 4, 189–195
- Kang H, Kiess A, Chung CH (2015): Emerging biomarkers in head and neck cancer in the era of genomics. *Nat Rev Clin Oncol* 12, 11–26
- Kardami E, Dang X, Iacobas DA, Nickel BE, Jeyaraman M, Srisakuldee W, Makazan J, Tanguy S, Spray DC (2007): The role of connexins in controlling cell growth and gene expression. *Prog Biophys Mol Biol* 94, 245–264
- Karni RJ, Rich JT, Sinha P, Haughey BH (2011): Transoral laser microsurgery: a new approach for unknown primaries of the head and neck. *Laryngoscope* 121, 1194–1201
- King TJ, Fukushima LH, Hieber AD, Shimabukuro KA, Sakr WA, Bertram JS (2000): Reduced levels of connexin43 in cervical dysplasia: inducible expression in a cervical carcinoma cell line decreases neoplastic potential with implications for tumor progression. *Carcinogenesis* 21, 1097–1109
- Kono M, Watanabe M, Abukawa H, Hasegawa O, Satomi T, Chikazu D (2013): Cyclooxygenase-2 expression is associated with vascular endothelial growth factor C expression and lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Maxillofac Surg* 71, 1694–1702
- Koontongkaew S (2013): The tumor microenvironment contribution to development, growth, invasion and metastasis of head and neck squamous cell carcinomas. *J Cancer* 4, 66–83
- Kotini M, Barriga EH, Leslie J, Gentzel M, Rauschenberger V, Schambon A, Mayor R (2018): Gap junction protein Connexin-43 is a direct transcriptional regulator of N-cadherin in vivo. *Nat Commun* 9, 3846
- Krisanaprakornkit S, Iamaroon A (2012): Epithelial-Mesenchymal Transition in Oral Squamous Cell Carcinoma. *ISRN Oncol* 2012, 1–10
- Kumar NM, Gilula NB (1996): The Gap Junction Review Communication Channel. *Cell* 84, 381–388
- Laborde RR, Novakova V, Olsen KD, Kasperbauer JL, Moore EJ, Smith DI (2010): Expression profiles of viral responsive genes in oral and oropharyngeal cancers. *Eur J Cancer* 46, 1153–1158
- Laing JG, Beyer EC (1995): The gap junction protein connexin 43 is degraded via the ubiquitin proteasome pathway. *J Biol Chem* 270, 26399–403
- Laird DW (2006): Life cycle of connexins in health and disease. *Biochem J* 394, 527–543
- Laird DW, Puranam KL, Revel J (1991): Turnover and phosphorylation dynamics of connexin43 gap junction protein in cultured cardiac myocytes. *Biochem J* 273, 67–72
- Laird DW, Fistouris P, Batist G, Alpert L, Huynh HT, Carystinos GD, Alaoui-Jamali MA (1999): Deficiency of connexin43 gap junctions is an independent marker for breast tumors. *Cancer Res* 59, 4104–4110
- Laird DW, Lampe PD, Johnson RG (2015): Cellular Small Talk. *Sci Am* 312, 70–77
- Lauf U, Giepmans BNG, Lopez P, Braconnot S, Chen S-C, 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

