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

**Immunhistochemischer Nachweis des Expressionsverhaltens der
Gap-Junction-Strukturproteine (26,43,45) in oralen
Plattenepithelkarzinomen des DMBA-induzierten
Wangentaschenkarzinoms des Hamsters**

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

vorgelegt von
Johannes Ziegler
aus
Bad Brückenau

Göttingen 2014

D e k a n:

Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer

- I. Berichterstatter/-in: Prof. Dr. med. Dr. med. dent. H. Schliephake
- II. Berichterstatter/-in: Prof. Dr. med. Heinz-Joachim Radzun
- III. Berichterstatter/-in: Prof. Dr. hum. biol. Margarete Schön

Tag der mündlichen Prüfung: 11.03.2015

1	Einleitung.....	3
1.1	Karzinome der Mundhöhle	3
1.1.1	Epidemiologie	3
1.1.2	Ätiologie und Risikofaktoren	3
1.1.3	Pathogenese	4
1.1.4	Klinik, Diagnostik und Klassifikation	5
1.1.5	Therapie und Prognose	8
1.2	Karzinogenese	10
1.2.1	Krebsentstehung	10
1.2.2	Onkogene.....	11
1.2.3	Tumorsuppressorgene	13
1.2.4	Modelle der Karzinogenese.....	13
1.2.5	Invasion und Metastasierung.....	14
1.3	Gap-Junctional-Intercellular-Communication und Connexine	16
1.3.1	Gap-Junction	16
1.3.2	Connexine	17
1.4	Connexine und Karzinogenese	19
1.5	Fragestellung	22
2	Material und Methoden	23
2.1	Materialien	23
2.1.1	Versuchstiere.....	23
2.1.2	Arbeitsmaterialien.....	23
2.1.3	Antikörper	27
2.2	Tierversuch	27
2.2.1	Behandlungsplan.....	27
2.2.2	Probeentnahme	29
2.2.3	Tierversuchsantrag.....	29
2.3	Vorarbeiten	29
2.3.1	Einbettung des Gewebes	29
2.3.2	Anfertigung der Schnitte	30
2.3.3	Entparaffinierung und Rehydrierung der Schnitte.....	30
2.3.4	Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung)	31
2.3.5	Randomisierung	31
2.4	Immunhistochemischer Nachweis von Connexin 26, 43 und 45	32
2.4.1	Protokoll für den immunhistochemischen Nachweis von Cx 26.....	32
2.4.2	Protokoll für den immunhistochemischen Nachweis von Cx 43.....	32
2.4.3	Protokoll für den immunhistochemischen Nachweis von Cx 45.....	33

2.4.4	Gegenfärbung.....	34
2.4.5	Dehydrierung und Eindecken der Präparate	34
2.5	Dokumentation der Ergebnisse	34
2.6	Quantitative und semiquantitative Auswertung	35
2.6.1	Quantitative Auswertung	35
2.6.2	Semiquantitative Auswertung	36
2.7	Statistische Analyse	36
3	Ergebnisse.....	37
3.1	Präparate (HE-Färbung) der malignen Transformationen	37
3.2	Immunhistochemische Färbungen	38
3.2.1	Connexin 26	39
3.2.2	Connexin 43	42
3.2.3	Connexin 45	45
3.3	Differentielle Connexinexpression der Subtypen 26, 43 und 45 im Verlauf der oralen Karzinogenese	48
3.4	Intrazelluläre Connexinverteilung auf Membran, Kern und Zytoplasma	53
4	Diskussion	55
4.1	Tiermodell	55
4.2	Immunhistochemie	56
4.3	Expressionsverhalten.....	56
4.3.1	Connexin 26	56
4.3.2	Connexin 43	57
4.3.3	Connexin 45	58
4.4	Intrazelluläre Connexinlokalisation.....	59
5	Zusammenfassung	60
6	Abkürzungsverzeichnis.....	62
7	Tabellenverzeichnis	63
8	Abbildungsverzeichnis.....	64
9	Literaturverzeichnis.....	67
10	Anhang	73
10.1	Daten der quantitativen Auswertung	73
10.2	Daten der semiquantitativen Auswertung.....	84
10.3	Ergebnisse des Fisher-Tests.....	91

1 Einleitung

1.1 Karzinome der Mundhöhle

1.1.1 Epidemiologie

Malignome im Kopf- und Halsbereich sind ein globales gesundheitliches Problem. Betrachtet man die Häufigkeit des Auftretens dieser Krankheit, so kann festgestellt werden, dass sie mit 3 % an sechster Stelle aller Tumoren beim Menschen steht. In 48 % der Fälle tritt diese Erkrankung in der Mundhöhle auf, davon sind 90 % dem Plattenepithelkarzinom zuzuordnen (Tanaka und Ishigamori 2011).

Regional lassen sich große Unterschiede bei der Inzidenz des Mundhöhlenkarzinoms feststellen, die auf unterschiedliche Lebensgewohnheiten und vorherrschende Umwelteinflüsse zurückzuführen sind. Für die westliche Hemisphäre liegen Angaben zwischen 1,3 % - 5 % aller Tumorarten vor (Fröhlich et al. 1992). Der Anteil in Asien und China beträgt 5 %, in Indonesien liegt er bei 12 %, in Thailand bei 21 % und in bestimmten Regionen Indiens steigt er bis auf 47 % an (Pape 1985).

1.1.2 Ätiologie und Risikofaktoren

Aufgrund der geographischen Unterschiede in der Tumorfrequenz muss man den äußeren Faktoren und Umwelteinflüssen eine entscheidende Rolle zuordnen. Hauptrisikofaktoren für die Entstehung der Mundhöhlenkarzinome in den Industrienationen sind der chronische Nikotin- und Alkoholabusus. Beide Noxen haben einen synergistischen Effekt, und es kann bei gemeinsamem Missbrauch eine Potenzierung des Erkrankungsrisikos beobachtet werden (Tanaka und Ishigamori 2011). Laut *Castellsagué et.al.* (2004) besteht bei gleichzeitigem Konsum von Tabak und Alkohol ein 13fach erhöhtes Erkrankungsrisiko.

In den asiatischen Ländern muss der hohe Anteil an Mundhöhlenkarzinomen dem Betelnußkauen zugerechnet werden, das in diesem Gebiet immer noch eine große Bedeutung im sozio-kulturellen Bereich hat (Tanaka und Ishigamori 2011). So wird die Betelnuß auch heute noch zu den unterschiedlichsten Anlässen und Feierlichkeiten wie beispielsweise Hochzeit oder Geburt gereicht (Strickland 2002).

Als weiterer Risikofaktor kann die Infektion mit humanen Papillomaviren (HPV) gesehen werden (Kleist et. al. 2004). Laut *Fakhry und Gillison* (2006) spielt die Infektion mit den HPV-Subtypen 16 und 18 eine entscheidende Rolle. Besonders das

lymphatische Gewebe der Gaumen- und Zungentonsillen scheint durch die Viren maligne entarten zu können.

Außerdem konnten eine unzureichende Mundhygiene und chronisch mechanische Reizungen (Traumen) beispielsweise durch Prothesenanteile oder scharfkantige Füllungen als weitere Risikofaktoren identifiziert werden (Rosenquist et al. 2005).

1.1.3 Pathogenese

Orale Plattenepithelkarzinome entwickeln sich zu einem Großteil aus bestehenden und klinisch sichtbaren Präkanzerosen, wobei auch die Möglichkeit der malignen Entartung aus klinisch gesund erscheinender Mundschleimhaut besteht (Forastiere et al. 2001, Scheifele und Reichart 2003).

Die aktuelle WHO-Klassifikation differenziert Krankheitsbilder der Mundschleimhaut, bei denen ein erhöhtes Entartungspotential besteht nach:

- prämaligen Läsionen (Synonyme: Vorläuferläsion, Präkanzerose) und
- prämaligen Konditionen (Synonyme: potentiell maligne Bedingungen, präkanzeröse Konditionen) (Reichart 2007).

Als Vorläuferläsion versteht man ein exakt umschriebenes Schleimhautareal, das morphologisch atypisches Gewebe aufweist, in dem das Auftreten einer Entartung wahrscheinlicher ist als in normaler Mundschleimhaut (Driemel et al. 2008). Die klinisch am häufigsten auftretenden Vorläuferläsionen sind die orale Leukoplakie und die Erythroplakie (Reichart 2007). Die Einteilung der Vorläuferläsionen erfolgt nach der Schwere ihres Dysplasiegrades, anhand der das weitere diagnostische und therapeutische Konzept festgelegt wird. In der aktuellen Nomenklatur wird die Abkürzung SIN (squamous intraepithelial neoplasia) aufgeführt. Analog zur WHO-Klassifikation aus dem Jahre 2005 differenziert man zwischen leichter Dysplasie (SIN 1), mittelgradiger Dysplasie (SIN 2) und schwerer Dysplasie beziehungsweise Carcinoma in situ (SIN 3) (Gale et al. 2005). Bei einer SIN 1 finden wir ausschließlich undifferenzierte Zellen in den tiefen Schleimhautschichten (Str. basale, Str. granulosum). Die Ausprägung SIN 2 zeigt vereinzelte und die Ausprägung SIN 3 weist multiple undifferenzierte Zellen in allen Regionen der Schleimhaut auf (Strutz

und Mann 2010). Das Risiko der malignen Transformation liegt bei einer leichten beziehungsweise mittelgradigen Dysplasie mit jeweils 11 % deutlich unter dem Risiko von 90 % im Falle einer SIN 3 Form (Neid und Tannapfel 2009).

Als prämaligne Konditionen bezeichnet man Grunderkrankungen, bei denen ein generelles Risiko der malignen Entartung der Mundschleimhaut besteht. Aktuell sind folgende Erkrankungen bekannt: Lichen planus der Mundschleimhaut, chronisch-diskoider Lupus erythematoses, Plummer-Vinson-Syndrom bei Eisenmangelanämie, orale submuköse Fibrose, Syphilis, Xeroderma pigmentosum und Epidermolysis bullosa (Driemel et al. 2008).

1.1.4 Klinik, Diagnostik und Klassifikation

Ein großes Problem stellt häufig die ohne subjektive Beschwerden ablaufende maligne Umwandlung und Progression des Tumors an der Mundschleimhaut dar. Dabei sind klinische Symptome in der Frühphase selten zu finden (Driemel et al. 2008). Zum Diagnosezeitpunkt liegt bei den meisten Patienten bereits ein fortgeschrittenes Stadium III oder IV (vgl. Tab. 2: Stadieneinteilung, S. 7) vor. Außerdem hat bei etwa 50 % der Patienten bereits eine Metastasierung in die regionären Halslymphknoten stattgefunden. Klinische Symptome zu diesem Zeitpunkt können unter anderem sein: ein plötzlicher Leistungsknick mit Müdigkeit, Kachexie, Schleimhautulzerationen, Dysphagie aufgrund des infiltrativen Wachstums oder ein starker, durch den Tumorzerfall ausgelöster Foetor ex ore (Eckardt 2003).

Laut *Kowalski und Carvalho* (2001) bedeutet eine Therapieverzögerung von einem Monat bereits eine signifikante Verschlechterung der Überlebensrate, daher sollte bei einem bestehenden Malignitätsverdacht eine sofortige weiterführende Diagnostik durchgeführt werden. Als Hilfsmittel in der Diagnostik wird derzeit der Nutzen von Toluidinblaufärbung, Autofluoreszenzdiagnostik, photodynamischer Diagnose und Bürstenbiopsie evaluiert. Allerdings bleibt als Goldstandard für eine endgültige Verdachtsbestätigung nur die Biopsie mit anschließender histopathologischer Untersuchung (Driemel et al. 2008).

Seit 1950 besteht ein von der UICC (Union internationale contre le cancer) und der AJCC (American Joint Committee on cancer) gemeinsam entwickeltes, einheitliches Klassifikationssystem der Neoplasien, das als TNM-System bezeichnet wird (Wittenkind et al. 2002). Grundlagen für diese klinische Einteilung der malignen Tumoren sind die anatomische Ausdehnung des Primarius (T) sowie dessen lokoregionaler Lymphknotenbefall (L) und die hämatogene Ausbreitung (M) (Hermanek und Sobin 1987).

Mit Hilfe von bildgebenden Verfahren wie der Kopf-Hals-Sonographie, Computertomographie oder Magnetresonanztomographie kann die lokale Ausdehnung des Primärtumors bestimmt werden. Es wird zwischen einer präoperativen klinischen Beurteilung (cTNM) und einer im Anschluss durch intraoperative Erkenntnisse und histopathologische Ergebnisse ergänzenden postoperativen pathologischen Beurteilung (pTNM) unterschieden. Diese Basis-TNM-Klassifikation kann darüber hinaus durch eine Reihe von Präfixen wie Lymphgefäß- und Veneninvasion des Primärtumors (L, V), Auftreten eines Residualtumors (R), die Sicherheit des Befundes (c) oder den histologischen Differenzierungsgrad (G) ergänzt werden (van der Schroeff und Baatenburg de Jong RJ 2008). In folgender Tabelle werden diese Zusammenhänge dargestellt.

TNM-Klassifikation der Mundhöhlen- und Oropharynxkarzinome

T	Primärtumor
TX	keine Beurteilung möglich
T0	kein Primärtumor nachweisbar
Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumor bis 2 cm Durchmesser
T2	Tumordurchmesser 2-4 cm
T3	Tumordurchmesser mindestens 4 cm
T4	Tumor infiltriert in Nachbarstrukturen (Knochen, Haut, Muskulatur)

N	Lymphknotenbefall
NX	keine Beurteilung möglich
NO	keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	solitäre Metastase in einem ipsilateralen Lymphknoten, maximal 3 cm Durchmesser
N2a	solitäre Metastase in einem ipsilateralen Lymphknoten, 3 bis 6 cm Durchmesser
N2b	multiple Metastasen in ipsilateralen Lymphknoten, maximal 6 cm Durchmesser
N2c	Metastasen in bilateralen oder kontralateralen Lymphknoten, maximal 6 cm Durchmesser
N3	Lymphknotenmetastasen mit einem Durchmesser über 6 cm

M	Fernmetastasen
MX	keine Beurteilung möglich
MO	keine Fernmetastasen nachweisbar
M1	Fernmetastasen nachweisbar

Tab. 1: TNM-Klassifikation

Zur Vereinfachung der komplexen TNM-Einteilung (168 Kombinationsmöglichkeiten) führten die UICC und AJCC 5 Hauptstadien ein, die eine Vergleichbarkeit zwischen Patienten mit verschiedenen TNM-Klassifikationen, aber etwa identischer Tumorprogression ermöglicht.

Stadium	T	N	M
0	Is	0	0
I	1	0	0
II	2	0	0
III	1-2	1	0
IVa	1-3	2	0
IVb	0-4	3	0
IVc	0-4	0-3	1

Tab. 2: Stadieneinteilung

Ein Kritikpunkt an der vorliegenden TNM-Klassifikation ist laut *van der Schroeff und Baatenburg de Jong* (2008), dass sie ausschließlich auf der Tumormorphologie beruht und die komplexen Wirkungszusammenhänge der malignen Erkrankungen dabei nicht berücksichtigt werden. Die prognostische Aussagefähigkeit ist nur beschränkt möglich, da patientenbezogene Faktoren wie Geschlecht, Alter, Behandlung oder Komorbidität nicht mit in die Bewertung einfließen. Eine retrospektive DÖSAK-Studie über Karzinome der Mundhöhle verdeutlicht, dass es der TNM-Klassifikation nicht ausreichend gelingt, aussagefähige homogene Patientenkollektive zu bilden (Eckardt 2003). Aus diesen Gründen ist es sinnvoll, das TNM-System um weitere Indizes zu ergänzen und stetig weiter zu entwickeln.

1.1.5 Therapie und Prognose

Trotz zahlreicher Verbesserungen in der Radio- und Chemotherapie und den Rekonstruktionsverfahren hat sich die Gesamtüberlebensrate von Patienten mit malignen Tumoren im Kopf und Halsbereich in den letzten dreißig Jahren nicht wesentlich verändert (Schliephake et al. 2002). Die 5-Jahres-Überlebensrate beträgt ca. 50 % (Lajolo et al. 2010), wobei die individuelle Prognose stark von Lokalisation und Stadium des Tumors abhängig ist (Kovács et al., 2007).

Grundsätzlich muss zwischen einem kurativen und palliativen Therapieansatz unterschieden werden. Die kurative Behandlung hat die dauerhafte Heilung zum Ziel, wohingegen bei der palliativen Therapie die Lebensqualität und Linderung akuter Symptome im Vordergrund stehen (Eckardt 2003). Die chirurgische Intervention, die Chemo- und die Radiotherapie stellen die drei Hauptpfeiler der Behandlung von oralen Plattenepithelkarzinomen dar und werden in Abhängigkeit von Tumorstadium und Operabilität des Patienten einzeln oder in Kombination angewendet. Das operative Konzept gliedert sich in Resektion des Primärtumors und der regionalen Lymphknoten sowie der anschließenden Rekonstruktion. Daran kann sich eine stadienabhängige adjuvante Radio- und Chemotherapie anschließen. Durch diese Vorgehensweise kann noch eine 5-Jahres-Überlebensrate erreicht werden, die bei Tumoren mit niedrigem Risiko (Stadium I/II, R0) über 80 %, bei Tumoren mit mittlerem Risiko (Stadium III/IV, R0) 60-70 % und selbst bei Tumoren mit hohem Risiko (R1) zwischen 30 und 40 % liegt (Frerich 2010).

Laut *Woolgar et al.* (1995) ist die Überlebenswahrscheinlichkeit der Patienten stark vom Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen abhängig (vgl. Tab. 3). *Remmert et al.* (2001) konnten in einer Studie belegen, dass mit Abnahme des Differenzierungsgrades der Plattenepithelkarzinome die Inzidenz von Metastasen signifikant steigt. Der Metastasierungsgrad stieg von 16,7 % (bei einer Ausprägung mit dem Grad 1) auf 39,6 % bei einem schlecht differenzierten G3-Gewebe. Es konnte allerdings keine Beziehung zwischen Differenzierungsgrad und Ausmaß der Metastasierung nachgewiesen werden. In folgender Tabelle werden das Metastasenauftreten und der Differenzierungsgrad veranschaulicht:

N-Kategorie	G1 %	G2 %	G3 %
pN0	83,3	63,5	39,6
pN1 – pN2b	16,7	27,1	39,6
pN2c – pN3	0	9,4	20,8
gesamt %	100	100	100

Tab. 3: Metastasenauftreten und Differenzierungsgrad (nach Remmert et al. 2001)

Weitere tumorassoziierte Faktoren wie die Größe des Primärtumors, Infiltrationstiefe und perineurale Invasion führen zu einer Verschlechterung der Prognose (Rogers et al. 2009). Patientenabhängige Faktoren wie Begleiterkrankungen, Mangelernährung, Alter oder Geschlecht können den Krankheitsverlauf ebenso negativ beeinflussen. Die nachfolgende Tabelle verdeutlicht die Beeinflussung der 1-, 2- und 5-Jahresüberlebensrate durch das Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen (Woolgar et al. 1995):

	1-JÜR	2-JÜR	5-JÜR
insgesamt (n=123)	84%	69%	65%
keine Lymphknotenmetastasen	95%	86%	86%
mit Lymphknotenmetastasen	71%	52%	44%

Tab. 4: 1-, 2- und 5-Jahres-Überlebensrate (nach Woolgar et al. 1995)

1.2 Karzinogenese

1.2.1 Krebsentstehung

Krebserkrankungen stellen nach Herz-Kreislauf-Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache dar. Jährlich erkranken in Deutschland ca. 450.000 Personen an dieser Krankheit (Wolf et al. 2011).

Die Tumorentstehung wird als mehrstufiger Prozess verstanden, der auf der zellulären Ebene mit der unkontrollierten Proliferation von Zellen beginnt. Der Ursprung der Karzinogenese ist eine Serie von Mutationen unterschiedlicher Gene. Durch diese somatischen Mutationen erreichen vereinzelte Zellen einen bedeutenden Selektionsvorteil, wodurch eine Störung des Gleichgewichts zwischen Proliferation und Apoptose entsteht. Dieses Ungleichgewicht kann auf lange Sicht zu einer todbringenden Schädigung des Organismus führen.

Hanahan und Weinberg (2000) erarbeiteten die sechs wesentlichen zellphysiologischen Veränderungen, die eine Krebszelle charakterisieren:

Abb. 1: Sechs Charakteristika einer Krebszelle (modifiziert nach Hanahan und Weinberg 2000, S.58)

Zwei speziellen Klassen von Genen, den wachstumsfördernden Protoonkogenen und den wachstumshemmenden Tumorsuppressorgenen, kommt hierbei eine besondere Bedeutung zu (Roessner und Müller-Hermelink 2008). Mutationen an

Protoonkogenen oder ihren Antagonisten, den Tumorsuppressorgenen, können zu einer Transformation einer vitalen Zelle in eine Krebszelle führen (Petrides 2007).

Im nachfolgenden Abschnitt werden diese beiden Gruppen von Schlüsselgenen genauer beschrieben.

1.2.2 Onkogene

Bei der Tumorentstehung spielen Onkogene eine wichtige Rolle, da ihre Genprodukte sich den zelleigenen Kontrollmechanismen entziehen und es zu einem unkontrollierten Proliferationszustand oder zum Ausbleiben der Apoptose kommen kann (Chial 2008). Die physiologische Form in gesunden Zellen wird als Protoonkogen bezeichnet und kann, nach den durch sie kodierten Proteinen, in mehrere Gruppen eingeteilt werden:

- Wachstumsfaktoren (z.B. sis, FGF-5)
- Transkriptionsfaktoren (z.B. Myc)
- Regulatoren des Zellzyklus (z.B. Cycline)
- Signaltransduktionsmoleküle (z.B. Ras)
- Rezeptoren für Wachstumsfaktoren (z.B. ErbB)

Erst durch eine Überaktivierung wird das Protoonkogen zum Onkogen, wodurch eine Entartung der Zelle entsteht (Wiethage et al. 1994). Mutationen, die einen solchen Funktionsgewinn (*gain of function*) des Genproduktes hervorrufen können, sind die Translokation, die Punktmutation oder die Amplifizierung von Protoonkogenen. Diese können wie folgt beschrieben werden:

1. Translokation von Protoonkogenen

Bei der Translokation wird das Gen an eine neue Stelle in die Nähe eines starken Promoters verschoben. Hierdurch entsteht eine erhöhte Genexpression, die eine größere Proteinsynthese zur Folge hat (Clark und Pazdernik 2009).

Ein Beispiel hierfür ist die im Jahre 1960 von Nowell und Hungerford veröffentlichte Entdeckung des Philadelphia-Chromosom, das durch die Chromosomentranslokation zwischen Chromosom 9 und Chromosom 22 entsteht. Häufig wird es mit dem Krankheitsbild der chronischen myeloischen Leukämie in Verbindung gebracht. Dieses neue Hybridgen codiert eine dauerhaft aktive Rezeptortyrosinkinase mit der Folge eines unkontrollierten Zellwachstums (Knudson 2000).

2. Punktmutationen von Protoonkogenen

Durch die Punktmutation wird die eigentliche Proteinsequenz verändert, wodurch ein überaktives Protein entsteht und es zur Aktivierung zahlreicher Signaltransduktionskaskaden kommt (Clark und Pazdernik 2009). Dieser qualitative Funktionsgewinn kann oft bei Proteinen der Ras-Familie in einer hohen Anzahl von Tumorentitäten beobachtet werden. Laut van der Weyden und Adams (2007) können bei ca. 30 % aller Tumoren diese konstitutiv aktiven Ras-Mutationen nachgewiesen werden. Die höchste Inzidenz an aktiven Onkogenen hat man bei Adenokarzinomen mit 90 %, Kolonkarzinomen und Schilddrüsenkarzinomen mit jeweils 50 % entdeckt (Bos 1989).

3. Amplifizierung von Protoonkogenen

Bei der Amplifikation kommt es zu einer selektiven Vervielfachung des gesamten Protoonkogens. Durch diese Duplikationen kommt es zu einer Proteinüberexpression und damit zu einer Onkogenwirkung (Clark und Pazdernik 2009). Beispielsweise ist das ErbB2-Gen bei etwa 20 % aller invasiven Mammakarzinome amplifiziert, was mit einer wesentlich schlechteren Gesamtüberlebensrate einhergeht (Untch und Jackisch 2009). Solide Tumoren werden häufiger mit Amplifikationen von Protoonkogenen in Verbindung gebracht, und hämatologische Erkrankungen sind überwiegend mit Translokationen von Protoonkogenen assoziiert. Darüber hinaus besteht die Tendenz, dass die Genamplifikationen häufiger mit dem Spätstadium der Tumorentstehung in Verbindung gebracht werden (Myllykangas und Knuutila 2006).

1.2.3 Tumorsuppressorgene

Die Tumorsuppressorgene werden auch als Anti-Onkogene bezeichnet. Sie stellen die funktionellen Antagonisten der Onkogene dar. Ihre Genprodukte greifen kontrollierend in den Zellzyklus ein und können eine übermäßige Zellproliferation verhindern (Petrides 2007).

Die Kanzerogenese wird durch ein *loss of function*, das heißt einen Funktionsverlust des Gens hervorgerufen. Nach Knudson (2000) müssen beide Allele zerstört oder inaktiviert werden, damit es zu einer Transformation der Zelle kommt, da Tumorsuppressorgene rezessiv sind. Als bekanntes Beispiel kann das p53-Gen genannt werden. Aberrationen dieses Antionkogens zählen zu den häufigsten genetischen Transformationen in Krebszellen, circa 50 % aller Krebsarten weisen Mutationen in beiden Allelen des Gens auf (Soussi und Wiman 2007).

Laut Mesnil (2002) können Connexine sich analog zu Tumorsuppressorgen verhalten und somit regulierend in den Zellzyklus eingreifen. Der Beitrag der Connexine an der Tumorgenese ist Bestandteil der vorliegenden Arbeit und wird im weiteren Verlauf ausführlich dargestellt.

1.2.4 Modelle der Karzinogenese

Die Krebsentstehung und -entwicklung ist in ihren komplexen Zusammenhängen noch nicht ausreichend verstanden. Es gibt verschiedene Modelle, die die Karzinogenese zu erklären versuchen.

Ein etabliertes Modell, das zum besseren Verständnis beiträgt, ist das Dreistufenmodell der Tumorentstehung mit Initiation, Promotion und Progression (vgl. Abb.: 2, S. 14). In der Initiationsphase kommt es unter anderem zu einer irreversiblen Aktivierung der Onkogene und zu einer Inaktivierung der Antionkogene.

Als Folge der Mutation dieser Schlüsselgene kommt es in der Promotionsphase zu einer Proliferation der initiierten Zellen. Das Ergebnis sind präneoplastische Zellen, d. h. benigne Krebsvorstufen, die in der Progressionsphase aufgrund weiterer Mutationen der Tumorsuppressorgene maligne entarten (Hanahan und Weinberg 2000).

Eine weitere Möglichkeit, die Tumorgenese zu klassifizieren, besteht darin, die drei histologischen Stufen Primärtumor, invasiver Tumor und metastasierender Tumor mit repräsentativen Tumorzellphänotypen in Relation zu setzen (Cronier et al. 2009).

Anhand des TNM-Systems (vgl. Tab. 1: TNM-Klassifikation, S. 6) lässt sich der klinische Krankheitsverlauf jedes Patienten mit Hilfe der drei Hauptdeterminanten Primärtumorausdehnung (T), lokalinvasiver Lymphknotenbefall (N) und Fernmetastasen (M) klassifizieren und vergleichen.

Modelle zur Karzinogenese			
<i>3-Stufen Modell</i>	Initiation	Promotion	Progression →
<i>CRONIER</i>	Primärtumor	invasiver Tumor	metastasierender Tumor
<i>TNM-Klassifikation</i>	T _{is} , N ₀ , M ₀	T ₁ -T ₄ , N ₀ , M ₀	T _x , N ₁₋₃ oder T _x , M ₁

Abb.2: Modelle zur Karzinogenese

1.2.5 Invasion und Metastasierung

Ein entscheidender prognostischer Faktor für den Verlauf einer malignen Tumorerkrankung ist das Vermögen der Tumoren, Metastasen zu bilden. In 90 % der Fälle sind die Metastasen und nicht der Primärtumor für die Krebsmortalität verantwortlich (Kath und Höffken 1998).

Der Metastasierungsprozess ist ein äußerst komplexer Ablauf, bei dem Krebszellen den Primarius verlassen und sich in anatomisch entfernten Regionen ansiedeln. Dabei können metastasierende Tumorzellen über mehrere Jahre ruhen und inaktiv bleiben (*tumor dormancy*), bis sie dann klinisch als Spätrezidiv auftreten.

Zu Beginn der Metastasierungskaskade muss es zu einer Tumorzelldissoziation kommen, d. h. die Tumorzellen lösen sich aus ihrer Umgebung und wandern in das Wirtsgewebe und in die angrenzenden Blut- und Lymphgefäße ein. Voraussetzung ist hier das Vorhandensein einer Reihe von Proteinen. Proteolytisch aktive Enzyme wie Matrix-Metalloproteinasen, Serin-Proteinasen, Cysteiny-Proteinasen und Aspartyl-Proteinasen werden benötigt, um Hindernisse wie extrazelluläre Matrix und Basalmembran aufzulösen. Als Ursache wird ein Ungleichgewicht zwischen diesen Proteinasen und ihren Inhibitoren angeführt (Engers und Gabbert 1998). Eine Überexpression dieser Proteasen in malignen Tumoren ist häufig mit einer schlechteren Prognose verknüpft. Nach *Foekens et al.* (1993) sinkt die Gesamtüberlebensrate und das rezidivfreie Überleben mit der Überexpression von Cathepsin D bei Patientinnen mit Mammakarzinom signifikant.

Die Motilität beginnt mit der Ausbildung von Pseudopodien an der Tumorzelle. Diese Führungslamellen an der Front der wandernden Zelle können durch autokrine Tumorzellzytokrine reguliert werden, oder die Bewegung wird durch chemotaktische Stoffe, sogenannte Chemokine, von anderen Zellen direkt beeinflusst (Petrides 2007, Chambers et al. 2002).

Tumorprogression und Metastasierung benötigen einen funktionierenden Anschluss an Blutgefäße, durch die der wachsende Tumor versorgt wird und Stoffwechselprodukte abtransportiert werden können. In der zu Beginn bestehenden avaskulären Phase kommt es im Tumorgewebe zu einer Hypoxie, wodurch Tumorzellen und Wirtszellen angeregt werden, Angiogenesefaktoren freizusetzen (Engers und Gabbert 1998). Die bekanntesten nachgewiesenen Angiogenese-induzierenden Faktoren sind der Fibroblast Growth Factor (FGF), der Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) und der Transforming Growth Factor beta (TGF- β) (Liotta et al. 1991, Engers und Gabbert 1998, Petrides 2007).

Durch diese Disparität zwischen den Promotoren und Inhibitoren der Angiogenese kommt es zu einer Gefäßneubildung des Tumorgewebes (Carmeliet und Jain 2000).

Für die Entwicklung eines vielzelligen Organismus ist die Kommunikation zwischen den Zellen von Bedeutung. Dieser Austausch wird unter anderem durch direkte Zell-Zell-Verbindungen, die sogenannte Gap-Junction-Intercellular-Communication (GJIC), aufrechterhalten. Die Grundbausteine der Gap-Junction sind Connexine, die Einfluss auf die Tumorentstehung bei zahlreichen Tumorentitäten haben können.

Seit mehr als 40 Jahren ist bekannt, dass häufig eine dysfunktionelle Gap-Junction-Intercellular-Communication (GJIC) mit der Karzinogenese assoziiert ist (Loewenstein 1981). Der Aufbau der Gap-Junction und ihre Grundbausteine, die Connexine, werden im nachfolgenden Abschnitt beschrieben. Anschließend wird auf den Zusammenhang zwischen den Connexinen und der Karzinogenese (vgl. S. 19) eingegangen und die Fragestellung der Untersuchung (vgl. S. 22) erläutert.

1.3 Gap-Junctional-Intercellular-Communication und Connexine

1.3.1 Gap-Junction

Gap-Junctions werden aus jeweils zwei Halbkanälen, den Connexonen, gebildet und liegen in der Plasmamembran zweier benachbarter Zellen. Diese Kanäle stellen eine Möglichkeit der direkten Zell-Zell-Kommunikation dar, durch welche ATP-unabhängig, mittels passiver Diffusion, Moleküle bis zu einer Größe von 1200 Da wandern können.

Als Austauschprodukte kommen Ionen (Na^+ , Ca^{2+} , K^+ , Cl^-), Metabolite aus dem Aminosäure-, Fett-, Nukleotid- oder Kohlenhydratstoffwechsel und Signalmoleküle (cAMP oder IP3) in Frage (Loewenstein 1981).

Gap-Junctions sind an einer Vielzahl von Aufgaben beteiligt, beispielsweise werden sie am Herzmuskel und der glatten Muskulatur für eine verzögerungsfreie Weiterleitung von Aktionspotentialen benötigt. Zur Aufrechterhaltung der Gewebshomöostase in wenig oder schlecht durchbluteten Geweben können Moleküle und Wasser durch sie transferiert werden. Außerdem sind die Gap Junctions an der Weiterleitung hormoneller Signale über second Messengern wie IP3 beteiligt (Loewenstein 1981, Niessen et al. 2000).

Außer in Skelettmuskelzellen, Spermien, Erythro- und Thrombozyten sind Gap-Junctions in fast allen Geweben von Säugetierzellen zu finden (Gilula 1987). Es wurde beobachtet, dass sich mehrere Kanäle zusammenlagern können und sogenannte Gap-Junction-Plaques von unterschiedlicher Größe bilden (Falk 2000). Zahlreiche Erkrankungen werden mit Mutationen von spezifischen Connexinen in Verbindung gebracht. Beispielsweise kann es durch Mutationen von Genen, welche für Cx 26 oder Cx 31 codieren, zu einer nicht syndromalen Schwerhörigkeit kommen (Liu et al. 2009). Ein Katarakt kann das Resultat einer Mutation im Cx Gen 46 und Cx

Gen 50 sein. Das Charcot-Marie-Tooth-Syndrom, eine neuromuskuläre Erkrankung, bei der es im Laufe der Zeit zu einer Muskelatrophie kommt, wird auch mit einer Mutation im Connexin 32 assoziiert (Krutovskikh und Yamasaki 2000). Darüber hinaus wird Cx 26 auch als ein Tumorsuppressor-Gen in unterschiedlichen Karzinomen vermutet (Gee et al. 2003). Im Abschnitt 1.4 wird noch explizit auf den Zusammenhang zwischen Connexinen und Karzinogenese eingegangen.

1.3.2 Connexine

Die Grundbausteine der Gap-Junctions, die Connexine, werden durch die nachfolgende Abbildung in ihrem Aufbau und ihrer Anordnung näher beschrieben:

Abb. 3: **A:** Schematischer Aufbau und Anordnung eines Connexin-Moleküls in der Plasmamembran. E1 und E2 stellen die extrazellulären Schleifen dar. **B:** Schematische Darstellung der Struktur eines Gap-Junction-Kanals (Kumar und Gilula 1996, S.382).

Die Connexine lagern sich in der Plasmamembran in Form einer hexameren Struktur zusammen. Jeweils sechs Connexine bilden einen Halbkanal, ein sogenanntes Connexon, das sich mit dem Halbkanal einer benachbarten Zelle über zwei extrazelluläre Schlaufen (vgl. Abb. 3: B) verbinden kann (Kumar und Gilula 1996).

Der strukturelle Aufbau eines Connexins kann folgendermaßen beschrieben werden: Das Protein besteht aus vier Transmembranregionen, einer intrazellulären und zwei extrazellulären Schleifen sowie den zytoplasmatisch liegenden N- und eine C-terminalen Schleifen. Nach Foote et al. (1998) wird das Connexinprotein durch

Disulfidbrücken zwischen den extrazellulären Schleifen stabilisiert. Bei den vier parallel angeordneten Transmembranregionen (M1-4), besitzt die Domäne M3 zahlreiche hydrophile Aminosäuren, welche letztendlich für den hydrophilen Charakter im Inneren der Gap-Junctions verantwortlich sind (Yeager und Gilula 1992). Durch die beiden extrazellulären Schleifen (E1 und E2) können sich zwei Connexone zusammenlagern und einen Gap-Junction-Kanal ausbilden.

Abb. 4: Schematische Darstellung möglicher Zusammensetzungen von homotypischen und heterotypischen Gap-Junctions aus homomeren oder heteromeren Connexonen (Kumar und Gilula 1996, S.384)

Lagern sich sechs identische Connexine zusammen, spricht man von einem homomeren Connexon. Analog kommt es bei der Zusammenlagerung von Connexinen unterschiedlichen Subtyps zur Ausbildung eines heteromeren Halbkanals. In Abhängigkeit von den beiden sich verbindenden Connexonen handelt es sich bei identischen Connexonen um homo- bzw. bei nicht identischen Connexonen um heterotypische Gap-Junction-Kanäle (Kumar und Gilula 1996) (vgl. Abb. 4). Diese Kopplung ist dann für die selektive Permeabilität und Leitfähigkeit der Gap-Junction-Kanäle verantwortlich (Bevans et al. 1998). Allerdings sind nicht alle erdenklichen Verbindungen möglich, beispielweise bildet das Cx 31 nur homotypische Gap-Junction-Kanäle mit sich selbst aus. Cx 43 wiederum ist zwar in der Lage, mit Cx 37, Cx 40 und Cx 45 zu kommunizieren, aber es kann keine heterotypischen Kanäle mit Cx 32 bilden (Elgang et al. 1995, Segretain und Falk 2004).

Bis heute sind 21 Isoformen der Connexine im menschlichen Genom bekannt, die nach ihrer Molmasse eingeteilt werden. Die Buchstaben „Cx“ stehen für Connexin und die Zahl „30“ steht beispielsweise für die Molmasse 30 in Kilodalton (kDa) (Kumar und Gilula 1996, Söhl und Willecke 2003).

1.4 Connexine und Karzinogenese

Karzinome und ihre Entwicklung werden oft mit einer dysfunktionellen Gap-Junction-Interellular-Communication (GJIC) in Verbindung gebracht (Loewenstein 1981). Die Hypothese, dass es bei einer entkoppelten Zell-Zell-Kommunikation zu einem Verlust der Wachstumskontrolle und zur Entstehung von Krebs kommen kann, ist bereits mehr als 40 Jahre alt (Loewenstein 1979). Zahlreiche Forschungsergebnisse belegen die Verbindung zwischen GJIC und Kanzerogenese, allerdings scheint dieser Zusammenhang vielschichtiger zu sein als zu Beginn angenommen.

Der komplexe Prozess der Karzinogenese kann auf unterschiedliche Art und Weise, sowohl positiv als auch negativ, durch Connexine und GJIC beeinflusst werden, z. B. durch unterschiedliche Lokalisation der Connexine in Zytosol, Nukleus oder Zellmembran, durch Interaktion der Connexine mit anderen Proteinen oder durch Modifikation von Signalübermittlungswegen (Dang et al. 2003).

Eine Wachstumshemmung der Tumorzellen kann nach Transfektion der Connexine in Connexin-defizienten Tumorzellenlinien beobachtet werden. Der Grund ist eine verringerte Expression zellzyklusregulierender Gene wie Cyclin -A, -D1 und -D2, was eine verlängerte G1-Phase zur Folge hat und somit zu einer sinkenden Proliferationsrate führt (Chen et al. 1995, Huang et al. 1998). *Muramatsu et al.* (2001) konnten zeigen, dass es nach Transfektion von Connexin 26 in Hepatozyten zu einer deutlichen Verringerung des Tumorwachstums kam. *Cronier et al.* (2009) bezeichneten in diesem Zusammenhang Connexine auch als Tumorsuppressorgene II. Klasse.

Neben der Möglichkeit, Gap-Junctions zu bilden, kann ein Connexin auch als eigenständiger Reaktionspartner auftreten. Eine entscheidende Rolle spielt hier der zytoplasmatische C-Terminus, der die variabelsten Aminosäuresequenzen der Connexine aufweist (Willecke et al. 2002, Sosinsky und Nicholson 2005). Dieser, für

jedes Connexin spezifische zytoplasmatische Schwanz besitzt regulatorische Phosphorylierungsstellen und kann mit intrazellulären Proteinen in Kommunikation treten (Herve et al. 2004). Zahlreiche Studien belegen einen positiven Effekt auf das Tumorstadium. Nach *Langlois et al.* (2010) kommt es nach Wechselwirkung der COOH-Domäne des Cx 43 und dem Tumorsuppressor Caveolin-1 zu einer Wachstumshemmung des Tumors. Einen weiteren Gap-Junction-unabhängigen proliferationshemmenden Effekt des Cx 43 konnten *Zhang et al.* (2003) nachweisen. Diese Studie zeigt, dass Cx 43 durch den Abbau des Proteins sk2p den Spiegel des Tumorsuppressorproteins p27 erhöht und somit Tumorstadium und -progression hemmen kann. Der Verlust von p27 wird mit zahlreichen humanen Tumoren assoziiert (Slingerland und Pagano 2000). Die alleinige Transfektion des C-Terminus eines Connexins in Tumorzellen erzielt einen identischen, wachstumshemmenden Effekt wie ein komplettes Connexin. Diese Tatsache verdeutlicht, dass das Carboxylende des Connexins einen entscheidenden Anteil an der Regulation des Zellzyklus trägt (Zhang et al. 2003, Dang et al. 2003). Nach *Huang et al.* (1998) scheint die Connexinlokalisierung auch Einfluss auf das Zellwachstum zu nehmen. In Glioblastomzellen konnte nach Lokalisierung von Cx 43 im Zytoplasma und Nukleus eine Verringerung der Wachstumsrate und Tumorstadium festgestellt werden. Man vermutet, dass die Genexpression im Nukleus direkt beeinflusst werden kann (Huang et al. 1998). Die Gap-Junction-unabhängigen Aufgaben der Connexine scheinen subtypspezifisch zu sein (Mesnil et al. 1995). Beispielsweise haben Cx 26, aber nicht Cx 40 oder Cx 43 einen Einfluss auf das Wachstum der Epithelzellen eines Zervixkarzinoms (HeLa-Zelllinie). In ähnlicher Weise verhält es sich mit Cx 43 und Cx 32 in Gliomzellen. Cx 43, welches auch in diesem Gewebe exprimiert wird, hat im Vergleich zu Cx 32 einen tumorsuppressiven Effekt (Yano et al. 2001). Diese Tatsache lässt vermuten, dass Connexine das Zellwachstum nur in Gewebe beeinflussen können, in denen sie auch natürlicherweise exprimiert werden.