- Leithe E, Rivedal E (2004): Ubiquitination and down-regulation of gap junction protein connexin-43 in response to 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate treatment. *J Biol Chem* 279, 50089–50096
- Leithe E, Brech A, Rivedal E (2006): Endocytic processing of connexin43 gap junctions: a morphological study. *Biochem J* 393, 59–67
- Leithe E, Mesnil M, Aasen T (2018): The connexin 43 C-terminus: A tail of many tales. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* 1860, 48–64
- Li Z, Zhou Z, Donahue HJ (2008): Alterations in Cx43 and OB-cadherin affect breast cancer cell metastatic potential. *Clin Exp Metastasis* 25, 265–272
- Liang QL, Wang BR, Chen GQ, Li GH, Xu YY (2010): Clinical significance of vascular endothelial growth factor and connexin43 for predicting pancreatic cancer clinicopathologic parameters. *Med Oncol* 27, 1164–1170
- Lichtenstein A, Minogue PJ, Beyer EC, Berthoud VM (2011): Autophagy: a pathway that contributes to connexin degradation. *J Cell Sci* 124, 910–920
- Licitra L, Keilholz U, Tahara M, Lin J-C, Chomette P, Ceruse P, Harrington K, Mesia R (2016): Evaluation of the benefit and use of multidisciplinary teams in the treatment of head and neck cancer. *Oral Oncol* 59, 73–79
- Lilly E, Sellitto C, Milstone LM, White TW (2016): Connexin channels in congenital skin disorders. *Semin Cell Dev Biol* 50, 4–12
- Löwenstein W (1981): Junctional intercellular communication: the cell-to-cell membrane channel. *PhysiolRev* 61, 829–913
- Luke RA, Saffitz JE (1991): Remodeling of ventricular conduction pathways in healed canine infarct border zones. *J Clin Invest* 87, 1594–1602
- Majoul I V., Onichtchouk D, Butkevich E, Wenzel D, Chailakhyan LM, Duden R (2009): Limiting transport steps and novel interactions of Connexin-43 along the secretory pathway. *Histochem Cell Biol* 132, 263–280
- Markopoulos A (2012): Current Aspects on Oral Squamous Cell Carcinoma. *Open Dent J* 6, 126–130
- Martins-Marques T, Catarino S, Marques C, Matafome P, Ribeiro-Rodrigues T, Baptista R, Pereira P, Girao H (2015): Heart ischemia results in connexin43 ubiquitination localized at the intercalated discs. *Biochimie* 112, 196–201
- Mazon R, Tao Y, Lusinchi A, Bourhis J (2009): Current concepts of management in radiotherapy for head and neck squamous-cell cancer. *Oral Oncol* 45, 402–408
- 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
- McLachlan E, Shao Q, Laird DW (2007): Connexins and gap junctions in mammary gland development and breast cancer progression. *J Membr Biol* 218, 107–121
- Melo JC, Marques MEA, Vasconcelos L, Miot HA, Abbade LPF (2014): Invasive head and neck cutaneous squamous cell carcinoma: Clinical and histopathological characteristics, frequency of local recurrence and metastasis. *An Bras Dermatol* 89, 562–568
- Merrifield PA, Laird DW (2016): Connexins in skeletal muscle development and disease. *Semin Cell Dev Biol* 50, 67–73

- Metzger W, Sossong D, Bachle A, Putz N, Wennemuth G, Pohlemann T, Oberringer M (2011): The liquid overlay technique is the key to formation of co-culture spheroids consisting of primary osteoblasts, fibroblasts and endothelial cells. *Cytotherapy* 13, 1000–1012
- Mignogna MD, Fedele S, Lo Russo L (2004): The World Cancer Report and the burden of oral cancer. *Eur J Cancer Prev* 13, 139–142
- Morandi L, Gissi D, Tarsitano A, Asioli S, Monti V, Del Corso G, Marchetti C, Montebugnoli L, Foschini MP (2015): DNA methylation analysis by bisulfite next-generation sequencing for early detection of oral squamous cell carcinoma and high-grade squamous intraepithelial lesion from oral brushing. *J Craniomaxillofac Surg* 43, 1494–1500
- Moreno AP, Chanson M, Anumonwo J, Scerri I, Gu H, Taffet SM, Delmar M (2002): Role of the carboxyl terminal of connexin43 in transjunctional fast voltage gating. *Circ Res* 90, 450–457
- Morley GE, Taffet SM, Delmar M (1996): Intramolecular interactions mediate pH regulation of connexin43 channels. *Biophys J* 70, 1294–1302
- Morley GE, Ek-Vitorin JF, Taffet SM, Delmar M (1997): Structure of connexin43 and its regulation by pHi. *J Cardiovasc Electrophysiol* 8, 939–951
- Morrison DK (2009): The 14-3-3 proteins: integrators of diverse signaling cues that impact cell fate and cancer development. *Trends Cell Biol* 19, 16–23
- Mrozik KM, Blaschuk OW, Cheong CM, Zannettino ACW, Vandyke K (2018): N-cadherin in cancer metastasis, its emerging role in haematological malignancies and potential as a therapeutic target in cancer. *BMC Cancer* 18, 939
- Musil LS, Goodenough DA (1991): Biochemical analysis of connexin43 intracellular transport, phosphorylation, and assembly into gap junctional plaques. *J Cell Biol* 115, 1357–1374
- Musil LS, Goodenough DA (1993): Multisubunit assembly of an integral plasma membrane channel protein, gap junction connexin43, occurs after exit from the ER. *Cell* 74, 1065–1077
- 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
- Naus CC, Laird DW (2010): Implications and challenges of connexin connections to cancer. *Nat Rev Cancer* 10, 435–441
- Nielsen MS, Axelsen LN, Sorgen PL, Verma V, Delmar M, Holstein-Rathlou N-H (2012): Gap Junctions. *Compr Physiol* 2, 1981–2035
- Oberaigner W, Siebert U (2011): Do women with cancer have better survival as compared to men after adjusting for staging distribution? *Eur J Public Health* 21, 387–391
- Oliveira-Costa JP, de Carvalho AF, da Silveira da GG, Amaya P, Wu Y, Park K-JJ, Gigliola MP, Lustberg M, Buim MEC, Ferreira EN, et al. (2015): Gene expression patterns through oral squamous cell carcinoma development: PD-L1 expression in primary tumor and circulating tumor cells. *Sci Rep* 5, 13243
- Pagedar NA, Gilbert RW (2009): Selective neck dissection: A review of the evidence. *Oral Oncol* 45, 416–420