Ob die kanalbildende Aufgabe der Connexine oder die Möglichkeit als eigenständiger Reaktionspartner aufzutreten bzw. beides zusammen für den wachstumshemmenden Effekt verantwortlich ist, lässt sich nach aktuellem Forschungsstand nicht exakt bestimmen.

Allerdings ist bekannt, dass die komplexe Tumorentstehung in Abhängigkeit von ihrem Stadium in unterschiedlicher Weise durch Connexine und GJIC beeinflusst werden

kann. Zu Beginn der Erkrankung wird eher ein tumorsuppressiver Effekt und im fortgeschrittenen Stadium ein onkogener Effekt beobachtet (Cronier et al. 2009).

	Histologisches Stadium	Zellulärer Phänotyp	Zell-Zell Kontakte
Stadium I	Primärtumor in situ	dereguliertes Zellwachstum	GJIC
<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;">↓</div> <div style="text-align: center;">↓</div> <div style="text-align: center;">↓ <i>Abnahme</i></div> </div>			
Stadium II	Invasiver Tumor	Zelllösung, Motilität	GJIC
<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;">↓</div> <div style="text-align: center;">↓</div> <div style="text-align: center;">↓ <i>Zunahme</i></div> </div>			
Stadium III	Metastasen	Intravasion, Extravasion	GJIC

Tab. 5: Stadien der Tumorgenese (modifiziert nach Cronier et al. 2009, S.325)

Die frühe Phase der Kanzerogenese, die Primärwachstumsphase, scheint mit einem Verlust der Connexine und der GJIC assoziiert zu sein (Mesnil et al. 2005). Im anschließenden Invasionsstadium, bei dem es zu einer Tumorzelldissoziation kommt (vgl. Abschnitt 1.2.5. „Invasion und Metastasierung“), scheint mit einer gegenläufigen Connexinexpression assoziiert zu sein.

Beispielsweise konnten *Bates et al.* 2007 an Gliomzellen zeigen, dass diese nach Cx 43-Transfektion ihr Migrationspotential erhöhen und dass sich die Invasionsbereitschaft der Tumorzellen analog zur Connexinexpression verhält. Eine verstärkte Invasivität konnte nach Transfektion unterschiedlicher Connexinsubtypen auch an der HeLa-Zelllinie beobachtet werden (Graeber und Hulser 1998). Im Metastasierungsstadium siedeln sich die Tumorzellen in anatomisch entfernten Regionen wieder an. Dabei konnte ein Wechselspiel zwischen Tumorzellen und Endothelzellen mittels GJIC in zahlreichen Karzinomzelllinien nachgewiesen werden (Xie et al. 1997, Ito et al. 2000). Im fortgeschrittenen Tumorstadium scheint die Connexinexpression wieder anzusteigen. Lymphknotenmetastasen von Mammakarzinomzellen wiesen eine erhöhte Cx 26- und Cx 43-Expression auf, welche im Stadium des Primärtumors noch negativ war (Kanczuga-Koda et al. 2006). *Kamibayashi et al.* (1995) konnten an einem Tiermodell ein vergleichbares Ergebnis für Cx 26 in Melanomen beobachten.

1.5 Fragestellung

Eine Beteiligung der Connexine an dem komplexen Prozess der Karzinogenese ist seit fast 40 Jahren bekannt. Allerdings lässt sich dieser pathogene Vorgang im Detail noch nicht nachvollziehen und es müssen intensivere Erkenntnisse darüber gewonnen werden. Nur vereinzelt vorliegende In-vivo-Studien, die sich mit der Thematik der Connexine für die Tumorentwicklung des oralen Plattenepithelkarzinoms beschäftigen, weisen zum Teil sehr unterschiedliche Ergebnisse bezüglich der Connexinexpression 26, 43 und 45 auf. Ziel dieser Arbeit war es, mit Hilfe eines etablierten Tiermodells eine Connexinexpressionsanalyse in oralen Plattenepithelkarzinomen des DMBA-induzierten Wangentaschenkarzinoms des Hamsters durchzuführen. Unter Verwendung eines immunhistochemischen Nachweises sollen Lokalisation und Quantität von Connexin 26, 43 und 45 durch das In-vivo-Hamstermodell beurteilt werden. Es wurden dabei folgende Fragestellungen untersucht:

1. Ist die orale Karzinogenese mit einer Regulation von Connexin 26, 43 und 45 auf Proteinebene assoziiert?
2. Wird die Connexinlokalisierung, insbesondere die Verteilung der oben genannten Subtypen auf Membran, Kern oder Zytoplasma, im Rahmen der oralen Karzinogenese reguliert?

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Versuchstiere

Für den Versuch wurden 90 Syrische Goldhamster (*Mesocricetus auratus*) verwendet. Die acht Wochen alten Tiere wurden im *Charles River Laboratoriers International, Inc.* herangezüchtet.

Die Vorteile dieser Tiere sind zum einen die 2,5 - 3,5 cm großen Wangentaschen, welche einen langen Verbleib der applizierten Noxe ermöglichen. Zum anderen kann die Wangentaschenschleimhaut zur Kontrolle herausgezogen und invertiert werden (vgl. Abb. 5).

Abb.5: Die rechte, zur Inspektion der Schleimhaut, herausgezogene und invertierte Wangentasche eines Hamsters.

Quelle: https://www.aalaslearninglibrary.org/fileupload_content/Course257/hamster_cheek.jpg

2.1.2 Arbeitsmaterialien

Folgende Software, Geräte und Materialien, Lösungen beziehungsweise Chemikalien wurden im Rahmen des Versuches eingesetzt:

Verwendete Software:

- Olympus dot Slide ®
(http://www.microscopy.olympus.eu/microscopes/Life_Science_Microscopes_dotSlide_-_Virtual_Slide_System.htm)
- Irfan View ® (<http://www.irfanview.com/>)
- AxioVision ® (<http://www.zeiss.de/C12567BE00459794/Contents-Frame/034CC482103B15F2412568C100451AFA>)

Verwendete Geräte und Materialien:

- Aluminiumfolie (Bunzl, Gelsenkirchen)
- Computer "HP Workstation xw6400" (Hewlett Packard GmbH, Böblingen)
- Dako Pen "S2002" (DAKO, Hamburg)
- Dampfdrucktopf "PASCAL" (DAKO, Hamburg)
- Deckgläser (MENZEL-GLÄSER, Saarbrücken)
- Einbettkassetten (Medim, Gießen)
- Gewebeinfiltrationsautomaten „TP 1020“ (Leica, Wetzlar)
- Glastrichter (Transatlantic, Bremen)
- Handschuhe "Nitra-Tex" (Ansell, Brüssel)
- Labortücher KIMTECH Science (Kimberley Clark, Koblenz)
- Messzylinder 100ml/500ml/1000ml/2000ml (Schott, Mainz)
- Mikroliterpipette 0,5-10µl (Eppendorf AG, Hamburg)
- Mikroliterpipette 5-50µl (Eppendorf AG, Hamburg)
- Mikroliterpipette 10-100µl (Eppendorf AG, Hamburg)
- Mikroliterpipette 100-1000µl (Eppendorf AG, Hamburg)
- Mikrotom „2035“ (Reichert-Jung, Wetzlar)

- Mikrotomklingen „R 35“ (Feather, Osaka)
- Objektträger „Super Frost“ (Roth, Karlsruhe)
- Objektträger (MENZEL-GLÄSER, Saarbrücken)
- Paraffinausgießstation (Medim, Gießen)
- Parafilm (American National Can, Greenwich, USA)
- Photomikroskop mit Scanner “Olympus BX 51” (Olympus GmbH, Hamburg)
- Pipettenspitzen (Eppendorf AG, Hamburg)
- Pipettenspitzen “Tip one” (starlab, Hamburg)
- Polyethylenfolien (Heraeus Kulzer GmbH, Hanau)
- Reagenzglasschüttler “Reamix-2789” (Assistant, Sondheim)
- Skalpell „techno cut“ (HMD Healthcare Ltd., Hereford, UK)
- Tiefkühlschrank (GFL, Burgwedel)
- Waage “Mettler PM460 Delta Range” (Mettler Instruments GMBH, Giessen)
- Zellstofftupfer (Fuhrmann GmbH, Much)
- Zentrifuge “3531” (ABBOTT, Ludwigshafen)

Verwendete Lösungen:

- Liquid DAB + Substrate Chromogen System “K3465” (DAKO, Hamburg)
 - 1ml DAB Chromogen (Diaminobenzidin in Chromogenlösung)
 - 15ml DAB Substrat-Puffer (Imidazol-HCL-Puffer pH 7,5)
 - 1 Tropfen DAB-Chromogen pro ml Substrat-Puffer
- Target Retrieval Solution pH 9 (10x) “S2367” (DAKO, Hamburg)
 - TRIS/EDTA-Puffer und Aqua dest. im Verhältnis 1:10 ansetzen

- TBST Tris Puffer Saline (10X) mit Tween 20 "S3306"(DAKO, Hamburg)
 - vor Gebrauch im Verhältnis 1:10 mit Aqua dest. verdünnen, die entstandene Lösung (=TTBS) besteht dann aus:
0,05mol/L Tris HCL, 0,3 mo/L NaCl, 0,1%Tween 20 und 0,01% Konservierungsmittel ph 7,6
- Citratpuffer pH 6 "S2367" (DAKO, Hamburg)
- Peroxidase Blocker "S2001" (DAKO, Hamburg)
- Antikörper Diluent "S3022" (DAKO, Hamburg)
 - dient als Verdünnungsmittel beim Ansatz des primär AK
(siehe Protokoll für den immunhistochemischen Nachweis).

Verwendete Chemikalien:

- Aqua dest. (eigene Herstellung)
- Ethanol absolut (GeReSo, Darmstadt)
- Entellan (Merck Millipore, Darmstadt)
- Formalin (Baker, Deventer)
- Häkalaun nach Meyer (Merck, Darmstadt)
- Isopropanol (Merck, Darmstadt)
- Xylol (Roth, Karlsruhe)
- Paraffin

2.1.3 Antikörper

Für den immunhistochemischen Nachweis der Connexine wurden folgende Antikörper eingesetzt:

Antikörper für Connexin 26

Primärantikörper: polyklonaler Kaninchen-Antikörper ab38584 (abcam, Cambridge, UK)

Sekundärantikörper: 1 Tropfen En Vision "K4063" (DAKO Hamburg)

Antikörper für Connexin 43

Primärantikörper: polyklonaler Kaninchen-Antikörper "3512" (Cell Signaling, Frankfurt am Main)

Sekundärantikörper: 1 Tropfen En Vision "K4063" (DAKO, Hamburg)

Antikörper für Connexin 45

Primärantikörper: polyklonaler Kaninchen-Antikörper " # AB1745" (Milipore Cat., Darmstadt)

Sekundärantikörper: 1 Tropfen En Vision "K4063" (DAKO, Hamburg)

2.2 Tierversuch

2.2.1 Behandlungsplan

Die Behandlung begann nach einer zweiwöchigen Eingewöhnungsphase der Goldhamster. Dabei wurde das Applikationsschema nach Salley (Salley 1954) verwendet. Mit Hilfe eines Feinhaarpinsels (Gr. 4) wurde dreimal pro Woche (montags, mittwochs und freitags) die gruppenzugehörige Testsubstanz in die rechte Wangentasche appliziert. In Abhängigkeit von der Gruppeneinteilung wurde 9,10-Dimethyl-1,2-Benzanthrazen (DMBA) oder Mineralöl nach Abhalten der Wange in die rechte Wangentasche gepinselt (vgl. Abb. 6, S. 28). Eine Kontrollgruppe wurde von der Applizierung ausgenommen. Die linke Wangentasche blieb unbehandelt, damit im Verlaufe der Tumorprogression den Tieren weiterhin eine natürliche Nahrungsaufnahme möglich war. Eine wöchentliche Gewichtskontrolle diente zur Überprüfung des Allgemeinzustandes der Syrischen Goldhamster.

Es wurden drei Gruppen mit jeweils 30 Tieren gebildet. Die Applikation der Testsubstanz erfolgte bei Gruppe A über 10 Wochen, bei Gruppe B über 14 Wochen und bei

Gruppe C über 14 Wochen mit anschließenden 5 Wochen ohne Behandlung, in denen das Tumorwachstum weiter fortschreiten konnte.

Eine weitere Unterteilung fand innerhalb der Gruppen statt. Dabei wurden wiederum drei Gruppen mit jeweils 10 Versuchstieren gebildet. In diesen Untergruppen erhielten 10 Tiere DMBA-Behandlung, 10 Tiere eine Mineralölbehandlung (Kontrollgruppe 1), damit ein eventueller Einfluss des Mineralöls auf die Mundschleimhaut ausgeschlossen werden kann. Bei den restlichen 10 Tieren wurde keine Behandlung durchgeführt (Kontrollgruppe 2) (vgl. Tab. 6 Behandlungsplan). Die Diagnose „Plattenepithelkarzinom“ wurde durch die abschließende Gewebeentnahme und histologische Aufbereitung mit HE-Färbung bestätigt.

Gruppe	DMBA 0,5% in Mineralöl	Mineralöl (Kontrollgruppe 1)	Leerbildung (Kontrollgruppe 2)
Regime A	10	10	10
Regime B	10	10	10
Regime C	10	10	10

Tab. 6: Behandlungsplan

Regime A: 10 Wochen lokale Applikation der entsprechenden Substanz → direkte Gewebeentnahme.
Regime B: 14 Wochen lokale Applikation der entsprechenden Substanz → direkte Gewebeentnahme.
Regime C: 14 Wochen lokale Applikation der entsprechenden Substanz → Gewebeentnahme erst nach 5 weiteren Wochen Tumorwachstum (14+5 Wochen).

Abb.6: Applizierung der gruppenspezifischen Testsubstanz in die rechte Wangentasche (Foto aus der Arbeitsgruppe).

2.2.2 Probeentnahme

Nach Opfierung der Hamster durch CO₂-Narkose und intrapulmonaler T61-Injektion wurde das Tumor- und Kontrollgewebe entnommen. Hierbei wurde die Mundschleimhaut aus der rechten und linken Wangentasche exzidiert (vgl. nachfolgende Abbildung 7). Die Tumoren wurden bevorzugt für die RNA - Analyse in RNAlater inkubiert. Bei ausreichender Größe ruhte die native Lagerung eines Tumoranteils für die vorliegende Arbeit bei -80°C bis zur weiteren Verwendung.

Abb.7: Exzidierte Wangentasche eines Syrischen Goldhamsters vor der Weiterbehandlung des Gewebes (Foto aus der Arbeitsgruppe).

2.2.3 Tierversuchsantrag

Nach Prüfung des Tierversuchs (Antragsnummer: AZ 33.14.42502-04-066/08) durch das Niedersächsische Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit wurde am 17.09.2008 die Genehmigung zur Versuchsdurchführung erteilt.

2.3 Vorarbeiten

2.3.1 Einbettung des Gewebes

Mit Hilfe des Gewebeeinfiltrationsautomaten „TP 1020“ wurde das entnommene Gewebe dehydriert, anschließend in Xylol als Intermedium überführt und in Paraffin eingebettet. Der Ablauf der Einbettung und der Dehydrierung fand wie folgt statt:

70% Ethanol	1 Stunde
70% Ethanol	1 Stunde 12 Minuten
90% Ethanol	1 Stunde 12 Minuten
96% Ethanol	1 Stunde 12 Minuten
96% Ethanol	1 Stunde 12 Minuten
100% Ethanol	1 Stunde 12 Minuten
100% Ethanol	1 Stunde 12 Minuten
100% Ethanol	1 Stunde 12 Minuten
Xylol	1 Stunde 12 Minuten
Xylol	1 Stunde 12 Minuten
Paraffin	1 Stunde
Paraffin	1 Stunde

Tab. 7.: Protokoll für die Einbettung der Gewebeproben

2.3.2 Anfertigung der Schnitte

Die Paraffinblöcke mussten auf -20°C gekühlt und mindestens zwei Stunden gelagert werden. Anschließend wurden mit Hilfe des Mikrotoms „2035“ Schnitte mit einer Schichtdicke von 3 µm angefertigt. Als nächster Schritt wurden diese auf einem Kältewasserbad (ca. 20°C) aufgefangen, danach auf einem Heißwasserbad (ca. 45°C) gestreckt, um abschließend auf einen Objektträger aufgezogen zu werden. Abschließend wurden die histologischen Schnitte bei 37°C bis 45°C über Nacht getrocknet, damit sie am nächsten Morgen der histologischen Untersuchung zur Verfügung stehen konnten.

2.3.3 Entparaffinierung und Rehydrierung der Schnitte

Die Entparaffinierung und Überführung der Schnitte unter dem Abzug in ein wässriges Milieu liefen nach folgendem Protokoll ab:

Xylol	5 Minuten
Xylol	5 Minuten
Xylol	5 Minuten
100% Ethanol	3 Minuten
100% Ethanol	3 Minuten
100% Ethanol	3 Minuten
96% Ethanol	3 Minuten
96% Ethanol	3 Minuten
70% Ethanol	3 Minuten
40% Ethanol	3 Minuten
Aqua dest.	3 Minuten
Aqua dest.	3 Minuten

Tab. 8: Entparaffinierung und Rehydrierung

2.3.4 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung)

Zur exakten histopathologischen Diagnosestellung wurde je ein Schnitt pro Paraffinblock zusätzlich in Hämatoxylin-Eosin gefärbt.

Xylol	5	Minuten
Xylol	5	Minuten
Absolutes Ethanol	3	Minuten
Absolutes Ethanol	3	Minuten
Absolutes Ethanol	3	Minuten
96% Ethanol	2	Minuten
75% Ethanol	2	Minuten
Aqua dest.	1	Minute
Hämalaun nach Mayer	4	Minuten
Aqua dest.	1	Minute
Fließendes Leitungswasser	10	Minuten
Eosin	3-5	Minuten
Aqua dest.	1	Minute
75% Ethanol	1	Minute
96% Ethanol	1	Minute
96% Ethanol	1	Minute
Absolutes Ethanol	2	Minuten
Absolutes Ethanol	2	Minuten
Absolutes Ethanol	2	Minuten
Xylol	2	Minuten
Xylol	2	Minuten
Xylol	2	Minuten

Tab. 9: Hämatoxylin-Eosin-Färbeprotokoll

Abschließend wurden die Präparate unter dem Abzug mit einem xylollöslichem Eindeckmittel (Entellan®) und Deckgläschen eingedeckt und über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet.

2.3.5 Randomisierung

Mit Hilfe einer Excel®-Tabelle wurden Zufallszahlen für die angefertigten Schnitte generiert. Dadurch war es der Pathologin möglich, ohne direkt die Art des Gewebes zu kennen, eine unvoreingenommene semiquantitative Untersuchung der Schnitte durchzuführen (vgl. 2.6.2, S. 36).

2.4 Immunhistochemischer Nachweis von Connexin 26, 43 und 45

Im folgenden Abschnitt werden die Protokolle für die immunhistochemischen Nachweise der untersuchten Connexine, die Gegenfärbung und die Dehydrierung und Eindeckung der Präparate wiedergegeben.