- Pan H, Gu L, Liu B, Li Y, Wang Y, Bai X, Li L, Wang B, Peng Q, Yao Z, Tang Z (2017): Tropomyosin-1 acts as a potential tumor suppressor in human oral squamous cell carcinoma. *PLoS One* 12, e0168900
- Park DJ, Freitas TA, Wallick CJ, Guyette C V, Warn-cramer BJ (2006): Molecular dynamics and in vitro analysis of Connexin43 : A new 14-3-3 mode-1 interacting protein. *Protein Sci* 15, 2344–2355
- Park DJ, Wallick CJ, Martyn KD, Lau AF, Jin C, Warn-Cramer BJ (2007): Akt phosphorylates connexin43 on Ser373, a „Mode-1“ binding site for 14-3-3. *Cell Commun Adhes* 14, 211–226
- Patel SA, Magnuson JS, Holsinger FC, Karni RJ, Richmon JD, Gross ND, Bhrany AD, Ferrell JK, Ford SE, Kennedy AA, Mendez E (2013): Robotic surgery for primary head and neck squamous cell carcinoma of unknown site. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg* 139, 1203–1211
- Paznekas WA, Boyadjiev SA, Shapiro RE, Daniels O, Wollnik B, Keegan CE, Innis JW, Dinulos MB, Christian C, Hannibal MC, Jabs EW (2003): Connexin 43 (GJA1) mutations cause the pleiotropic phenotype of oculodentodigital dysplasia. *Am J Hum Genet* 72, 408–18
- Pfaffl MW (2001): A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29, 45
- 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
- Pfenniger A, Wohlwend A, Kwak BR (2011): Mutations in connexin genes and disease. *Eur J Clin Invest* 41, 103–116
- Pollmann M-A, Shao Q, Laird DW, Sandig M (2005): Connexin 43 mediated gap junctional communication enhances breast tumor cell diapedesis in culture. *Breast Cancer Res* 7, 522–534
- Ponsaerts R, De Vuyst E, Retamal M, D’hondt C, Vermeire D, Wang N, De Smedt H, Zimmermann P, Himpens B, Vereecke J, et al. (2010): Intramolecular loop/tail interactions are essential for connexin 43-hemichannel activity. *FASEB J* 24, 4378–4395
- Poyet C, Buser L, Roudnicky F, Detmar M, Hermanns T, Mannhard D, Höhn A, Rüschoff J, Zhong Q, Sulser T, et al. (2015): Connexin 43 expression predicts poor progression-free survival in patients with non-muscle invasive urothelial bladder cancer. *J Clin Pathol* 68, 819–824
- Proia NK, Paszkiewicz GM, Nasca MAS, 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
- Remo BF, Qu J, Volpicelli FM, Giovannone S, Shin D, Lader J, Liu FY, Zhang J, Lent DS, Morley GE, Fishman GI (2011): Phosphatase-Resistant gap junctions inhibit pathological remodeling and prevent arrhythmias. *Circ Res* 108, 1459–1466
- Rhett JM, Jourdan J, Gourdie RG (2011): Connexin 43 connexon to gap junction transition is regulated by zonula occludens-1. *Mol Biol Cell* 22, 1516–1528
- Ribeiro-Rodrigues TM, Martins-Marques T, Morel S, Kwak BR, Girão H (2017): Role of connexin 43 in different forms of intercellular communication – gap junctions,