2.4.1 Protokoll für den immunhistochemischen Nachweis von Cx 26

Demaskierung: Inkubation im Dampfdrucktopf (Pascal, DAKO)	TRIS/EDTA-Puffer pH 9,0 20 Min. bei 90°C
Abkühlen lassen	20 Min.
Waschen und Trocknen um den Schnitt	5X2 Min. TTBS pH 7,6
Blocken der endogenen Peroxidase	12 Min. Peroxidase-Blocker
Waschen und Trocknen um den Schnitt	5X2 Min. TTBS pH 7,6
Schnitt mit Stift umrahmen	DAKO Pen
Inkubation mit Primärantikörper	12 Std. Polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen CX 45, Verdünnung 1:50 (4µl AK + 96µl AK Diluent), mit PE Folie abdecken und in feuchter Kammer bei 4°C lagern
Waschen und Trocknen um den Schnitt	5X2 Min. TTBS pH 7,6
Inkubation mit Sekundärantikörper	1 Tropfen En Vision 30 Min. in feuchter Kammer bei Raumtemperatur lagern
Waschen und Trocknen um den Schnitt	5X2 Min. TTBS pH 7,6
Detektion der immunhistochemischen Reaktion	5 Min. DAB-Lösung (1ml Substrat :1 Tropfen Liquid DAB Cromogen), Mikroskopkontrolle

Tab.10: Protokoll für den immunhistochemischen Nachweis von Cx 26

2.4.2 Protokoll für den immunhistochemischen Nachweis von Cx 43

Demaskierung: Inkubation im Dampfdrucktopf (Pascal, DAKO)	TRIS/EDTA-Puffer pH 9,0 DAKO, 20 Min. bei 90°C
Abkühlen lassen	20 Min.
Waschen und Trocknen um den Schnitt	5X2 Min. TTBS pH 7,6
Blocken der endogenen Peroxidase	12 Min. Peroxidase-Blocker
Waschen und Trocknen um den Schnitt	5X2 Min. TTBS pH 7,6
Schnitt mit Stift umrahmen	DAKO Pen

Inkubation mit Primärantikörper	12 Std. Polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen CX 43, Verdünnung 1:50 (4µl AK + 96µl AK Diluent), mit PE Folie abdecken und in feuchter Kammer bei 4°C lagern
Waschen und Trocknen um den Schnitt	5X2 Min. TTBS pH 7,6
Inkubation mit Sekundärantikörper	1 Tropfen En Vision 30 Min. in feuchter Kammer bei 4°C lagern
Waschen und Trocknen um den Schnitt	5X2 Min. TTBS pH 7,6
Detektion der immunhistochemischen Reaktion	5 Min. DAB-Lösung (1ml Substrat :1 Tropfen Liquid DAB Cromogen), Mikroskopkontrolle

Tab. 11: Protokoll für den immunhistochemischen Nachweis von Cx 43

2.4.3 Protokoll für den immunhistochemischen Nachweis von Cx 45

Demaskierung: Inkubation im Dampfdrucktopf (Pascal, DAKO)	Citratpuffer pH 6,0, 30 Sec. bei 125°C und anschließend 10 Sec. bei 90 °C
Abkühlen lassen	20 Min.
Waschen und Trocknen um den Schnitt	5X2 Min. TTBS pH 7,6
Blocken der endogenen Peroxidase	12 Min. Peroxidase-Blocker
Waschen und Trocknen um den Schnitt	5X2 Min. TTBS pH 7,6
Schnitt mit Stift umrahmen	DAKO Pen
Inkubation mit Primärantikörper	Polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen CX 45, Verdünnung 1:100 (1µl AK + 99µl AK Diluent), mit PE Folie abdecken und in feuchter Kammer bei 4°C 2 Std. lagern
Waschen und Trocknen um den Schnitt	5X2 Min. TTBS pH 7,6
Inkubation mit Sekundärantikörper	1 Tropfen En Vision 30 Min. in feuchter Kammer bei 4°C lagern
Waschen und Trocknen um den Schnitt	5X2 Min. TTBS pH 7,6
Detektion der immunhistochemischen Reaktion	5 Min. DAB-Lösung (1ml Substrat :1 Tropfen Liquid DAB Cromogen), Mikroskopkontrolle

Tab. 12: Protokoll für den immunhistochemischen Nachweis von Cx 45

Im Anschluss musste bei allen Präparaten die DAB-Reaktion mit Hilfe von destilliertem Wasser gestoppt werden:

Aqua dest.	4x1 Min.
Aqua dest.	5 Min.

Tab. 13: Stoppen der DAB-Reaktion

2.4.4 Gegenfärbung

Gegenfärbung der histologischen Schnitte mit Hämalaun nach Mayer:

Hämalaun nach Mayer	30 Sec.
Fließendes Leitungswasser	10 Min.

Tab. 14: Gegenfärbung mit Hämalaun nach Mayer

2.4.5 Dehydrierung und Eindecken der Präparate

Dehydrierung der Gewebeschnitte in aufsteigender Alkoholreihe:

Aqua dest.	3 Minuten
Aqua dest.	3 Minuten
75% Ethanol	3 Minuten
96% Ethanol	3 Minuten
96% Ethanol	3 Minuten
100% Ethanol	3 Minuten
100% Ethanol	3 Minuten
100% Ethanol	3 Minuten
Xylol	3 Minuten
Xylol	3 Minuten
Xylol	3 Minuten

Tab.15: Dehydrierung

Abschließend wurden die Präparate unter dem Abzug mit einem xylollöslichen Eindeckmittel (Entellan®) und Deckgläschen eingedeckt und über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet.

2.5 Dokumentation der Ergebnisse

Zur weiteren Bearbeitung wurden alle Präparate mit Hilfe eines Photomikroskops und einem angeschlossenen Scanner (Olympus BX 51 ®) digitalisiert. Die eingescannten Schnitte wurden durch die Software (Olympus dot Slide ®) zuerst als vsi. Datei gespeichert und mussten anschließend für die weitere Verwendung noch in eine tif. Datei umgewandelt werden. Abschließend wurde diese Multipage Bilddatei (tif. Datei) durch das Programm Irfan View ® in seine vier Ebenen aufgeteilt. Die

dritte Ebene wurde als JPEG-Datei gespeichert. Mit dieser erfolgte die weitere Auswertung.

2.6 Quantitative und semiquantitative Auswertung

Es wurde sowohl eine quantitative als auch eine semiquantitative Auswertung durchgeführt.

2.6.1 Quantitative Auswertung

Die quantitative Bestimmung der immunhistochemischen Färbung der Connexine erfolgte mit Hilfe des Axio Vison® Programms. Dieses Programm verfügt über einen Skript-Editor, mit dem die entsprechenden Messparameter festgelegt werden können. Zuerst musste ein brauner Farbton bestimmt werden, der farblich der immunhistochemischen Färbung der Connexine entsprach. Anschließend wurde das zu bewertende Gewebeareal mit Hilfe des Mauszeigers gekennzeichnet. Das Skript berechnete den Prozentsatz der „braungefärbten Fläche“ in dem zu bewertenden Areal.

Den histopathologischen Befunden wurde für die Auswertung ein entsprechender Zahlencode zugeordnet.

Befund	Code
gesunde Mukosa	1
Hyperkeratose	2
Hyperplasie	3
Dysplasie	4
mikroinvasives Karzinom	5
gut differenziertes Karzinom	6
mäßig differenziertes Karzinom	7
Hornperle	8

Tab.16: Quantitative Methode

Die Ergebnisse dieser Auswertung sind im Anhang 1 (vgl. S. 73 ff) dargestellt.

2.6.2 Semiquantitative Auswertung

Die semiquantitative Bestimmung führte Frau Dr. med. Julia Kitz, eine erfahrene Pathologin, durch. Es wurde mikroskopisch die Intensität der Braunfärbung des Gewebes von Kern, Plasma und Membran aller Präparate bestimmt. Zu dieser semiquantitativen Bestimmung wurden die Zahlen 0, 1, 2 und 3 für die Farbintensität wie folgt vergeben. Die Ergebnisse sind im Anhang 2 (vgl. S.84 ff) dargestellt.

Zahlen	Farbintensität des Präparates
0	negative Farbausprägung
1	schwache Farbausprägung
2	mittlere Farbausprägung
3	starke Farbausprägung

Tab.17: Semiquantitative Methode

Die histologische Aufarbeitung durch eine zusätzliche HE-Färbung der Präparate aus der gleichen Sequenz der immunhistochemischen Connexinfärbung sicherte die Diagnose der malignen Transformationen.

2.7 Statistische Analyse

Mit Hilfe der Statistik-Software „STATISTICA“ (<http://www.statsoft.de/produkte.html>) wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse, eine sogenannte ANOVA, zur Auswertung der Expressionsunterschiede von Connexin 26, 43 und 45 durchgeführt.

Die Aufarbeitung der semiquantitativen Auswertung erfolgte durch einen FISHER-Test, welcher mittels der Programmiersprache „R“ (<http://www.r-project.org/>) realisiert wurde. Signifikante Unterschiede wurden bei p-Werten unter 0,05 angenommen.

3 Ergebnisse

3.1 Präparate (HE-Färbung) der malignen Transformationen

In Abhängigkeit vom Behandlungszeitpunkt der Hamster mit DMBA konnten bei der späteren histologischen Untersuchung deutliche kanzerogene Veränderungen diagnostiziert werden. Die nachfolgenden Abbildungen 8 - 12 der Präparate (HE-Färbung) zeigen diese malignen Transformationen wie Hyperkeratose, Hyperplasie, Dysplasie, mikroinvasives Karzinom, gut differenziertes Karzinom oder mäßig differenziertes Karzinom:

Abb. 8: Gewebeschnitt – gesunde Mukosa

Abb. 9: Gewebeschnitt – Dysplasie und mikroinvasives Karzinom

Abb. 10: Gewebeschnitt – mikroinvasives Karzinom

Abb. 11: Gewebeschnitt – mäßig differenziertes Karzinom

Abb. 12: Gewebeschnitt – Hyperkeratose und gut differenziertes Karzinom

3.2 Immunhistochemische Färbungen

Die nachfolgenden Abbildungen 13 - 30 verdeutlichen die differentielle Connexin-expression der Subtypen 26, 43 und 45 im Verlauf der oralen Karzinogenese. Die Ergebnisse der quantitativen Auswertung sind im Anhang 1 (vgl. S. 73 ff) dargestellt. Die für die Abbildungen verwendeten Präparate sind dort mit a – i gekennzeichnet. Zusätzlich wird die subzelluläre Verteilung auf Kern, Plasma und Membran gezeigt. Die Farbintensität der Präparate wurde entsprechend der Tabelle 17 (vgl. S. 36) vorgenommen. Nach dem jeweiligen Gewebeschnitt wird jeweils ein Detaillausschnitt des entsprechenden Präparates dargestellt. Dieser ist im Gewebeschnitt durch einen Rahmen gekennzeichnet.

3.2.1 Connexin 26

Abb. 13: Gewebeschnitt – gesunde Mukosa (Präparat Cx26Nr2-13,6re,a; Vergr.10fach)

Abb. 14: Gewebeschnitt – gesunde Mukosa, Detailausschnitt aus Abb. 13 (Vergr.70fach)

Der braungefärbte Anteil der gesunden Mukosa wurde mit 93,9% ermittelt. Im Rahmen der semiquantitativen Auswertung wurde für Kern eine schwache, Plasma eine mittlere und Membran eine negative Farbausprägung bestimmt.

Abb. 15: Gewebeschnitt – Dysplasie (Präparat Cx26 Nr 42-9re,i; Vergr. 4fach)

Abb. 16: Gewebeschnitt – Dysplasie, Detailausschnitt aus Abb. 15 (Vergr. 30fach)

Der Braunanteil der Dysplasie zeigte im vorliegenden Detailausschnitt einen Wert von 4,7%. Auf subzellulärer Ebene wurde für Kern und Plasma eine schwache und Membran eine negative Farbausprägung ermittelt.

Abb. 17: Gewebeschnitt – gut bis mäßig differenziertes Karzinom
(Präparat Cx26 Nr31-4re,e;Vergr.4fach)

Abb. 18: Gewebeschnitt – gut bis mäßig differenziertes Karzinom,
Detailausschnitt aus Abb. 17 (Vergr.30fach)

Die quantitative Auswertung der Färbung ergab einen Braunanteil von 8,9%. Für Kern und Membran wurde eine negative und Plasma eine schwache Farbausprägung ermittelt.

3.2.2 Connexin 43

Abb. 19: Gewebeschnitt – gesunde Mukosa (Präparat Cx43Nr2-13,6re,b; Vergr.10fach)

Abb. 20: Gewebeschnitt – gesunde Mukosa, Detaillausschnitt aus Abb. 19 (Vergr.70fach)

Der braungefärbte Anteil der gesunden Mukosa wurde mit 87,3% ermittelt. Im Rahmen der semiquantitativen Auswertung wurde für Kern eine negative, Plasma eine mittlere und Membran eine negative Farbausprägung bestimmt.

Abb. 21: Gewebeschnitt – Dysplasie (Präparat Cx43 Nr6-13,8re,c;Vergr.10fach)

Abb. 22: Gewebeschnitt – Dysplasie, Detaillausschnitt aus Abb. 21 (Vergr.80fach)

Für den vorliegenden Detaillausschnitt wurde ein Braunanteil von 30,7% ermittelt. Die subzelluläre Verteilung zeigte für Kern eine schwache, Plasma eine mittlere und Membran eine starke Farbausprägung.

Abb. 23: Gewebeschnitt – gut bis mäßig differenziertes Karzinom
(Präparat Cx43 Nr31-4re,f; Vergr.4fach)

Abb. 24: Gewebeschnitt – gut bis mäßig differenziertes Karzinom,
Detailausschnitt aus Abb. 23 (Vergr.30fach)

Die quantitative Auswertung der Färbung ergab einen Braunanteil von 47,4%. Im Rahmen der semiquantitativen Auswertung wurde für Kern eine negative und für Plasma und Membran eine mittlere Farbausprägung bestimmt.

3.2.3 Connexin 45

Abb. 25: Gewebeschnitt – gesunde Mukosa (Präparat Cx45 Nr35-6li,h;Vergr.8fach)

Abb. 26: Gewebeschnitt – gesunde Mukosa, Detaillausschnitt aus Abb. 25 (Vergr.100fach)

Die quantitative Auswertung der gesunden Mukosa im vorliegenden Detaillausschnitt ergab einen Braunanteil von 73,1%. Im Rahmen der semiquantitativen Auswertung wurde für Kern eine negative, Plasma eine mittlere und Membran eine negative Farbausprägung bestimmt.

Abb. 27: Gewebeschnitt – Dysplasie (Präparat Cx45 Nr34-5re,g;Vergr.4fach)

Abb. 28: Gewebeschnitt – Dysplasie, Detaillausschnitt aus Abb. 27(Vergr. 80fach)

Die quantitative Auswertung der Färbung im vorliegenden Detaillausschnitt ergab einen Braunanteil von 29,6%. Auf subzellulärer Ebene wurde für Kern eine negative, Plasma eine schwache und Membran eine negative Farbausprägung bestimmt.

Abb. 29: Gewebeschnitt – microinvasives Karzinom
(Präparat Cx45 Nr.29-3re,d;Vergr.4fach)

Abb. 30: Gewebeschnitt – microinvasives Karzinom, Detaillausschnitt aus Abb. 29 (Vergr. 30fach)

Die quantitative Auswertung der Färbung ergab einen Braunanteil von 44,1%. Im Rahmen der semiquantitativen Auswertung wurde für Kern eine mittlere, für Plasma eine schwache und Membran eine negative Farbausprägung bestimmt.

3.3 Differentielle Connexinexpression der Subtypen 26, 43 und 45 im Verlauf der oralen Karzinogenese

Mit Hilfe eines immunhistochemischen Nachweises wurde die Expression der Connexinsubtypen 26, 43 und 45 auf Proteinebene bei der oralen Karzinogenese untersucht und beurteilt. Es wurden drei unterschiedliche Ansätze verfolgt. Im ersten Ansatz wurde die Connexinverteilung zwischen gesunder Mukosa, dysplastischem Gewebe und Karzinom dargestellt. Im zweiten Ansatz wurde das Expressionsverhalten innerhalb des Karzinoms, d. h. von mikroinvasivem, gut differenziertem und mäßig differenziertem Karzinom, in Relation gesetzt. Der dritte Ansatz zeigte differentielle Connexinexpressionsmuster von gesunder Mukosa, gesunder Mukosa basal und gesunder Mukosa luminal. Die Grundlagen für die durchgeführten einfaktoriellen Varianzanalysen waren die Daten aus Anhang 1 (vgl. S. 73 ff).

Die Abbildungen 31, 32 und 33 stellen das Connexinexpressionsmuster für gesunde Mukosa, dysplastische Läsionen und Plattenepithelkarzinome in Relation.

Abb. 31: Cx 26-Expressionsmuster in Relation zu gesunder Mukosa, dysplastischen Läsionen und Plattenepithelkarzinom

Für den Connexinsubtyp 26 war ein Rückgang der Expression im Verlauf der oralen Karzinogenese zu erkennen. Der p-Wert lag mit 0,04568 unter dem Signifikanzniveau von 0,05.

Abb. 32: Cx 43-Expressionsmuster in Relation zu gesunder Mukosa, dysplastischen Läsionen und Plattenepithelkarzinom

Das Connexin 43-Expressionsmuster zeigte im Laufe der Karzinogenese einen Abfall zwischen gesunder Mukosa und Dysplasie. Zwischen dysplastischer Läsion und Karzinom war ein leichter Anstieg zu erkennen.

Abb. 33: Cx 45-Expressionsmuster in Relation zu gesunder Mukosa, dysplastischen Läsionen und Plattenepithelkarzinom

Das Connexin 45 ließ ebenfalls eine Rückläufigkeit der Expression während der malignen Transformation erkennen. Der P-Wert betrug 0,00001.

3 Ergebnisse

Die Abbildungen 34, 35 und 36 geben Auskunft über den Expressionsverlauf der Connexine im Rahmen der histologischen Einteilung mikroinvasives Karzinom, mäßig differenziertes Karzinom und gut differenziertes Karzinom.

Abb. 34: Cx 26-Expressionsmuster in Relation zu mikroinvasiven Karzinomen, gut differenzierten Karzinomen und mäßig differenzierten Karzinomen

Connexin 26 zeigte keine signifikante Expressionsverschiebung beim Vergleich der histologischen Proben zwischen mikroinvasivem Karzinom, gut differenziertem Karzinom und mäßig differenziertem Karzinom. Der Signifikanzwert betrug 0,46019.

Abb. 35: Cx 43-Expressionsmuster in Relation zu mikroinvasiven Karzinomen, gut differenzierten Karzinomen und mäßig differenzierten Karzinomen

Die Expression von Connexin 43 blieb im Laufe der Karzinomdifferenzierung relativ konstant. Das Signifikanzniveau von $p=0,05$ wurde mit einem p-Wert von 0,53979 nicht erreicht.

Abb. 36: Cx 45-Expressionsmuster in Relation zu mikroinvasiven Karzinomen, gut differenzierten Karzinomen und mäßig differenzierten Karzinomen

Das Connexin 45-Expressionsmuster ließ einen Abfall vom mikroinvasiven Karzinom über das gut differenzierte Karzinom zum mäßig differenzierten Karzinom erkennen. Allerdings konnte man bei einem p-Wert von 0,09143 nicht von einem signifikanten Unterschied sprechen.

Die Abbildungen 37, 38 und 39 vergleichen die Connexinexpression des basalen Anteiles mit dem luminalen Anteil der gesunden Mukosa.

Abb. 37: Cx 26-Expressionsmuster in Relation zu gesunder Mukosa, gesunder Mukosa basal und gesunder Mukosa luminal

Das Connexin 26 zeigte keine signifikante Verteilung. Der p-Wert betrug 0,21700.

Abb. 38: Cx 43-Expressionsmuster in Relation zu gesunder Mukosa, gesunder Mukosa basal und gesunder Mukosa luminal

Auch das Connexin 43 zeigte, mit einem p-Wert von 0,42651, keine Signifikanz.

Abb. 39: Cx 45-Expressionsmuster in Relation zu gesunder Mukosa, gesunder Mukosa basal und gesunder Mukosa luminal

Im Gegensatz zu den Connexinen 26 und 43 zeigte das Connexin 45 mit einem p-Wert von 0,02101 ein signifikantes Verteilungsmuster.

3.4 Intrazelluläre Connexinverteilung auf Membran, Kern und Zytoplasma

Der Fisher-Test lieferte für die Connexinlokalisation, d. h. die Verteilung der Subtypen auf Membran, Kern oder Zytoplasma, folgende Resultate:

	Membran	Kern	Zytoplasma
Cx 26	p = 1,0	p = 0,1185185	p = 0,04440401
Cx 43	p = 0,6290338	p = 0,1666667	p = 0,05354627
Cx 45	p = 1,0	p = 0,3316675	p = 0,000461335

Tab. 18: p-Werte für die Zahlenverteilung (0=negativ, 1=schwach gefärbt, 2=mäßig gefärbt, 3=stark gefärbt) in allen drei Klassen (Gesund, Dysplasie, Karzinom) für die einzelnen Connexine

Die Grundlage der obigen Tabelle waren die Daten aus Anhang 2 und 3 (vgl. S.84 ff und S.91 f).

Lediglich bei der Plasmaverteilung gab es signifikante Unterschiede mit $p = 0,04440401$ bei Connexin 26 und $p = 0,000461335$ bei Connexin 45. Connexin 43 überschreitet mit seinem p-Wert von 0,05354627 das Signifikanzniveau von $p = 0,05$ nur sehr geringfügig. Die Verteilung der Connexine 26, 43 und 45 auf Kern und Membran zeigte keine relevanten differentiellen Expressionsabweichungen zwischen gesunder Mundschleimhaut, dysplastischem Gewebe und Karzinom.

Die nachfolgenden Abbildungen 40, 41 und 42 verdeutlichen die Disparitäten der Plasmaverteilung.

Abb. 40: Cx 26-Plasmaverteilung in Relation zu gesunder Mukosa, Dysplasie und Karzinom

Das Säulendiagramm (Abb.40) zeigte eine unterschiedliche intrazelluläre Connexin 26-Plasmaverteilung. Zwischen der ersten Säule (gesunde Mukosa) und der dritten

Säule (Karzinom) war eine Abnahme der Farbintensität zu erkennen. Stark gefärbte Präparate waren lediglich in gesunder Mukosa mit einem Anteil von 7% nachweisbar.

Abb. 41: Cx 43-Plasmaverteilung in Relation zu gesunder Mukosa, Dysplasie und Karzinom

Die Abbildung 41 zeigte auch eine verringerte Farbintensität im Laufe der Karzinogenese für die Connexin 43-Plasmaverteilung. Stark gefärbte Präparate hatten in der gesunden Mukosa einen Anteil von 41% und im dysplastischen Gewebe einen Anteil von 20%. Im Karzinom konnten nur noch mittlere und schwache Farbintensitäten nachgewiesen werden.