- extracellular vesicles and tunnelling nanotubes. *J Cell Sci* 130, 3619–3630
- Rivera C (2015): Essentials of oral cancer. *Int J Clin Exp Pathol* 8, 11884–11894
- Sagheb K, Blatt S, Rahimi-Nedjat R-K, Eigenbrodt S, Al-Nawas B, Walter C (2017): Cervical metastases behavior of T1-2 squamous cell cancer of the oral mucosa. *Clin Oral Investig* 21, 931–935
- Santini MT, Rainaldi G (1999): Three-dimensional spheroid model in tumor biology. *Pathobiology* 67, 148–157
- Sarode GS, Sarode SC, Maniyar N, Anand R, Patil S (2018): Oral cancer databases: A comprehensive review. *J Oral Pathol Med* 47, 547–556
- Schalper KA, Carvajal-Hausdorf D, Oyarzo MP (2014): Possible role of hemichannels in cancer. *Front Physiol* 5, 1–18
- Schilling C, Stoeckli SJ, Haerle SK, Broglie MA, Huber GF, Sorensen JA, Bakholdt V, Krogdahl A, Von Buchwald C, Bilde A, et al. (2015): Sentinel European Node Trial (SENT): 3-year results of sentinel node biopsy in oral cancer. *Eur J Cancer* 51, 2777–2784
- Schittek B, Sinnberg T (2014): Biological functions of casein kinase 1 isoforms and putative roles in tumorigenesis. *Mol Cancer* 13, 231
- Schneider B, Teschner M, Sudermann T, Pikula B, Lautermann J (2002): Expression of gap junction proteins (connexin 26, 30, 32, 43) in normal mucosa, hyperkeratosis and carcinoma of the human larynx. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 64, 324–329
- Seki A (2004): Modifications in the Biophysical Properties of Connexin43 Channels by a Peptide of the Cytoplasmic Loop Region. *Circ Res* 95, 22–28
- Seki S, Fujiwara M, Matsuura M, Fujita S, Ikeda H, Asahina I, Ikeda T (2011): Prediction of outcome of patients with oral squamous cell carcinoma using vascular invasion and the strongly positive expression of vascular endothelial growth factors. *Oral Oncol* 47, 588–593
- Shaw RM, Fay AJ, Puthenveedu MA, von Zastrow M, Jan YN, Jan LY (2007): Microtubule Plus-End-Tracking Proteins Target Gap Junctions Directly from the Cell Interior to Adherens Junctions. *Cell* 128, 547–560
- Sievers D, Bunzendahl J, Frosch A, Perske C, Hemmerlein B, Schliephake H, Brockmeyer P (2017): Generation of highly differentiated BHY oral squamous cell carcinoma multicellular spheroids. *Mol Clin Oncol* 8, 323–325
- Sin WC, Crespin S, Mesnil M (2012): Opposing roles of connexin43 in glioma progression. *Biochim Biophys Acta Biomembr* 1818, 2058–2067
- Singh M, Yelle N, Venugopal C, Singh SK (2018): EMT: Mechanisms and therapeutic implications. *Pharmacol Ther* 182, 80–94
- Sirnes S, Bruun J, Kolberg M, Kjenseth A, Lind GE, Svindland A, Brech A, Nesbakken A, Lothe RA, Leithe E, Rivedal E (2012): Connexin43 acts as a colorectal cancer tumor suppressor and predicts disease outcome. *Int J Cancer* 131, 570–581
- Smith JH, Green CR, Peters NS, Rothery S, Severs NJ (1991): Altered patterns of gap junction distribution in ischemic heart disease. An immunohistochemical study of human myocardium using laser scanning confocal microscopy. *Am J Pathol* 139, 801–21
- Smyth JW, Shaw RM (2013): Autoregulation of connexin43 gap junction formation by