Abb. 42: Cx 45-Plasmaverteilung in Relation zu gesunder Mukosa, Dysplasie und Karzinom

Aus dem Säulendiagramm (Abb. 42) konnte man für die Connexin 45-Plasmaverteilung eine starke Färbung von 7% bei der gesunden Mukosa erkennen. Beim dysplastischen Gewebe war keine starke Färbung mehr sichtbar. Diese war jedoch im Karzinom mit einem Anteil von 22% wieder nachweisbar.

4 Diskussion

4.1 Tiermodell

Das für den Versuch eingesetzte Tiermodell, die Karzinominduktion durch DMBA in die Wangentasche des Hamsters, ist eine bekannte und gut etablierte Methode zur Untersuchung oraler Plattenepithelkarzinome. Die Karzinominitiation durch DMBA wird seit 1954 angewendet und hat sich gegenüber anderen Versuchsaufbauten, wie beispielsweise mit Maus oder Ratte, aufgrund ihrer Wirksamkeit durchgesetzt (Mognetti et al. 2006, Salley 1954). Nach *Nagini* (2009) gleicht das Wangentaschenkarzinom des Syrischen Goldhamsters makroskopisch und histologisch dem humanen oralen Plattenepithelkarzinom. Ähnliche aberrante Programmierung von Signaltransduktionswegen, eine erhöhte Zellproliferation und eine verringerte Apoptose kennzeichnen sowohl das orale Plattenepithelkarzinom des Hamsters wie auch das des Menschen (Nagini 2009). Laut *Vairaktaris et al.* (2008) zeigen sich in allen Stadien der Tumorgenese analoge Expressionsmuster von Tumorsuppressorgenen, Zellproliferationsmarkern und Apoptosemarkern im Vergleich zum humanen Plattenepithelkarzinom.

Allerdings fehlt der Wangentasche des Hamsters eine lymphatische Drainage und somit die Möglichkeit, Medikamente oder Moleküle zu akkumulieren (Tanaka et al. 2011). Als weitere Differenz ist das maligne Wachstum bekannt, welches beim Syrischen Goldhamster meist exophytisch und beim Menschen überwiegend ulzerierend verläuft. Daher sollte man beide Plattenepithelkarzinome nicht als absolut gleichwertig ansehen.

Bei der vorliegenden Arbeit wird ein etabliertes In-vivo-Modell angewendet. Wie im Ergebnisteil bereits gezeigt, konnten in Abhängigkeit vom Behandlungszeitpunkt bei der histologischen Untersuchung deutliche kanzerogene Veränderungen der Gewebeschnitte wie Hyperkeratose, Hyperplasie, Dysplasie, mikroinvasive Karzinome, gut differenzierte Karzinome oder mäßig differenzierte Karzinome festgestellt werden.

4.2 Immunhistochemie

Die immunhistochemische Färbung wird in der Histologie und der Diagnostik speziell von Tumorerkrankungen als Standardverfahren angesehen. Sie dient der Darstellung von Antigenen im Gewebeschnitt, die eine anschließende Beurteilung der Expression der Proteine, der Intensität der Färbung und des Ortes der Expression ermöglicht (Boenisch 2000). In der vorliegenden Arbeit handelt es sich um die Connexine 26, 43 und 45.

Vereinzelt werden Connexine erst auf Proteinebene reguliert (Langlois et al. 2010) und nach *Xia et al.* (2009) kann es ungeachtet einer normalen Transkription von mRNA zu einer verminderten Proteinquantität kommen.

Aus diesem Grund war der hier vorliegende immunhistochemische Ansatz wichtig, um die Connexinexpression auf Proteinebene darstellen und differenzieren zu können.

4.3 Expressionsverhalten

4.3.1 Connexin 26

Ein konzentriertes Auftreten von Connexin 26 findet in Hepatozyten, Keratinozyten und den Sinnesepithelzellen der Cochlea statt. Eine Mutation dieses Connexinsubtyps kann zu einer angeborenen Innenohrschwerhörigkeit und hyperkeratotischen Entwicklungsstörungen der Haut, wie beispielsweise dem Vohwinkel-Syndrom oder dem Bart-Pumphrey-Syndrom, führen (Laird 2006, Xu und Nicholson 2012).

Zahlreiche Untersuchungen belegen einen wachstumshemmenden und tumorsupprimierenden Effekt von Connexin 26 bei Karzinomen der Brust (Lee und Rhee 2011). Ferner konnte in Brustkrebszelllinien eine Abnahme der Malignität (Momiyama et al. 2003) und eine verringerte Neoangiogenese beobachtet werden (Qin et al. 2003).

Die nur vereinzelt vorliegenden In-vivo- und In-vitro-Studien, die sich mit dem Einfluss der Connexine auf die Kanzerogenese des Mundhöhlenkarzinoms beschäftigen, weisen zum Teil sehr unterschiedliche Ergebnisse auf. Die auf RNA-Ebene ermittelte Connexin 26-Überexpression im Hamstermodell (Hillebrand 2013) verhält sich entgegengesetzt zu der in dieser Arbeit beobachteten signifikanten Unterexpression des Connexin 26 auf Proteinebene. Das Signifikanzniveau von 0,05

wurde im oralen Plattenepithelkarzinom im Vergleich zur gesunden Mukosa knapp unterschritten.

Von einem Zusammenhang zwischen Mundhöhlenkarzinom und Connexin 26 sollte trotz unterschiedlicher Ergebnisse weiterhin ausgegangen werden. Laut *Nagini* (2009) verhält sich die Genregulation im Hamster und humanen Plattenepithelkarzinom weitgehend analog. Allerdings können keine aussagekräftigen Parallelen zwischen der Expression des Connexin 26 auf RNA-Ebene und den Daten des immunhistochemischen Nachweises gezogen werden. Ein Unterschied zwischen Proteinkonzentration und Transkription auf mRNA-Ebene konnte in mehreren Untersuchungen, beispielsweise auch beim Mundhöhlenkarzinom der Ratte, nachgewiesen werden (Xia et al. 2009). Somit scheint es im Rahmen der Kanzerogenese zu einer posttranslationellen Regulation der Connexine zu kommen. Dieser Prozess sollte Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein, damit detaillierte Erkenntnisse über die Tumorentwicklung des oralen Plattenepithelkarzinoms erlangt werden können.

4.3.2 Connexin 43

Connexin 43 tritt in mehr als 35 Zelltypen auf, unter anderem in Keratinozyten, Astrozyten, Endothelzellen, Kardiomyozyten und glatten Muskelzellen. Aus diesem Grund ist es einer der am besten analysierten Connexinsubtypen im menschlichen Körper (Laird 2006). Eine Mutation dieses Gens wird unter anderem auch mit der autosomal dominant vererbten okulodentodigitalen Dysplasie assoziiert, einem seltenen Krankheitsbild, bei dem die Augen, Zähne und die Finger betroffen sind (Mese et al. 2007). Die Rolle des Connexin 43 während der Kanzerogenese wird in der Literatur differenziert betrachtet. Es konnten sowohl ein onkogenes Potential wie auch tumorsupprimierende Eigenschaften nachgewiesen werden. Nach *Bates et al.* (2007) fördert die Cx 43-Expression die Invasivität und Tumorzellmotilität in Gliomzellen. Daneben konnten *Kanczuga-Koda et al.* (2006) zeigen, dass Cx 43 nicht im Primärtumor, aber in Lymphknotenmetastasen des Mammakarzinoms exprimiert wird.

Es überwiegen allerdings die tumorsupprimierenden Eigenschaften. Der proliferationshemmende Effekt entsteht durch den Abbau von Onkoproteinen (sk2p) und der daraus resultierenden Erhöhung des Proteinspiegels von Tumorsuppresso-

ren (p27) (Zhang et al. 2003). Eine reduzierte Invasivität in maligne entarteten Keratinozyten der Ratte konnte durch eine direkte Wechselwirkung von Cx 43 mit dem Tumorsuppressor Caveolin-1 nachgewiesen werden (Langlois et al. 2010). Nach *Sirnes et al.* (2012) korreliert beim kolorektalen Karzinom eine verringerte Cx 43-Expression signifikant mit einem rezidivfreien Überleben und einer Gesamtüberlebensrate.

Ein Abfall der Cx 43-Expression während der Kanzerogenese konnte in diversen Publikationen belegt werden (Xing et al. 2007) und entspricht auch der in dieser Arbeit ermittelten signifikanten Unterexpression auf Protein-Ebene. Allerdings konnte bei einem intraindividuellen Vergleich zwischen humanen Tumor- und Schleimhautproben keine signifikante Expressionsverschiebung des Connexins 43 auf mRNA-Ebene diagnostiziert werden (Brodmann 2012). Diese Unstimmigkeit, d. h. eine unveränderte Cx 43-Transkription auf mRNA-Ebene und ein reduzierter Proteinwert während der Karzinogenese, deuten auf eine posttranslationale Regulation hin. Laut *Xia et al.* (2009) konnte ein vergleichbares Ergebnis auch beim Zungenkarzinom der Ratte festgestellt werden. Es ist bekannt, dass die Phosphorylierung von Connexinen eine wichtige posttranslationale Modifikation darstellt (Solan und Lampe 2009). Diese vermutlich veränderten Phosphorylierungsprozesse in Tumorzellen sollten Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein.

4.3.3 Connexin 45

Eine differentielle Expression von Connexin 45 in gesunder Mukosa, dysplastischen Läsionen und Plattenepithelkarzinomen des Hamsters konnte in dieser Arbeit nachgewiesen werden. Das Signifikanzniveau von 0,05 wurde stark unterschritten. Der Zusammenhang von Cx 45 und der Kanzerogenese ist bis jetzt kaum erforscht. Es gibt darüber nur wenige in der Literatur verfügbare Untersuchungen. Nach *Udaka et al.* (2007) wird Cx 45 in gesundem Lungengewebe und in finalen Lungenkarzinomen der Maus, nicht aber in kleineren Tumoren exprimiert. Diese Entdeckung konnte in der hier vorliegenden Arbeit jedoch nicht bestätigt werden, da in dieser Untersuchung ein Abfall der Cx 45-Expression vom mikroinvasiven Karzinom über das gut differenzierte Karzinom zum mäßig differenzierten Karzinom auf Proteinebene festgestellt wurde.

Daneben ist bekannt, dass die beiden Connexinsubtypen 43 und 45 Hybridkanäle mit unterschiedlichen Leitungseigenschaften ausbilden können (Martinez et al. 2002). Dieses Phänomen, die Ausbildung heteromerer Gap-Junction-Kanäle mit der Folge eines verringerten Kanaldurchmessers und veränderter GJIC, wurde auch bei Herzinsuffizienz beobachtet (Grikscheit et al. 2008).

Ob die Progression des oralen Plattenepithelkarzinoms durch heteromere Gap-Junction-Kanäle begünstigt wird und Connexin 45 Einfluss auf die Karzinogenese hat, sollte Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

4.4 Intrazelluläre Connexinlokalisation

In Hepatozyten der Ratte wurde im Verlauf der Kanzerogenese eine Verringerung der Gap-Junctional-Intercellular-Communication diagnostiziert. Dieses Phänomen wurde mit einer aberranten Lokalisation der Connexine 32 und 43 assoziiert, die vermehrt im Zytoplasma statt in der Plasmamembran der entarteten Hepatozyten maligner Lebertumore vorgefunden wurden (Krutovskikh et al. 1995). Nach *Yamasaki et al.* (1999) spielt häufig der Funktionsverlust eines Zell-Adhäsions-Moleküls in malignen Tumorzellen eine entscheidende Rolle dahingehend, dass keine intrazelluläre Translokation des Connexins vom Zytoplasma zur Zytoplasmamembran stattfindet. Ein Beispiel für ein solches Zell-Adhäsions-Molekül ist E-Cadherin, das für die Stabilisierung der Zell-Zell-Kontakte und somit für die Ausbildung der Gap-Junctional-Intercellular-Communication eine wichtige Bedeutung hat.

Ähnliche Beobachtungen konnten in dieser Arbeit für die intrazelluläre Lokalisation der Connexine festgestellt werden. Für Connexin 26 und 45 zeigte sich im Laufe der Karzinogenese ein signifikanter Unterschied bezüglich der Zytoplasmaverteilung. Zwischen gesunder Mundschleimhaut, dysplastischem Gewebe und Karzinom konnte keine differentielle Connexinlokalisation auf Kern und Membran diagnostiziert werden. Allerdings scheint die Connexinverteilung innerhalb des Zytoplasmas im Rahmen der Karzinogenese gewissen Regulationen zu unterliegen und sollte daher Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein.

5 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, eine Expressionsanalyse der Gap-Junction-Strukturproteine 26, 43 und 45 in oralen Plattenepithelkarzinomen des DMBA-induzierten Wangentaschenkarzinoms des Hamsters durchzuführen. Seit fast 40 Jahren ist eine Beteiligung der Connexine an den komplexen Prozessen der Karzinogenese bekannt.

Der Nachweis von Connexin 26, 43 und 45 erfolgte im Labor durch eine immunhistochemische Färbung an Paraffingewebeschnitten. Die quantitative Auswertung der Färbung fand durch Markierung des zu untersuchenden Gewebeareals und anschließender Berechnung mit Hilfe des AxioVision®-Programms nach festgelegten Parametern statt. Zusätzlich wurde die Lokalisation der Connexine auf Kern, Plasma und Membran semiquantitativ bestimmt. Hierbei erfolgte durch mikroskopische Untersuchung eine Einteilung entsprechend der Intensität der Färbung (vgl. 2.6.2). Die Diagnose der malignen Transformation wurde durch eine zusätzliche HE-Färbung der Präparate aus der gleichen Sequenz der immunhistochemischen Connexinfärbung gesichert (vgl. 3.1).

Die Fragestellungen der Untersuchung (vgl. 1.5) können folgendermaßen beantwortet werden:

Auf die Frage, inwieweit die orale Karzinogenese mit einer Regulation von Connexin 26, 43 und 45 auf Proteinebene assoziiert ist, ergaben sich folgende Ergebnisse:

Im Laufe der malignen Transformation wurde für die drei Connexinsubtypen jeweils eine differentielle Unterexpression festgestellt. Sowohl Connexin 26 als auch Connexin 43 und 45 unterschritten das Signifikanzniveau von 0,05 innerhalb der histologischen Gruppen gesunde Mukosa, dysplastische Läsionen und orale Plattenepithelkarzinome. Allerdings konnte kein signifikantes Expressionsverhalten zwischen den Stadien mikroinvasives Karzinom, mäßig differenziertes Karzinom und gut differenziertes Karzinom diagnostiziert werden.

Die Connexinlokalisation, d. h. die Verteilung der oben genannten Subtypen auf Membran, Kern und Zytoplasma, zeigte folgende Ergebnisse:

Für Connexin 26 und 45 konnte im Laufe der Karzinogenese ein signifikanter Unterschied bezüglich der Zytoplasmaverteilung festgestellt werden. Allerdings ließ sich keine differentielle Connexinlokalisation im Rahmen der oralen Karzinogenese auf Kern und Membran diagnostizieren. Über dieses Phänomen der aberranten Connexinlokalisation infolge der Tumorentwicklung wurde in der Literatur schon berichtet. Der Hypothese des negativen Einflusses von Connexinlokalisation auf das Zellwachstum sollte in weiteren Untersuchungen intensiver geprüft werden.

Zusammenfassend kann aus dieser Arbeit geschlossen werden, dass die orale Karzinogenese mit einer Regulation von Connexin 26, 43 und 45 auf Proteinebene assoziiert ist. In nachfolgenden Untersuchungen wäre es deshalb wichtig, sich mit der posttranslationalen Modifikation und der aberranten Lokalisation der Connexine während der Karzinogenese zu beschäftigen. Dies kann zu einer weiteren Entschlüsselung der Rolle der Connexine bei den komplexen Vorgängen der Karzinogenese beitragen.

6 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Text
AJCC	American Joint Committee on Cancer
Cx	Connexin
DMBA	9,10-Dimethyl-1, 2-Benzanthrazen
GJIC	Gap-Junctional-Intercellular-Communication
HE	Hämatoxylin-Eosin
PCR	Polymerasekettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
SIN	squamous intraepithelial neoplasia
UICC	Union internationale contre le cancer

7 Tabellenverzeichnis

Nummer	Tabellenbezeichnung	Seite
Tab. 1	TNM-Klassifikation	6
Tab. 2	Stadieneinteilung	7
Tab. 3	Metastasenaufkommen und Differenzierungsgrad	9
Tab. 4	1-, 2- und 5-Jahres-Überlebensrate	9
Tab. 5	Stadien der Tumorgenese	21
Tab. 6	Behandlungsplan	28
Tab. 7	Protokoll für die Einbettung der Gewebeproben	30
Tab. 8	Entparaffinierung und Rehydrierung	30
Tab. 9	Hämatoxylin-Eosin-Färbeprotokoll	31
Tab. 10	Protokoll für den immunhistochemischen Nachweis von Cx 26	32
Tab. 11	Protokoll für den immunhistochemischen Nachweis von Cx 43	32
Tab. 12	Protokoll für den immunhistochemischen Nachweis von Cx 45	33
Tab. 13	Stoppen der DAB-Reaktion	33
Tab. 14	Gegenfärbung mit Hämalan nach Mayer	34
Tab. 15	Dehydrierung	34
Tab. 16	Quantitative Methode	35
Tab. 17	Semiquantitative Methode	36
Tab. 18	p-Werte für die Zahlenverteilung in allen drei Klassen (gesund, Dysplasie, Karzinom) für die einzelnen Connexine	53

8 Abbildungsverzeichnis

Nummer	Abbildungsbezeichnung	Seite
Abb. 1	Sechs Charakteristika einer Krebszelle	10
Abb. 2	Modelle zur Karzinogenese	14
Abb. 3	A: Aufbau und Anordnung eines Connexin-Moleküls B: Struktur eines Gap-Junction-Kanals	17
Abb. 4	Homomere und heteromere Connexone	18
Abb. 5	Die rechte, zur Inspektion der Schleimhaut, herausgezogene und invertierte Wangentasche eines Hamsters	23
Abb. 6	Applizierung der gruppenzugehörigen Testsubstanz in die rechte Wangentasche	28
Abb. 7	Exzidierte Wangentasche eines syrischen Goldhamsters vor der Weiterbehandlung des Gewebes	29
Abb. 8	Gewebeschnitt – gesunde Mukosa	37
Abb. 9	Gewebeschnitt – Dysplasie und mikroinvasives Karzinom	37
Abb. 10	Gewebeschnitt – mikroinvasives Karzinom	37
Abb. 11	Gewebeschnitt – mäßig differenziertes Karzinom	37
Abb. 12	Gewebeschnitt – Hyperkeratose und gut differenziertes Karzinom	38
Abb. 13	Gewebeschnitt – gesunde Mukosa (Präparat Cx26Nr2-13,6re,a; Vergr. 10fach)	39
Abb. 14	Gewebeschnitt – gesunde Mukosa, Detaillausschnitt aus Abb. 13 (Vergr.70fach)	39
Abb. 15	Gewebeschnitt – Dysplasie (Präparat Cx26 Nr 42-9re,i; Vergr. 4fach)	40
Abb. 16	Gewebeschnitt – Dysplasie, Detaillausschnitt aus Abb. 15 (Vergr.30fach)	40
Abb. 17	Gewebeschnitt – gut bis mäßig differenziertes Karzinom (Präparat Cx26 Nr31-4re,e; Vergr.4fach)	41
Abb. 18	Gewebeschnitt – gut bis mäßig differenziertes Karzinom, Detaillausschnitt aus Abb. 17 (Vergr. 30fach)	41

Abb. 19	Gewebeschnitt – gesunde Mukosa (Präparat Cx43Nr2-13,6re,b; Vergr. 10fach)	42
Abb. 20	Gewebeschnitt – gesunde Mukosa, Detailausschnitt aus Abb. 19 (Vergr. 70fach)	42
Abb. 21	Gewebeschnitt – Dysplasie (Präparat Cx43 Nr6-13,8re,c; Vergr. 10fach)	43
Abb. 22	Gewebeschnitt – Dysplasie, Detailausschnitt aus Abb. 21 (Vergr. 80fach)	43
Abb. 23	Gewebeschnitt – gut bis mäßig differenziertes Karzinom (Präparat Cx43 Nr31-4re,f; Vergr. 4fach)	44
Abb. 24	Gewebeschnitt – gut bis mäßig differenziertes Karzinom, Detailausschnitt aus Abb. 23 (Vergr. 30fach)	44
Abb. 25	Gewebeschnitt – gesunde Mukosa (Präparat Cx45 Nr35-6li,h; Vergr. 8fach)	45
Abb. 26	Gewebeschnitt – gesunde Mukosa, Detailausschnitt aus Abb. 25 (Vergr. 100fach)	45
Abb. 27	Gewebeschnitt – Dysplasie (Präparat Cx45 Nr34-5re,g; Vergr. 4fach)	46
Abb. 28	Gewebeschnitt – Dysplasie, Detailausschnitt aus Abb. 27 (Vergr. 80fach)	46
Abb. 29	Gewebeschnitt – microinvasives Karzinom (Präparat Cx45 Nr.29-3re,d; Vergr. 4fach)	47
Abb. 30	Gewebeschnitt – microinvasives Karzinom, Detailausschnitt aus Abb. 29 (Vergr. 30fach)	47
Abb. 31	Cx 26-Expressionsmuster in Relation zu gesunder Mukosa, dysplastischen Läsionen und Plattenepithelkarzinom	48
Abb. 32	Cx 43-Expressionsmuster in Relation zu gesunder Mukosa, dysplastischen Läsionen und Plattenepithelkarzinom	49
Abb. 33	Cx 45-Expressionsmuster in Relation zu gesunder Mukosa, dysplastischen Läsionen und Plattenepithelkarzinom	49
Abb. 34	Cx 26-Expressionsmuster in Relation zu mikroinvasiven Karzinomen, gut differenzierten Karzinomen und mäßig differenzierten Karzinomen	50
Abb. 35	Cx 43-Expressionsmuster in Relation zu mikroinvasiven Karzinomen, gut differenzierten Karzinomen und mäßig differenzierten Karzinomen	50
Abb. 36	Cx 45-Expressionsmuster in Relation zu mikroinvasiven Karzinomen, gut differenzierten Karzinomen und mäßig differenzierten Karzinomen	51
Abb. 37	Cx 26-Expressionsmuster in Relation zu gesunder Mukosa, gesunder Mukosa basal und gesunder Mukosa luminal	51
Abb. 38	Cx 43-Expressionsmuster in Relation zu gesunder Mukosa, gesunder Mukosa basal und gesunder Mukosa luminal	52

Abb. 39	Cx 45-Expressionsmuster in Relation zu gesunder Mukosa, gesunder Mukosa basal und gesunder Mukosa luminal	52
Abb. 40	Cx 26-Plasmaverteilung in Relation zu gesunder Mukosa, Dysplasie und Karzinom	53
Abb. 41	Cx 43-Plasmaverteilung in Relation zu gesunder Mukosa, Dysplasie und Karzinom	54
Abb. 42	Cx 45-Plasmaverteilung in Relation zu gesunder Mukosa, Dysplasie und Karzinom	54

9 Literaturverzeichnis

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

Bevans CG, Kordel M, Rhee SK, Harris AL (1998): Isoform Composition of Connexin Channels Determines Selectivity among Second Messengers and Uncharged Molecules. *J Biol Chem* 273, 2808-2816

Boenisch T: Handbuch Immunchemische Färbemethoden, 3. Auflage; Dako Cytomation GmbH, Hamburg 2003

Bos JL (1989): ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res* 49, 4682-4689

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

Carmeliet P, Jain RK 2000: Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 407, 249-257

Castellsagué X, Quintana MJ, Martínez MC, Nieto A, Sánchez MJ, Juan A, Monner A, Carrera M, Agudo A, Quer M et al. (2004): The role of type of tobacco and type of alcoholic beverage in oral carcinogenesis. *Int J Cancer* 108, 741-749

Chambers AF, Groom AC, MacDonald IC (2002): Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer* 2, 563-572

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

Chial H (2008): Proto-oncogenes to oncogenes to cancer. *Nature Education* 1(1)

Clark DP, Pazdernik NJ: Molekularbiologie von Krebs; in: Molekulare Biotechnologie Grundlagen und Anwendungen; hrsg. v. Clark DP, Pazdernik NJ; Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg 2009, 475-497

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

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

Driemel O, Burkhardt A, Reichert TE, Hemprich A, Remmerbach T, Hertrampf K, Wiltfang J, Howaldt HP, Kosmehl H, Kunkel M, Mohr C, Reichart PA, Wolff K-D (2008): Erkennung oraler Risikoläsionen in der zahnärztlichen Praxis. Dkratgeber: Art.-Nr. 180 0038

Eckardt A: Tumorthherapie bei Mundhöhlenkarzinomen; in: Curriculum Chirurgie, Band III: Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie; hrsg. v. Hausamen JE, Becker J, Neukam FW, Reichart PA, Schliephake H, Schmelzeisen R; 3 Bände; Quintessenz Verlag, Berlin 2003, 447- 480

Elgang C, Eckert R, Lichtenberg-Frat H, Butterweck A, Traub O, Klein RA, Hiilser DE, Willecke K (1995): Specific Permeability and Selective Formation of Gap Junction Channels in Connexin-transfected HeLa Cells. *J Cell Biol* 129, 805-817

Engers R, Gabbert HE (1998): Basismechanismen der Metastasierung Tumorbologische Grundlagen und klinische Implikationen. *Der Onkologe* 4(8), 682-688

- Fakhry C, Gillison ML (2006): Clinical implications of human papillomavirus in head and neck cancers. *J Clin Oncol* 24, 2606-2611
- Falk MM (2000): Connexin-specific distribution within gap junctions revealed in living cells. *J Cell Sci* 113, 4109-4120
- Foekens JA, van Putten WL, Portengen H, de Koning HY, Thirion B, Alexieva-Figusch J, Klijn JG (1993): Prognostic value of PS2 and cathepsin D in 710 human primary breast tumors: multivariate analysis. *J Clin Oncol* 11(5), 899-908
- Foote CI, Zhou L, Zhu X, Nicholson BJ (1998): The Pattern of Disulfide Linkages in the Extracellular Loop Regions of Connexin 32 Suggests a Model for the Docking Interface of Gap Junctions. *J Cell Biol* 140, 1187-1197
- Forastiere A, Koch W, Trotti A, Sidransky D (2001): Head and neck cancer. *N Eng J Med* 27, 1890-1900
- Frerich B (2010): Standardtherapie von Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle gemäß Leitlinien. *Der MKG-Chirurg* 3, 16-24
- Fröhlich M, Bernstein P, Metelmann H-R, Möhner M (1992): Zur Epidemiologie der Lippen- und Mundhöhlenmalignome. *Fortschr Kiefer Gesichtschir* 37, 1-3
- Gale N, Pilch B, Sidransky D, Westra W, Califano J: Epithelial precursor lesions. In: Barnes L, Eveson J, Reichart PA, Sidransky D: World Health Organization classification of tumours. Pathology and genetics of head and neck tumours. IARC, Lyon 2005, 140-143
- Gee J, Tanaka M, Grossman HB (2003): Connexin 26 is abnormally expressed in bladder cancer. *J Urol* 169(3), 1135-1137
- Gilula NB (1987): Topology of gap junction protein and channel function. *Ciba Found Symp.* 125, 128-139
- Graeber SH, Hulser DF (1998): Connexin transfection induces invasive properties in HeLa cells. *Exp Cell Res* 243, 142-149
- Grikscheit K, Thomas N, Bruce AF, Rothery S, Chan J, Severs NJ, Dupont E (2008): Coexpression of Connexin45 with Connexin43 Decreases Gap Junction Size. *Cell Commun Adhes* 15, 185-193
- Hanahan D, Weinberg RA (2000): The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70
- Hermanek P, Sobin LH (1987): Union Internationale contre le Cancer - UICC. TNM-Klassifikation maligner Tumoren 4. Auflage, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg - New York – Tokio
- Herve JC, Bourmeyster N, Sarrouilhe D (2004): Diversity in protein-protein interactions of connexins: emerging roles. *Biochim Biophys Acta* 1662, 22-41
- Hillebrand RS: Regulation von Connexinen als Gap-Junction-Strukturprotein in der sequenziellen Karzinogenese des DMBA-induzierten Wangentaschenkarzinoms des Hamsters. Med.Diss. Göttingen 2013
- Huang RP, Fan Y, Hossain MZ, Peng A, Zeng ZL, Boynton AL (1998): Reversion of the neoplastic phenotype of human glioblastoma cells by connexin 43 (cx43). *Cancer Res* 58, 5089-5096
- Ito A, Katoh F, Kataoka TR, Okada M, Tsubota N, Asada H, Yoshikawa K, Maeda S, Kitamura Y, Yamasaki H et al. (2000): A role for heterologous gap junctions between melanoma and endothelial cells in metastasis. *J Clin Invest* 105, 1189-1197
- Kamibayashi Y, Oyamada Y, Mori M, Oyamada M (1995): Aberrant expression of gap junction proteins (connexins) is associated with tumor progression during multistage mouse skin carcinogenesis in vivo. *Carcinogenesis* 16, 1287-1297

- Kanczuga-Koda L, Sulkowski S, Lenczewski A, Koda M, Wincewicz A, Baltaziak M, Sulkowska M (2006): Increased expression of connexins 26 and 43 in lymph node metastases of breast cancer. *J Clin Pathol* 59, 429-433
- Kath R, Höffken K (1998): Mechanismen der Metastasierung und deren Beeinflussung. *Der Onkologe* 4(8), 560-565
- Kleist B, Bankau A, Lorenz G, Jäger B, Poetsch M. (2004): Different Risk Factors in Basaloid and Common Squamous Head and Neck Cancer. *The Laryngoscope*, 114, 1063–1068.
- Knudson AG (2000): Chasing the cancer demon. *Annu Rev Genet* 34, 1–19
- Kovács AF, Megahed W, Scholz M, Sader R (2007): Survival improvement of a unicentric overall population in 20 years 1038 patients with oral and oropharyngeal squamous cell cancer 1983-2004. *Mund Kiefer Gesichtschir.* 11, 267-283
- Kowalski LP, Carvalho AL (2001): Influence of time delay and clinical upstaging in the prognosis of head and neck cancer. *Oral Oncol* 37, 94-98
- Krutovskikh V, Yamasaki H (2000): Connexin gene mutations in human genetic diseases. *Mutation Research* 462, 197–207
- Krutovskikh VA, Mesnil M, Mazzoleni G, Yamasaki H (1995): Inhibition of rat liver gap junction intercellular communication by tumor-promoting agents in vivo. Association with aberrant localization of connexin proteins. *72(5)*, 571-7
- Kumar NM, Gilula NB (1996): The gap junction communication channel. *Cell* 84, 381-388
- Laird DW (2006): Life cycle of connexins in health and disease. *Biochem J* 394, 527-543
- Lajolo C, Sgambato A, Maiorano E, Lucchese A, Capodiferro S, Favia G, Giuliani M (2010): Calcium glucarate inhibits DMBA-induced oral carcinogenesis in the hamster: histomorphometric evaluation. *Anticancer research* 30, 843-850
- Langlois S, Cowan KN, Shao Q, Cowan BJ, Laird DW (2010): The tumor-suppressive function of Connexin43 in keratinocytes is mediated in part via interaction with caveolin-1. *Cancer Res* 70, 4222-4232
- Lee HJ, Rhee SK (2011): Growth-Suppressing Activity of the Transfected Cx 26 on BICR-M1Rk Breast Cancer Cell Line. *J Microbiol Biotechnol* 21(5), 477-482
- Liotta LA, Steeg PS, Stetler-Stevenson WG 1991: Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cell* 64(2), 327-336
- Liu XZ, Yuan Y, Yan D, Ding EH, Ouyang XM, Fei Y, Tang W, Yuan H, Chang Q, Du LL, Zhang X, Wang G, Ahmad S, Kang DY, Lin X, Dai P (2009): Digenic inheritance of non-syndromic deafness caused by mutations at the gap junction proteins Cx26 and Cx31. *Hum Genet* 125, 53-62
- Loewenstein WR (1979): Junctional intercellular communication and the control of growth. *Biochim Biophys Acta* 560, 1-65
- Loewenstein WR (1981): Junctional intercellular communication: the cell-to-cell membrane channel. *Physiol Rev* 61, 829-913
- Martinez AD, Hayrapetyan V, Moreno AP, Beyer EC (2002): Connexin43 and connexin45 form heteromeric gap junction channels in which individual components determine permeability and regulation. *Circ Res* 90, 1100-1107
- Mese G, Richard G, White TW (2007): Gap Junctions: Basic Structure and Function. *J of Investigative Dermatology* 127, 2516-2524

- Mesnil M (2002): Connexins and cancer. *Biol Cell* 94, 493-500
- Mesnil M, Krutovskikh V, Piccoli C, Elfgang C, Traub O, Willecke K, Yamasaki H (1995): Negative growth control of HeLa cells by connexin genes: connexin species specificity. *Cancer Res* 55, 629-639
- Mesnil M, Crespin S, Avanzo JL, Zaidan-Dagli ML (2005): Defective gap junctional intercellular communication in the carcinogenic process. *Biochim Biophys Acta* 1719, 125-145
- Mognetti B, Di Carlo F, Berta GN (2006): Animal models in oral cancer research. *Oral Oncol* 42, 448-460
- Momiyama M, Omori Y, Ishizaki Y, Nishikawa Y, Tokairin T, Ogawa J, Enomoto K (2003): Connexin26-mediated gap junctional communication reverses the malignant phenotype of MCF-7 breast cancer cells. *Cancer Sci* 94, 501-507
- Muramatsu A, Iwai M, Morikawa T, Tanaka S, Mori T, Harada Y, Okanoue T (2002): Influence of transfection with connexin 26 gene on malignant potential of human hepatoma cells. *Carcinogenesis* 23(2), 351-358
- Mylykangas S, Knuutila S (2006): Manifestation, mechanisms and mysteries of gene amplifications. *Cancer Lett* 232(1), 79-89
- Nagini S (2009): Of humans and hamsters: the hamster buccal pouch carcinogenesis model as a paradigm for oral oncogenesis and chemoprevention. *Anticancer Agents Med Chem* 9, 843-852
- Neid M, Tannapfel A (2009): [Squamous intraepithelial neoplasia (WHO 2005). Precancerous lesions of the head and neck region]. *HNO* 57, 181-187; quiz 188
- Niessen H, Harz Hartmann, Bedner P, Krämer K, Willecke K (2000): Selective permeability of different connexin channels to the second messenger inositol 1,4,5-trisphosphate. *J Cell Sci* 113, 1365-1372
- Ozawa H, Matsunaga T, Kamiya K, Tokumaru Y, Fujii M, Tomita T, Ogawa K (2007): Decreased Expression of Connexin-30 and Aberrant Expression of Connexin-26 in Human Head and Neck Cancer. *Anticancer Res* 27(4B), 2189-95
- Pape HP (1985): Tumoren der Mundhöhle in: Gross, R., Schmidt, C. G. (Hrsg.) *Klinische Onkologie*. G. Thieme Verlag, Stuttgart, S.23.1
- Petrides PE: Tumorgewebe; in: *Biochemie und Pathobiochemie*; hrsg. v. Löffler G, Petrides PE, Heinrich PC; Springer Medizin Verlag, Heidelberg 2007, 1141-1162
- Qin H, Shao Q, Thomas T, Kalra J, Alaoui-Jamali MA, Laird DW (2003): Connexin26 regulates the expression of angiogenesis-related genes in human breast tumor cells by both GJIC-dependent and -independent mechanisms. *Cell Commun Adhes* 10, 387-393
- Reichart PA (2007): Orale Leukoplakie/Erythroplakie. Stellungnahme der Deutschen Gesellschaft für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde (DGZMK). *Dtsch Zahnärztl Zeitschr* 62, 45-48
- Remmert S, Rottmann M, Reichenbach M, Sommer K, Friedrich HJ (2001): Lymphknotenmetastasierung bei Kopf-Hals-Tumoren. *Laryngo-Rhino-Otol* 80, 27-35
- Roessner A, Müller-Hermelink HK: Tumoren (Neoplasien); in: *Allgemeine Pathologie und Grundlagen der speziellen Pathologie*; hrsg. v. Roessner A, Pfeifer U, Müller-Hermelink HK; Urban & Fischer Verlag, München 2008, 203-256
- Rogers SN, Brown JS, Woolgar JA, Lowe D, Magennis P, Shaw RJ, Sutton D, Errington D, Vaughan D (2009): Survival following primary surgery for oral cancer. *Oral Oncology* 45 (2009), 201-211

- Rosenquist K, Wennerberg J, Schildt EB, Bladstrom A, Goran Hansson B, Andersson G (2005): Oral status, oral infections and some lifestyle factors as risk factors for oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. A population-based case-control study in southern Sweden. *Acta Otolaryngol* 125, 1327-1336
- Salley JJ (1954): Experimental carcinogenesis in the cheek pouch of the Syrian hamster. *J Dent Res* 33, 253-262
- Scheifele C, Reichart PA (2003): Is there a natural limit of the transformation rate of oral leukoplakia? *Oral Oncology* 39(2003), 470-475
- Schliephake H, Jamil MU (2002): Prospective evaluation of quality of life after oncologic surgery for oral cancer. *Int J Oral Maxillofac Surg* 31(4), 427-433
- Segretain D, Falk MM (2004): Regulation of connexin biosynthesis, assembly, gap junction formation, and removal. *Biochim Biophys Acta* 1662, 3-21
- 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, 570-81
- Slingerland J, Pagano M (2000): Regulation of the Cdk Inhibitor p27 and Its Deregulation in Cancer. *J Cell Physiol* 183, 10-17
- Söhl G, Willecke K (2003): Gap junctions and the connexin protein family. *Cardiovasc Res* 62, 228–232
- Solan JL, Lampe PD (2009): Connexin 43 Phosphorylation – Structural Changes and Biological Effects. *Biochem J* 419(2), 261-272
- Sosinsky GE, Nicholson BJ (2005): Structural organization of gap junction channels. *Biochim Biophys Acta* 1711, 99-125
- Soussi T, Wiman KG (2007): Shaping Genetic Alterations in Human Cancer: The p53 Mutation Paradigm. *Cancer Cell* 12(4), 303-312
- Strickland S S (2002): Anthropological perspectives on use of the areca nut. *Addiction Biology*, 7, 85–97
- Strutz J, Mann W: *Praxis der HNO-Heilkunde, Kopf- und Halschirurgie*. 2. Auflage; Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2010
- Tanaka T, Ishigamori R. (2011): Understanding Carcinogenesis for Fighting Oral Cancer. *J Oncol* Article ID 603740
- Tanaka T, Tanaka M, Tanaka T (2011): Oral carcinogenesis and oral cancer Chemoprevention: A review. *Pathology Research International* Volume 2011 (2011), Article ID 431246
- Udaka N, Miyagi Y, Ito T (2007): Connexin expression in mouse lung tumor. *Cancer Lett* 246, 224-229
- Untch M, Jackisch C (2009): Behandlung der Patientinnen mit HER2- (ErbB2-) positivem Mammakarzinom. *Der Onkologe* 15(8), 811-826
- Vairaktaris E, Spyridonidou S, Papakosta V, Vylliotis A, Lazaris A, Perrea D, Yapijakis C, Patsouris E (2008): The hamster model of sequential oral oncogenesis. *Oral Oncol* 44, 315-324
- van der Schroeff MP, Baatenburg de Jong RJ (2008): Staging and prognosis in head and neck cancer, *Oral Oncology* 45 (2009), 356–360
- van der Weyden L, Adams DJ (2007): The Ras-association domain family (RASSF) members and their role in human tumourigenesis. *Biochim Biophys Acta* 1776, 58-85

- Wiethage T, Voss B, Müller KM (1994): Onkogene und Tumorsuppressorgene bei der Pathogenese von Lungentumoren. *Der Pathologe* 15(6), 321-330
- Willecke K, Eiberger J, Degen J, Eckardt D, Romualdi A, Guldenagel M, Deutsch U, Sohl G (2002): Structural and functional diversity of connexin genes in the mouse and human genome. *Biol Chem* 383, 725-737
- Wittekind C, Meyer HJ, Bootz F: TNM-Klassifikation maligner Tumoren. 6. Auflage; Springer Verlag, Heidelberg 2002
- Wolf U, Barnes B, Bertz J, Haberland J, Laudi A, Stöcker M, Schönfeld I, Kraywinkel K, Kurth B-M (2011): Das Zentrum für Krebsregisterdaten (ZfKD) im Robert Koch-Institut (RKI) in Berlin. *Bundesgesundheitsbl.* 45(11), 1229-1234
- Woolgar JA, Scott J, Vaughan ED, Brown JS, West CR, Rogers S (1995): Survival, metastasis and recurrence of oral cancer in relation to pathological features. *Ann R Coll Surg Engl* 77, 325-331
- Xia J, Liu X, Tao X, Hong Y, Chen X, Dai Y, Huang Y, Cheng B (2009): Expression of gap junctional protein connexin43 during 4-nitroquinoline-1-oxide-induced rat tongue carcinogenesis. *J Mol Histol* 40, 183-188
- Xie H, Laird DW, Chang TH, Hu VW (1997): A mitosis-specific phosphorylation of the gap junction protein connexin43 in human vascular cells: biochemical characterization and localization. *J Cell Biol* 137, 203-210
- Xing Y, Xiao Y, Zeng F, Zhao J, Xiao C, Xiong P, Feng W (2007): Altered expression of connexin-43 and impaired capacity of gap junctional intercellular communication in prostate cancer cells. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 27, 291-294
- Xu J, Nicholson BJ (2012): The role of connexins in ear and skin physiology-Functional insights from disease-associated mutations. *Biochim Biophys Acta.* 2012 Jul 13.
- Yamasaki H, Krutovskikh V, Mesnil M, Tanaka T, Zaidan-Dagli ML, Omori Y (1999): Role of connexion (gap junction) genes in cell growth control and carcinogenesis. *C R Acad Sci III.* 322(2-3), 151-9
- Yano T, Hernandez-Blazquez FJ, Omori Y, Yamasaki H (2001): Reduction of malignant phenotype of HEPG2 cell is associated with the expression of connexin 26 but not connexin 32. *Carcinogenesis* 22, 1593-1600
- Yeager M, Gilula NB (1992): Membrane topology and quaternary structure of cardiac gap junction ion channels. *J Mol Biol* 223, 929-948
- Zhang YW, Kaneda M, Morita I (2003): The gap junction-independent tumor-suppressing effect of connexin 43. *J Biol Chem* 278, 44852-44856

10 Anhang

10.1 Daten der quantitativen Auswertung

Die Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchung sind in der nachfolgenden Tabelle zusammengefasst. Den pathologischen Befunden (vgl. Spalte 4) wurden für die Auswertung, ein Zahlencode (vgl. Spalte 5), wie folgt zugeordnet.