- internally translated isoforms. *Cell Rep* 5, 611–618
- Smyth JW, Hong TT, Gao D, Vogan JM, Jensen BC, Fong TS, Simpson PC, Stainier DYR, Chi NC, Shaw RM (2010): Limited forward trafficking of connexin 43 reduces cell-cell coupling in stressed human and mouse myocardium. *J Clin Invest* 120, 266–279
- Smyth JW, Zhang SS, Sanchez JM, Lamouille S, Vogan JM, Hesketh GG, Hong T, Tomaselli GF, Shaw RM (2014): A 14-3-3 Mode-1 Binding Motif Initiates Gap Junction Internalization During Acute Cardiac Ischemia. *Traffic* 15, 684–699
- Solan JL, Lampe PD (2010): Connexin 43 Phosphorylation – Structural Changes and Biological Effects. *Cancer Res* 419, 261–272
- Solan JL, Lampe PD (2014): Specific Cx43 phosphorylation events regulate gap junction turnover in vivo. *FEBS Lett* 588, 1423–1429
- Solan JL, Lampe PD (2018): Spatio-temporal regulation of connexin43 phosphorylation and gap junction dynamics. *Biochim Biophys Acta Biomembr* 1860, 83–90
- Solan JL, Hingorani SR, Lampe PD (2012): Changes in connexin43 expression and localization during pancreatic cancer progression. *J Membr Biol* 245, 255–262
- Sosinsky GE, Nicholson BJ (2005): Structural organization of gap junction channels. *Biochim Biophys Acta Biomembr* 1711, 99–125
- Specenier PM, Vermorken JB (2009): Current concepts for the management of head and neck cancer: Chemotherapy. *Oral Oncol* 45, 409–415
- Su V, Cochrane K, Lau AF (2012): Degradation of connexins through the proteasomal, endolysosomal and phagolysosomal pathways. *J Membr Biol* 245, 389–400
- Sullivan R, Ruangvoravat C, Joo D, Morgan J, Wang Bl, Wang Xk, Lo Cw (1993): Structure, sequence and expression of the mouse Cx43 gene encoding connexin 43. *Gene* 130, 191–199
- Sun W, Liu H, Li Y, Ji X, Liang D (2004): A study of the relationship between the expression of connexin43, E-cadherin and biological behaviors of human laryngeal cancer. *Zhonghua Er Bi Yan Hou Ke Za Zhi* 39, 293–297
- Tanaka T, Kimura M, Ishiguro H, Mizoguchi K, Takeyama H (2016): Connexin 43 expression is associated with poor survival in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Mol Clin Oncol* 4, 989–993
- Tang J-Y, Hsi E, Huang Y-C, Hsu NC-H, Yang W-C, Chang H-W, Chai C-Y, Chu P-Y (2015): Overexpression of autophagy-related 16-like 1 in patients with oral squamous cell carcinoma. *Pathol Oncol Res* 21, 301–305
- Teleki I, Szasz AM, Maros ME, Gyorffy B, Kulka J, Meggyeshazi N, Kiszner G, Balla P, Samu A, Krenacs T (2014): Correlations of differentially expressed gap junction connexins cx26, cx30, cx32, cx43 and cx46 with breast cancer progression and prognosis. *PLoS One* 9, e112541
- 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
- Thompson CF, St John MA, Lawson G, Grogan T, Elashoff D, Mendelsohn AH (2013): Diagnostic value of sentinel lymph node biopsy in head and neck cancer: a meta-analysis. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 270, 2115–2122
- Tittarelli A, Guerrero I, Tempio F, Gleisner MA, Avalos I, Sabanegh S, Ortíz C, Michea L,