Befund	Code
gesunde Mukosa	1
Hyperkeratose	2
Hyperplasie	3
Dysplasie	4
mikroinvasives Karzinom	5
gut differenziertes Karzinom	6
mäßig differenziertes Karzinom	7
Hornperle	8

Zusätzlich werden noch die Lokalisation und der Lokalisationscode (vgl. Spalte 6 und 7), sowie die Färbung und die Standzeit angegeben (vgl. Spalte 8 und 9). Die Buchstaben a - i in der Spalte 1 kennzeichnen die für die Abbildungen 13 – 30 (vgl. S. 39 ff) verwendeten Präparate.

1 Präparat	2 Seite	3 Gen	4 Path. Befund	5 Path. Befund (Code)	6 Lokalisation	7 Lokalisation (Code)	8 Färbung	9 Standzeit
1-13,6	links	26	gesunde Mukosa	1			97,79201577	10
1-13,6	links	26	gesunde Mukosa	1	basal	A	98,52090642	10
1-13,6	links	26	gesunde Mukosa	1	luminal	B	98,52761982	10
1-13,6	links	43	gesunde Mukosa	1			64,36377107	10
1-13,6	links	43	gesunde Mukosa	1	basal	A	48,58319206	10
1-13,6	links	43	gesunde Mukosa	1	luminal	B	73,60217714	10
1-13,6	links	45	gesunde Mukosa	1			98,2707088	10
1-13,6	links	45	gesunde Mukosa	1	basal	A	96,81104834	10
1-13,6	links	45	gesunde Mukosa	1	luminal	B	99,87929185	10
2-13,6,a	rechts	26	gesunde Mukosa	1			93,95898404	10
2-13,6	rechts	26	gesunde Mukosa	1	basal	A	94,72440945	10
2-13,6	rechts	26	gesunde Mukosa	1	Luminal	B	89,76158345	10
2-13,6,b	rechts	43	gesunde Mukosa	1			87,27194907	10
2-13,6	rechts	43	gesunde Mukosa	1	basal	A	81,5276541	10
2-13,6	rechts	43	gesunde Mukosa	1	luminal	B	95,10376538	10
2-13,6	rechts	45	gesunde Mukosa	1			92,80596159	10
2-13,6	rechts	45	gesunde Mukosa	1	basal	A	96,23542175	10
2-13,6	rechts	45	gesunde Mukosa	1	luminal	B	87,62877673	10
3-13,7	links	26	gesunde Mukosa	1			38,33490526	10
3-13,7	links	26	gesunde Mukosa	1	basal	A	40,24208257	10

3-13,7	links	26	gesunde Mukosa	1	luminal	B	40,50316431	10
3-13,7	links	43	gesunde Mukosa	1			91,97295147	10
3-13,7	links	43	gesunde Mukosa	1	basal	A	93,12873745	10
3-13,7	links	43	gesunde Mukosa	1	luminal	B	96,24265748	10
3-13,7	links	45	gesunde Mukosa	1			83,60310875	10
3-13,7	links	45	gesunde Mukosa	1	basal	A	94,04486587	10
3-13,7	links	45	gesunde Mukosa	1	luminal	B	76,2345679	10
4-13,7	rechts	26	Hyperkeratose	2			92,27897202	10
4-13,7	rechts	26	Hyperkeratose	2	basal	A	90,15894322	10
4-13,7	rechts	26	Hyperkeratose	2	luminal	B	99,06903466	10
4-13,7	rechts	43	Hyperkeratose	2			73,04009496	10
4-13,7	rechts	43	Hyperkeratose	2	basal	A	71,09851065	10
4-13,7	rechts	43	Hyperkeratose	2	luminal	B	72,81739364	10
4-13,7	rechts	45	Hyperkeratose	2			98,21351748	10
4-13,7	rechts	45	Hyperkeratose	2	basal	A	99,34793648	10
4-13,7	rechts	45	Hyperkeratose	2	luminal	B	94,79987907	10
5-13,8	links	26	gesunde Mukosa	1			36,48373235	10
5-13,8	links	26	gesunde Mukosa	1	basal	A	24,26484187	10
5-13,8	links	26	gesunde Mukosa	1	luminal	B	54,09911996	10
5-13,8	links	43	gesunde Mukosa	1			86,01082363	10
5-13,8	links	43	gesunde Mukosa	1	basal	A	76,99080415	10
5-13,8	links	43	gesunde Mukosa	1	luminal	B	94,17726979	10
5-13,8	links	45	gesunde Mukosa	1			90,92036716	10
5-13,8	links	45	gesunde Mukosa	1	basal	A	89,05584477	10
5-13,8	links	45	gesunde Mukosa	1	luminal	B	89,28024502	10
6-13,8	rechts	26	Hyperkeratose	2			7,8340403	10
6-13,8	rechts	26	Hyperkeratose	2	basal	A	9,13483046	10
6-13,8	rechts	26	Hyperkeratose	2	luminal	B	9,58759732	10
6-13,8	rechts	26	Dysplasie	4			27,58687259	10
6-13,8	rechts	43	Hyperkeratose	2			49,70720263	10
6-13,8	rechts	43	Hyperkeratose	2	basal	A	40,71426637	10
6-13,8	rechts	43	Hyperkeratose	2	luminal	B	56,96989855	10
6-13,8,c	rechts	43	Dysplasie	4			30,65414935	10
6-13,8	rechts	45	Hyperkeratose	2			50,01820572	10
6-13,8	rechts	45	Hyperkeratose	2	basal	A	78,77820488	10
6-13,8	rechts	45	Hyperkeratose	2	luminal	B	24,71933831	10
6-13,8	rechts	45	Dysplasie	4			13,19917395	10
7-13,9	links	26	gesunde Mukosa	1			9,30861693	10
7-13,9	links	26	gesunde Mukosa	1	basal	A	6,53094026	10
7-13,9	links	26	gesunde Mukosa	1	luminal	B	15,00972853	10
7-13,9	links	43	gesunde Mukosa	1			90,40463952	10
7-13,9	links	43	gesunde Mukosa	1	basal	A	87,18580582	10
7-13,9	links	43	gesunde Mukosa	1	luminal	B	99,31350114	10
7-13,9	links	45	gesunde Mukosa	1			99,66818023	10

7-13,9	links	45	gesunde Mukosa	1	basal	A	99,36494191	10
7-13,9	links	45	gesunde Mukosa	1	luminal	B	99,95480566	10
8-13,9	rechts	26	Hyperkeratose	2			1,20760934	10
8-13,9	rechts	26	Hyperkeratose	2	basal	A	1,95990136	10
8-13,9	rechts	26	Hyperkeratose	2	luminal	B	0,45970194	10
8-13,9	rechts	43	Hyperkeratose	2			34,58620951	10
8-13,9	rechts	43	Hyperkeratose	2	basal	A	51,46162678	10
8-13,9	rechts	43	Hyperkeratose	2	luminal	B	28,41699568	10
8-13,9	rechts	45	Hyperkeratose	2			88,0729666	10
8-13,9	rechts	45	Hyperkeratose	2	basal	A	90,74187615	10
8-13,9	rechts	45	Hyperkeratose	2	luminal	B	94,08812607	10
10-13,10	rechts	26	Hyperkeratose	2			86,82595408	10
10-13,10	rechts	26	Hyperkeratose	2	basal	A	82,8742191	10
10-13,10	rechts	26	Hyperkeratose	2	luminal	B	94,33633679	10
10-13,10	rechts	43	Hyperkeratose	2			26,99530516	10
10-13,10	rechts	43	Hyperkeratose	2	basal	A	45,67939887	10
10-13,10	rechts	43	Hyperkeratose	2	luminal	B	5,22584034	10
10-13,10	rechts	45	Hyperkeratose	2			9,83472543	10
10-13,10	rechts	45	Hyperkeratose	2	basal	A	12,75840696	10
10-13,10	rechts	45	Hyperkeratose	2	luminal	B	5,81619833	10
12-14,2	rechts	26	Hyperkeratose	2			46,6096636	10
12-14,2	rechts	26	Hyperkeratose	2	basal	A	41,06389751	10
12-14,2	rechts	26	Hyperkeratose	2	luminal	B	49,04227837	10
12-14,2	rechts	43	Hyperkeratose	2			83,12213151	10
12-14,2	rechts	43	Hyperkeratose	2	basal	A	76,87304766	10
12-14,2	rechts	43	Hyperkeratose	2	luminal	B	89,6321469	10
12-14,2	rechts	45	Hyperkeratose	2			55,58973451	10
12-14,2	rechts	45	Hyperkeratose	2	basal	A	85,46335642	10
12-14,2	rechts	45	Hyperkeratose	2	luminal	B	20,93627982	10
13-14,3	rechts	26	Hyperkeratose	2			89,97933351	10
13-14,3	rechts	26	Hyperkeratose	2	basal	A	88,73095442	10
13-14,3	rechts	26	Hyperkeratose	2	luminal	B	89,62676798	10
13-14,3	rechts	43	Hyperkeratose	2			44,54418773	10
13-14,3	rechts	43	Hyperkeratose	2	basal	A	42,51728078	10
13-14,3	rechts	43	Hyperkeratose	2	luminal	B	36,69228371	10
13-14,3	rechts	45	Hyperkeratose	2			9,60792437	10
13-14,3	rechts	45	Hyperkeratose	2	basal	A	15,51860454	10
13-14,3	rechts	45	Hyperkeratose	2	luminal	B	1,93831114	10
14-14,4	rechts	26	Hyperkeratose	2			41,29182606	10
14-14,4	rechts	43	Hyperkeratose	2			9,0835562	10
14-14,4	rechts	45	Hyperkeratose	2			3,3896676	10
15-14,5	rechts	26	gesunde Mukosa	1			13,33588224	10
15-14,5	rechts	26	gesunde Mukosa	1	basal	A	13,75222652	10
15-14,5	rechts	26	gesunde Mukosa	1	luminal	B	10,94722125	10

10 Anhang

15-14,5	rechts	43	gesunde Mukosa	1			94,84372521	10
15-14,5	rechts	43	gesunde Mukosa	1	basal	A	92,32032105	10
15-14,5	rechts	43	gesunde Mukosa	1	luminal	B	96,15901832	10
15-14,5	rechts	45	gesunde Mukosa	1			52,43013154	10
15-14,5	rechts	45	gesunde Mukosa	1	basal	A	69,44399329	10
15-14,5	rechts	45	gesunde Mukosa	1	luminal	B	21,88265992	10
16-3	rechts	26	Hyperkeratose	2			44,62119276	14
16-3	rechts	26	Hyperkeratose	2	basal	A	79,52087026	14
16-3	rechts	26	Hyperkeratose	2	luminal	B	34,09840572	14
16-3	rechts	26	Dysplasie	4			73,48927234	14
16-3	rechts	43	Hyperkeratose	2			77,42905354	14
16-3	rechts	43	Hyperkeratose	2	basal	A	89,06085738	14
16-3	rechts	43	Hyperkeratose	2	luminal	B	59,20596856	14
16-3	rechts	43	Dysplasie	4			65,10377358	14
16-3	rechts	45	Hyperkeratose	2			10,16899098	14
16-3	rechts	45	Dysplasie	4			12,39268628	14
17-4	rechts	26	Hyperkeratose	2			4,88321621	14
17-4	rechts	26	Hyperkeratose	2	basal	A	1,58671888	14
17-4	rechts	26	Hyperkeratose	2	luminal	B	12,98020332	14
17-4	rechts	43	Hyperkeratose	2			10,2967652	14
17-4	rechts	43	Hyperkeratose	2	basal	A	4,71567268	14
17-4	rechts	43	Hyperkeratose	2	luminal	B	16,54263755	14
17-4	rechts	43	Hyperplasie	3			0,54913267	14
17-4	rechts	45	Hyperkeratose	2			37,97220689	14
17-4	rechts	45	Hyperkeratose	2	basal	A	68,54408915	14
17-4	rechts	45	Hyperkeratose	2	luminal	B	10,29800983	14
17-4	rechts	45	Hyperplasie	3			16,39496973	14
18-5	rechts	26	Hyperkeratose	2			16,62101878	14
18-5	rechts	26	Hyperkeratose	2	basal	A	11,27069801	14
18-5	rechts	26	Hyperkeratose	2	luminal	B	19,64236102	14
18-5	rechts	26	Dysplasie	4			13,07942662	14
18-5	rechts	43	Hyperkeratose	2			71,61130479	14
18-5	rechts	43	Hyperkeratose	2	basal	A	60,76308041	14
18-5	rechts	43	Hyperkeratose	2	luminal	B	84,3679922	14
18-5	rechts	43	gesunde Mukosa	1			44,99966099	14
18-5	rechts	43	gesunde Mukosa	1	basal	A	28,69958375	14
18-5	rechts	43	gesunde Mukosa	1	luminal	B	57,26489885	14
18-5	rechts	45	Hyperkeratose	2			13,58959939	14
18-5	rechts	45	Hyperkeratose	2	basal	A	23,99468454	14
18-5	rechts	45	Hyperkeratose	2	luminal	B	1,43303325	14
18-5	rechts	45	Dysplasie	4			7,28234917	14
18-5	rechts	45	Hyperplasie	3			0,0261741	14
20-7	rechts	26	Hyperkeratose	2			73,43382551	14
20-7	rechts	26	Hyperkeratose	2	basal	A	78,3266395	14

20-7	rechts	26	Hyperkeratose	2	luminal	B	75,14261836	14
20-7	rechts	26	mikroinvasives Ca	5			3,30056123	14
20-7	rechts	43	gesunde Mukosa	1			90,65348159	14
20-7	rechts	43	gesunde Mukosa	1	basal	A	89,96322403	14
20-7	rechts	43	gesunde Mukosa	1	luminal	B	97,16733453	14
20-7	rechts	43	Hyperkeratose	2			78,50125469	14
20-7	rechts	45	Hyperkeratose	2			6,55338163	14
20-7	rechts	45	Hyperkeratose	2	basal	A	13	14
20-7	rechts	45	Hyperkeratose	2	luminal	B	0,04510209	14
20-7	rechts	45	mikroinvasives Ca	5			8,88338383	14
21-8	rechts	26	Hyperkeratose	2			44,18989165	14
21-8	rechts	26	Hyperkeratose	2	basal	A	36,65822423	14
21-8	rechts	26	Hyperkeratose	2	luminal	B	45,00722316	14
21-8	rechts	26	mäßig differenziertes Ca	7			26,13224109	14
21-8	rechts	26	Hornperle	8			50,0906486	14
21-8	rechts	43	Hyperkeratose	2			17,87081674	14
21-8	rechts	43	Hyperkeratose	2	basal	A	20,39185452	14
21-8	rechts	43	Hyperkeratose	2	luminal	B	14,01779181	14
21-8	rechts	43	mäßig differenziertes Ca	7			12,23337838	14
21-8	rechts	43	Hornperle	8			32,17635641	14
21-8	rechts	45	Hyperkeratose	2			0,02819708	14
21-8	rechts	45	mäßig differenziertes Ca	7			4,21829939	14
21-8	rechts	45	Hornperle	8			16,13542879	14
22-9	rechts	26	Hyperkeratose	2			10,49830823	14
22-9	rechts	26	Hyperkeratose	2	basal	A	6,69878168	14
22-9	rechts	26	Hyperkeratose	2	luminal	B	12,56174049	14
22-9	rechts	26	Dysplasie	4			3,56560121	14
22-9	rechts	43	Hyperkeratose	2			78,23195343	14
22-9	rechts	45	Hyperkeratose	2			14,20772877	14
22-9	rechts	45	Hyperkeratose	2	basal	A	19,11576574	14
22-9	rechts	45	Hyperkeratose	2	luminal	B	4,81099656	14
22-9	rechts	45	Dysplasie	4			45,3817155	14
23-9	links	26	Hyperkeratose	2			38,02761992	14
23-9	links	43	gesunde Mukosa	1			76,2524558	14
23-9	links	43	gesunde Mukosa	1	basal	A	76,23318386	14
23-9	links	43	gesunde Mukosa	1	luminal	B	79,03209477	14
23-9	links	43	Hyperkeratose	2			78,26108518	14
23-9	links	45	gesunde Mukosa	1			3,70020874	14
23-9	links	45	gesunde Mukosa	1	basal	A	9,30232558	14
23-9	links	45	gesunde Mukosa	1	luminal	B	0,14254791	14
23-9	links	45	Hyperkeratose	2			9,82957089	14
24-1	links	26	Hyperkeratose	2			6,56425681	14
24-1	links	26	Hyperkeratose	2	basal	A	1,35538064	14
24-1	links	26	Hyperkeratose	2	luminal	B	10,19042483	14
24-1	links	26	Dysplasie	4			0,39539996	14

24-1	links	26	mikroinvasives Ca	5			1,57968726	14
24-1	links	43	Hyperkeratose	2			30,64221136	14
24-1	links	43	Hyperkeratose	2	basal	A	70,05669328	14
24-1	links	43	Hyperkeratose	2	luminal	B	6,80173929	14
24-1	links	43	Dysplasie	4			11,13363615	14
24-1	links	43	mikroinvasives Ca	5			9,9826537	14
24-1	links	45	Hyperkeratose	2			92,25899091	14
24-1	links	45	Hyperkeratose	2	basal	A	97,68712493	14
24-1	links	45	Hyperkeratose	2	luminal	B	96,65380141	14
24-1	links	45	Dysplasie	4			92,18169457	14
24-1	links	45	mikroinvasives Ca	5			55,39433071	14
25-1	rechts	26	gesunde Mukosa	1			2,37860892	19
25-1	rechts	45	gesunde Mukosa	1			81,36390048	19
25-1	rechts	45	gesunde Mukosa	1	basal	A	89,78469995	19
25-1	rechts	45	gesunde Mukosa	1	luminal	B	74,19141186	19
26-2	links	26	gesunde Mukosa	1			0,04592071	19
26-2	links	26	gesunde Mukosa	1	basal	A	0,07679017	19
26-2	links	26	gesunde Mukosa	1	luminal	B	0,03458712	19
26-2	links	43	gesunde Mukosa	1			76,62016202	19
26-2	links	43	gesunde Mukosa	1	basal	A	80,71910112	19
26-2	links	43	gesunde Mukosa	1	luminal	B	91,1550152	19
26-2	links	45	gesunde Mukosa	1			53,40259939	19
26-2	links	45	gesunde Mukosa	1	basal	A	87,46810899	19
26-2	links	45	gesunde Mukosa	1	luminal	B	30,96404377	19
28-3	links	26	gesunde Mukosa	1			71,66523994	19
28-3	links	26	gesunde Mukosa	1	basal	A	54,07009878	19
28-3	links	26	gesunde Mukosa	1	luminal	B	93,65459308	19
28-3	links	43	gesunde Mukosa	1			74,07813767	19
28-3	links	43	gesunde Mukosa	1	basal	A	71,13241462	19
28-3	links	43	gesunde Mukosa	1	luminal	B	89,90082414	19
28-3	links	45	gesunde Mukosa	1			76,75220456	19
28-3	links	45	gesunde Mukosa	1	basal	A	74,67038716	19
28-3	links	45	gesunde Mukosa	1	luminal	B	84,39166263	19
29-3	rechts	26	Hyperkeratose	2			15,70933399	19
29-3	rechts	26	Hyperkeratose	2	basal	A	7,39619484	19
29-3	rechts	26	Hyperkeratose	2	luminal	B	32,95539311	19
29-3	rechts	26	Dysplasie	4			30,23324716	19
29-3	rechts	26	mikroinvasives Ca	5			19,10182194	19
29-3	rechts	43	Hyperkeratose	2			85,08351249	19
29-3	rechts	43	Hyperkeratose	2	basal	A	85,92263136	19
29-3	rechts	43	Hyperkeratose	2	luminal	B	88,81919906	19
29-3	rechts	43	Dysplasie	4			8,2547426	19
29-3	rechts	43	mikroinvasives Ca	5			50,25529675	19
29-3	rechts	45	Hyperkeratose	2			71,62413819	19
29-3	rechts	45	Hyperkeratose	2	basal	A	92,83231296	19