- López MN, Mendoza-Naranjo A, Salazar-Onfray F (2015): Overexpression of connexin 43 reduces melanoma proliferative and metastatic capacity. *Br J Cancer* 113, 259–267
- Tsai W-C, Tsai S-T, Ko J-Y, Jin Y-T, Li C, Huang W, Young K-C, Lai M-D, Liu H-S, Wu L-W (2004): The mRNA profile of genes in betel quid chewing oral cancer patients. *Oral Oncol* 40, 418–426
- 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
- Uchida D, Kawamata H, Nakashiro K, Omotehara F, Hino S, Hoque MO, Begum N-M, Yoshida H, Sato M, Fujimori T (2001): Low-dose retinoic acid enhances in vitro invasiveness of human oral squamous-cell-carcinoma cell lines. *Br J Cancer* 85, 122
- Vanslyke J, Musil LS (2002): Dislocation and degradation from the ER are regulated by cytosolic stress. *J Cell Biol* 157, 381–394
- Vanslyke J, Deschenes S, Musil L (2000): Intracellular Transport, Assembly, and Degradation of Wild-Type and Disease-Linked Mutant Gap Junction Proteins. *Mol Biol Cell* 11, 1933–1946
- Vembar SS, Brodsky JL (2008): One step at a time: Endoplasmic reticulum-associated degradation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 944–957
- Verhelst P-J, Dons F, Van Bever P-J, Schoenaers J, Nanhekhyan L, Politis C (2019): Fibula Free Flap in Head and Neck Reconstruction: Identifying Risk Factors for Flap Failure and Analysis of Postoperative Complications in a Low Volume Setting. *Craniofac Trauma Reconstr* 12, 183–192
- Villares GJ, Dobroff AS, Wang H, Zigler M, Melnikova VO, Huang L, Bar-Eli M (2009): Overexpression of protease-activated receptor-1 contributes to melanoma metastasis via regulation of connexin 43. *Cancer Res* 69, 6730–6737
- Vineis P, Alavanja M, Buffler P, Fontham E, Franceschi S, Gao YT, Gupta PC, Hackshaw A, Matos E, Samet J, et al. (2004): Tobacco and cancer: recent epidemiological evidence. *J Natl Cancer Inst* 96, 99–106
- Vinken M, Decrock E, Leybaert L, Bultynck G, Himpens B, Vanhaecke T, Rogiers V (2012): Non-channel functions of connexins in cell growth and cell death. *Biochim Biophys Acta Biomembr* 1818, 2002–2008
- Vossen DM, Verhagen CVM, Verheij M, Wessels LFA, Vens C, van den Brekel MWM (2018): Comparative genomic analysis of oral versus laryngeal and pharyngeal cancer. *Oral Oncol* 81, 35–44
- Vyskocil E, Pammer J, Altorjai G, Grasl MC, Parzefall T, Haymerle G, Janik S, Perisanidis C, Erovic BM (2019): Dysregulation of ss-catenin, WISP1 and TCF21 predicts disease-specific survival and primary response against radio(chemo)therapy in patients with locally advanced squamous cell carcinomas of the head and neck. *Clin Otolaryngol* 44, 263–272
- Wang J, Dai Y, Huang Y, Chen X, Wang H, Hong Y, Xia J, Cheng B (2013): All-trans retinoic acid restores gap junctional intercellular communication between oral cancer cells with upregulation of Cx32 and Cx43 expressions in vitro. *Med Oral Patol Oral Cir*

Bucal 18, 569–77

Wang X, Veruki ML, Bukoreshtliev N V., Hartveit E, Gerdes H-H (2010): Animal cells connected by nanotubes can be electrically coupled through interposed gap-junction channels. *Proc Natl Acad Sci USA* 107, 17194–17199

Watson P, Forster R, Palmer KJ, Pepperkok R, Stephens DJ (2005): Coupling of ER exit to microtubules through direct interaction of COPII with dynactin. *Nat Cell Biol* 7, 48–55

Zhang Y-W, Kaneda M, Morita I (2003): The gap junction-independent tumor-suppressing effect of connexin 43. *J Biol Chem* 278, 44852–44856

Danksagung

An dieser Stelle bedanke ich mich besonders bei Herrn Dr. Dr. Brockmeyer und Herrn Prof. Dr. Dr. Schliephake für die Vergabe des Themas, die Betreuung, die konstruktive Kritik, die Korrektur und die Gesprächsbereitschaft in jeglicher Situation. Frau Marlena Pantakani danke ich für die umfangreiche Unterstützung bei den durchgeführten Experimenten, was ermöglicht hat, dass ich diese Dissertation neben meiner alltäglichen klinischen Arbeit geschafft habe. Herrn PD Dr. Bernhard Hemmerlein danke ich für die Einführung in die Herstellung von multizellulären Tumorsphäroiden. Herrn Jens Bunzendahl danke ich für die Einführung in das Labor und in die Grundlagen der Arbeit im Zellkultur-Labor. Frau Hottenrott, Frau Tegeler und Frau Martin-Ortega danke ich für die Unterstützung bei der Paraffin-Einbettung einer großen Anzahl von multizellulären Tumorsphäroiden. Frau Dr. Anja Quast danke ich für die konstruktive Kritik und die Unterstützung bei der statistischen Auswertung. Herrn Roland Gera danke ich für die Korrektur der durchgeführten statistischen Auswertung. Frau Dr. Andrea Schubert danke ich für die Unterstützung bei der Formatierung dieser Dissertation. Meiner Mentorin Frau Prof. Dr. Christine Stadelmann-Nessler danke ich für die Hinweise und für die Unterstützung bei den letzten Details dieser Dissertation.