29-3	rechts	45	Hyperkeratose	2	luminal	B	64,44732485	19
29-3	rechts	45	Dysplasie	4			55,5766482	19
29-3,d	rechts	45	mikroinvasives Ca	5			44,13618035	19
30-4	links	26	gesunde Mukosa	1			14,7660743	19
30-4	links	26	gesunde Mukosa	1	basal	A	13,31210581	19
30-4	links	26	gesunde Mukosa	1	luminal	B	16,20510238	19
30-4	links	43	gesunde Mukosa	1			19,90006726	19
30-4	links	43	gesunde Mukosa	1	basal	A	14,31608788	19
30-4	links	43	gesunde Mukosa	1	luminal	B	26,35031708	19
30-4	links	45	gesunde Mukosa	1			96,875	19
30-4	links	45	gesunde Mukosa	1	basal	A	99,29322218	19
30-4	links	45	gesunde Mukosa	1	luminal	B	95,17838483	19
31-4	rechts	26	Hyperkeratose	2			75,37809494	19
31-4	rechts	26	Hyperkeratose	2	basal	A	55,62313274	19
31-4	rechts	26	Hyperkeratose	2	luminal	B	88,2314612	19
31-4	rechts	26	Dysplasie	4			4,00900875	19
31-4	rechts	26	mikroinvasives Ca	5			8,87615843	19
31-4,e	rechts	26	gut differenziertes Ca	6			8,87615843	19
31-4	rechts	26	mäßig differenziertes Ca	7			8,87615843	19
31-4	rechts	26	Hornperle	8			13,14424871	19
31-4	rechts	43	Hyperkeratose	2			63,03470541	19
31-4	rechts	43	Hyperkeratose	2	basal	A	82,90091632	19
31-4	rechts	43	Hyperkeratose	2	luminal	B	40,16458956	19
31-4	rechts	43	Dysplasie	4			19,86621857	19
31-4	rechts	43	mikroinvasives Ca	5			47,44442881	19
31-4,f	rechts	43	gut differenziertes Ca	6			47,44442881	19
31-4	rechts	45	Hyperkeratose	2			75,37809494	19
31-4	rechts	45	Hyperkeratose	2	basal	A	55,62313274	19
31-4	rechts	45	Hyperkeratose	2	luminal	B	88,2314612	19
31-4	rechts	45	Dysplasie	4			4,00900875	19
31-4	rechts	45	mikroinvasives Ca	5			8,87615843	19
31-4	rechts	45	gut differenziertes Ca	6			8,87615843	19
31-4	rechts	45	mäßig differenziertes Ca	7			8,87615843	19
31-4	rechts	45	Hornperle	8			13,14424871	19
32-2	rechts	26	gesunde Mukosa	1			0	19
32-2	rechts	43	gesunde Mukosa	1			61,21877234	19
32-2	rechts	43	gesunde Mukosa	1	basal	A	51,24628616	19
32-2	rechts	43	gesunde Mukosa	1	luminal	B	49,92464051	19
32-2	rechts	43	Hyperkeratose	2			12,89231205	19
32-2	rechts	43	Hyperkeratose	2	basal	A	16,01639712	19
32-2	rechts	43	Hyperkeratose	2	luminal	B	12,08586394	19
32-2	rechts	43	mikroinvasives Ca	5			3,37785151	19
32-2	rechts	43	Dysplasie	4			1,1574417	19
32-2	rechts	45	gesunde Mukosa	1			68,21067437	19
32-2	rechts	45	gesunde Mukosa	1	basal	A	91,71465725	19

32-2	rechts	45	gesunde Mukosa	1	luminal	B	55,83408572	19
32-2	rechts	45	Hyperkeratose	2			67,31124624	19
32-2	rechts	45	Hyperkeratose	2	basal	A	67,68553351	19
32-2	rechts	45	Hyperkeratose	2	luminal	B	70,5472229	19
32-2	rechts	45	mikroinvasives Ca	5			28,35268149	19
32-2	rechts	45	Dysplasie	4			21,65963066	19
33-5	links	26	gesunde Mukosa	1			0	19
33-5	links	26	gesunde Mukosa	1	basal	A	0	19
33-5	links	26	gesunde Mukosa	1	luminal	B	0	19
33-5	links	43	gesunde Mukosa	1			85,16118192	19
33-5	links	43	gesunde Mukosa	1	basal	A	60,85215168	19
33-5	links	43	gesunde Mukosa	1	luminal	B	91,15353371	19
33-5	links	45	gesunde Mukosa	1			54,67426382	19
33-5	links	45	gesunde Mukosa	1	basal	A	88,33520951	19
33-5	links	45	gesunde Mukosa	1	luminal	B	12,56457381	19
34-5	rechts	26	gesunde Mukosa	1			19,20230413	19
34-5	rechts	26	gesunde Mukosa	1	basal	A	7,88713802	19
34-5	rechts	26	gesunde Mukosa	1	luminal	B	35,93567768	19
34-5	rechts	26	Hyperkeratose	2			41,71443427	19
34-5	rechts	26	Hyperkeratose	2	basal	A	34,514703	19
34-5	rechts	26	Hyperkeratose	2	luminal	B	39,86788789	19
34-5	rechts	26	Dysplasie	4			10,30027234	19
34-5	rechts	43	gesunde Mukosa	1			69,37896268	19
34-5	rechts	43	gesunde Mukosa	1	basal	A	74,95311838	19
34-5	rechts	43	gesunde Mukosa	1	luminal	B	67,29452533	19
34-5	rechts	43	Hyperkeratose	2			79,63113481	19
34-5	rechts	43	Hyperkeratose	2	basal	A	70,49458015	19
34-5	rechts	43	Hyperkeratose	2	luminal	B	88,0016435	19
34-5	rechts	43	Dysplasie	4			3,13281225	19
34-5	rechts	45	gesunde Mukosa	1			29,88651388	19
34-5	rechts	45	gesunde Mukosa	1	basal	A	28,96379976	19
34-5	rechts	45	gesunde Mukosa	1	luminal	B	23,40196474	19
34-5	rechts	45	Hyperkeratose	2			5,3791612	19
34-5	rechts	45	Hyperkeratose	2	basal	A	3,05046452	19
34-5	rechts	45	Hyperkeratose	2	luminal	B	8,9003006	19
34-5,g	rechts	45	Dysplasie	4			29,64817608	19
35-6,	links	26	gesunde Mukosa	1			18,69906675	19
35-6	links	26	gesunde Mukosa	1	basal	A	2,18001122	19
35-6	links	26	gesunde Mukosa	1	luminal	B	37,79095439	19
35-6	links	43	gesunde Mukosa	1			51,44065282	19
35-6	links	43	gesunde Mukosa	1	basal	A	39,22797862	19
35-6	links	43	gesunde Mukosa	1	luminal	B	70,54594983	19
35-6,h	links	45	gesunde Mukosa	1			73,08935094	19
35-6	links	45	gesunde Mukosa	1	basal	A	94,8237037	19
35-6	links	45	gesunde Mukosa	1	luminal	B	46,07756998	19

36-6	rechts	26	gesunde Mukosa	1			13,30389352	19
36-6	rechts	26	gesunde Mukosa	1	basal	A	2,14063511	19
36-6	rechts	26	gesunde Mukosa	1	luminal	B	22,41130724	19
36-6	rechts	26	Hyperkeratose	2			25,08815493	19
36-6	rechts	26	Hyperkeratose	2	basal	A	7,75085817	19
36-6	rechts	26	Hyperkeratose	2	luminal	B	52,65149922	19
36-6	rechts	26	mikroinvasives Ca	5			10,05101757	19
36-6	rechts	26	mäßig differenziertes Ca	7			5,0594657	19
36-6	rechts	26	mäßig differenziertes Ca	7			3,21613071	19
36-6	rechts	43	gesunde Mukosa	1			86,86904306	19
36-6	rechts	43	gesunde Mukosa	1	basal	A	89,12351509	19
36-6	rechts	43	gesunde Mukosa	1	luminal	B	91,52740185	19
36-6	rechts	43	Hyperkeratose	2			78,75198706	19
36-6	rechts	43	Hyperkeratose	2	basal	A	76,57739098	19
36-6	rechts	43	Hyperkeratose	2	luminal	B	85,3673065	19
36-6	rechts	43	mikroinvasives Ca	5			42,10760386	19
36-6	rechts	43	mäßig differenziertes Ca	7			6,36387128	19
36-6	rechts	43	mäßig differenziertes Ca	7			20,39334594	19
36-6	rechts	43	Dysplasie	4			21,05712463	19
36-6	rechts	45	gesunde Mukosa	1			4,06785014	19
36-6	rechts	45	gesunde Mukosa	1	basal	A	7,80832477	19
36-6	rechts	45	gesunde Mukosa	1	luminal	B	0,12718372	19
36-6	rechts	45	Hyperkeratose	2			0,29352253	19
36-6	rechts	45	Hyperkeratose	2	basal	A	0,48207592	19
36-6	rechts	45	Hyperkeratose	2	luminal	B	0,00643666	19
36-6	rechts	45	mikroinvasives Ca	5			5,82798213	19
36-6	rechts	45	mäßig differenziertes Ca	7			6,07672038	19
36-6	rechts	45	mäßig differenziertes Ca	7			3,0642568	19
36-6	rechts	45	Dysplasie	4			3,17864258	19
37-7	links	26	gesunde Mukosa	1			20,20554586	19
37-7	links	26	gesunde Mukosa	1	basal	A	27,6022972	19
37-7	links	26	gesunde Mukosa	1	luminal	B	28,48321723	19
37-7	links	43	gesunde Mukosa	1			61,81770697	19
37-7	links	43	gesunde Mukosa	1	basal	A	53,56339085	19
37-7	links	43	Gesunde Mukosa	1	luminal	B	59,35428694	19
37-7	links	45	gesunde Mukosa	1			76,61548764	19
37-7	links	45	gesunde Mukosa	1	basal	A	87,56078584	19
37-7	links	45	gesunde Mukosa	1	luminal	B	55,1841601	19
38-7	rechts	26	Hyperkeratose	2			0,74988356	19
38-7	rechts	26	Hyperkeratose	2	basal	A	0,99838021	19
38-7	rechts	26	Hyperkeratose	2	luminal	B	0,34525496	19
38-7	rechts	26	Dysplasie	4			1,03530101	19
38-7	rechts	26	mikroinvasives Ca	5			8,82104448	19
38-7	rechts	26	gut differenziertes Ca	6			8,82104448	19
38-7	rechts	26	Hornperle	8			31,36694494	19

38-7	rechts	43	Hyperkeratose	2			54,1591503	19
38-7	rechts	43	Hyperkeratose	2	basal	A	67,58899425	19
38-7	rechts	43	Hyperkeratose	2	luminal	B	41,62993663	19
38-7	rechts	43	Dysplasie	4			2,52738478	19
38-7	rechts	43	mikroinvasives Ca	5			25,65250393	19
38-7	rechts	43	gut differenziertes Ca	6			25,65250393	19
38-7	rechts	43	Hornperle	8			31,77638539	19
38-7	rechts	45	Hyperkeratose	2			27,74021622	19
38-7	rechts	45	Hyperkeratose	2	basal	A	30,9700202	19
38-7	rechts	45	Hyperkeratose	2	luminal	B	21,67258181	19
38-7	rechts	45	Dysplasie	4			4,27589464	19
38-7	rechts	45	mikroinvasives Ca	5			22,39276085	19
38-7	rechts	45	gut differenziertes Ca	6			22,39276085	19
38-7	rechts	45	Hornperle	8			58,65407203	19
39-8	links	26	gesunde Mukosa	1			10,6736373	19
39-8	links	26	gesunde Mukosa	1	basal	A	3,608016	19
39-8	links	26	gesunde Mukosa	1	luminal	B	14,16505064	19
39-8	links	43	gesunde Mukosa	1			88,25444062	19
39-8	links	43	gesunde Mukosa	1	basal	A	85,42584811	19
39-8	links	43	gesunde Mukosa	1	luminal	B	88,03483212	19
39-8	links	45	gesunde Mukosa	1			68,80701381	19
39-8	links	45	gesunde Mukosa	1	basal	A	89,21583051	19
39-8	links	45	gesunde Mukosa	1	luminal	B	18,63156218	19
40-8	rechts	26	Hyperkeratose	2			21,57429939	19
40-8	rechts	26	Hyperkeratose	2	basal	A	5,11993022	19
40-8	rechts	26	Hyperkeratose	2	luminal	B	52,59852955	19
40-8	rechts	26	Dysplasie	4			14,7222387	19
40-8	rechts	26	mikroinvasives Ca	5			2,64700137	19
40-8	rechts	26	gut differenziertes Ca	6			2,0284759	19
40-8	rechts	43	Hyperkeratose	2			74,8572122	19
40-8	rechts	43	Hyperkeratose	2	basal	A	63,72742464	19
40-8	rechts	43	Hyperkeratose	2	luminal	B	80,59806643	19
40-8	rechts	43	Dysplasie	4			6,62244259	19
40-8	rechts	43	mikroinvasives Ca	5			44,06804046	19
40-8	rechts	43	gut differenziertes Ca	6			19,08388096	19
40-8	rechts	45	Hyperkeratose	2			80,72245246	19
40-8	rechts	45	Hyperkeratose	2	basal	A	73,80091911	19
40-8	rechts	45	Hyperkeratose	2	luminal	B	84,20202094	19
40-8	rechts	45	Dysplasie	4			72,80574689	19
40-8	rechts	45	mikroinvasives Ca	5			48,87888196	19
40-8	rechts	45	gut differenziertes Ca	6			21,36057462	19
41-9	links	26	gesunde Mukosa	1			0	19
41-9	links	26	gesunde Mukosa	1	basal	A	0	19
41-9	links	26	gesunde Mukosa	1	luminal	B	0	19
41-9	links	43	gesunde Mukosa	1			81,89231133	19

41-9	links	43	gesunde Mukosa	1	basal	A	82,44782225	19
41-9	links	43	gesunde Mukosa	1	luminal	B	82,63726373	19
41-9	links	45	gesunde Mukosa	1			60,30998718	19
41-9	links	45	gesunde Mukosa	1	basal	A	93,32383835	19
41-9	links	45	gesunde Mukosa	1	luminal	B	38,37406546	19
42-9	rechts	26	gesunde Mukosa	1			30,83141885	19
42-9	rechts	26	gesunde Mukosa	1	basal	A	16,6080246	19
42-9	rechts	26	gesunde Mukosa	1	luminal	B	49,10854062	19
42-9	rechts	26	Hyperkeratose	2			26,06617268	19
42-9	rechts	26	Hyperkeratose	2	basal	A	11,40447416	19
42-9	rechts	26	Hyperkeratose	2	luminal	B	46,24401401	19
42-9,i	rechts	26	Dysplasie	4			4,66356589	19
42-9	rechts	43	gesunde Mukosa	1			44,34466872	19
42-9	rechts	43	gesunde Mukosa	1	basal	A	42,73266259	19
42-9	rechts	43	gesunde Mukosa	1	luminal	B	40,35150009	19
42-9	rechts	43	Hyperkeratose	2			44,63723764	19
42-9	rechts	43	Hyperkeratose	2	basal	A	54,41629889	19
42-9	rechts	43	Hyperkeratose	2	luminal	B	37,77021963	19
42-9	rechts	43	Dysplasie	4			8,91238769	19
42-9	rechts	45	Hyperkeratose	2			54,12356203	19
42-9	rechts	45	Hyperkeratose	2	basal	A	18,00907274	19
42-9	rechts	45	Hyperkeratose	2	luminal	B	79,11332786	19
42-9	rechts	45	Dysplasie	4			5,0411754	19
43-10	rechts	26	gesunde Mukosa	1			38,02339315	19
43-10	rechts	26	gesunde Mukosa	1	basal	A	29,60667279	19
43-10	rechts	26	gesunde Mukosa	1	luminal	B	47,41246929	19
43-10	rechts	26	Hyperkeratose	2			39,32198252	19
43-10	rechts	26	Hyperkeratose	2	basal	A	38,93867837	19
43-10	rechts	26	Hyperkeratose	2	luminal	B	43,77405923	19
43-10	rechts	26	Dysplasie	4			11,75678582	19
43-10	rechts	43	gesunde Mukosa	1			77,90270982	19
43-10	rechts	43	gesunde Mukosa	1	basal	A	76,26274603	19
43-10	rechts	43	gesunde Mukosa	1	luminal	B	80,56798623	19
43-10	rechts	43	Hyperkeratose	2			34,89966679	19
43-10	rechts	43	Hyperkeratose	2	basal	A	54,67096435	19
43-10	rechts	43	Hyperkeratose	2	luminal	B	11,30144412	19
43-10	rechts	43	Dysplasie	4			6,72371875	19
43-10	rechts	45	Hyperkeratose	2			76,98336286	14
43-10	rechts	45	Hyperkeratose	2	basal	A	90,23741038	14
43-10	rechts	45	Hyperkeratose	2	luminal	B	61,57583913	14
43-10	rechts	45	mikroinvasives Ca	5			32,79830614	14

10.2 Daten der semiquantitativen Auswertung

Die Ergebnisse der semiquantitativen Untersuchung sind in der nachfolgenden Tabelle zusammengefasst.

Für die mikroskopisch ermittelte Intensität der Braunfärbung des Gewebes von Kern, Plasma und Membran (vgl. jeweils Spalte 4) wurde nach folgender Systematik ein Zahlencode (vgl. Spalte 5) vergeben:

Zahlen	Farbintensität des Präparates
0	negative Farbausprägung
1	schwache Farbausprägung
2	mittlere Farbausprägung
3	starke Farbausprägung

Zusätzlich werden noch der pathologische Befund der Schleimhaut bzw. der entsprechende Zahlencode (vgl. Spalte 6 und 7) angegeben.

1 Präparat	2 Seite	3 Gen	4 Lokalisation Kern	5 Zahlencode Farbintensität	6 Path. Befund Schleimhaut	7 path. Befund (Code)
1-13,6	links	26	K	0	gesunde Mukosa	1
2-13,6	rechts	26	K	1	gesunde Mukosa	1
3-13,7	links	26	K	1	gesunde Mukosa	1
4-13,7	rechts	26	K	0	Hyperkeratose	2
5-13,8	links	26	K	1	gesunde Mukosa	1
6-13,8	rechts	26	K	0	Dysplasie	4
7-13,9	links	26	K	0	gesunde Mukosa	1
8-13,9	rechts	26	K	0	Hyperkeratose	2
10-13,10	rechts	26	K	0	Hyperkeratose	2
12-14,2	rechts	26	K	0	Hyperkeratose	2
13-14,3	rechts	26	K	0	Hyperkeratose	2
15-14,5	rechts	26	K	0	gesunde Mukosa	1
16-3	rechts	26	K	1	Dysplasie	4
17-4	rechts	26	K	0	Hyperkeratose	1
18-5	rechts	26	K	0	Dysplasie	4
20-7	rechts	26	K	0	mikroinvasives Ca	5
21-8	rechts	26	K	0	mäßig differenziertes Ca	7
22-9	rechts	26	K	0	Hyperkeratose	2
24-1	links	26	K	0	mikroinvasives Ca	5
26-2	links	26	K	0	gesunde Mukosa	1
28-3	links	26	K	0	gesunde Mukosa	1
29-3	rechts	26	K	0	mikroinvasives Ca	5
30-4	links	26	K	0	gesunde Mukosa	1
31-4	rechts	26	K	0	mäßig differenziertes Ca	7
33-5	links	26	K	0	gesunde Mukosa	1
34-5	rechts	26	K	0	gut differenziertes Ca	6
35-6	links	26	K	0	gesunde Mukosa	1
36-6	rechts	26	K	0	mäßig differenziertes Ca	7
37-7	links	26	K	0	gesunde Mukosa	1
38-7	rechts	26	K	0	gut differenziertes Ca	6

39-8	links	26	K	0	gesunde Mukosa	1
40-8	rechts	26	K	0	gut differenziertes Ca	6
41-9	links	26	K	0	gesunde Mukosa	1
42-9	rechts	26	K	1	Dysplasie	4
43-10	rechts	26	K	0	Dysplasie	4

1 Präparat	2 Seite	3 Gen	4 Lokalisation Plasma	5 Zahlencode Farbintensität	6 Path. Befund Schleimhaut	7 path. Befund (Code)
1-13,6	links	26	P	3	gesunde Mukosa	1
2-13,6	rechts	26	P	2	gesunde Mukosa	1
3-13,7	links	26	P	1	gesunde Mukosa	1
4-13,7	rechts	26	P	2	Hyperkeratose	2
5-13,8	links	26	P	2	gesunde Mukosa	1
6-13,8	rechts	26	P	1	Dysplasie	4
7-13,9	links	26	P	1	gesunde Mukosa	1
8-13,9	rechts	26	P	1	Hyperkeratose	2
10-13,10	rechts	26	P	1	Hyperkeratose	2
12-14,2	rechts	26	P	2	Hyperkeratose	2
13-14,3	rechts	26	P	2	Hyperkeratose	2
15-14,5	rechts	26	P	1	gesunde Mukosa	1
16-3	rechts	26	P	2	Dysplasie	4
17-4	rechts	26	P	1	Hyperkeratose	1
18-5	rechts	26	P	2	Dysplasie	4
20-7	rechts	26	P	0	mikroinvasives Ca	5
21-8	rechts	26	P	0	mäßig differenziertes Ca	7
22-9	rechts	26	P	1	Hyperkeratose	2
24-1	links	26	P	0	mikroinvasives Ca	5
26-2	links	26	P	1	gesunde Mukosa	1
28-3	links	26	P	2	gesunde Mukosa	1
29-3	rechts	26	P	1	mikroinvasives Ca	5
30-4	links	26	P	1	gesunde Mukosa	1
31-4	rechts	26	P	1	mäßig differenziertes Ca	7
33-5	links	26	P	0	gesunde Mukosa	1
34-5	rechts	26	P	1	gut differenziertes Ca	6
35-6	links	26	P	2	gesunde Mukosa	1
36-6	rechts	26	P	1	mäßig differenziertes Ca	7
37-7	links	26	P	2	gesunde Mukosa	1
38-7	rechts	26	P	0	gut differenziertes Ca	6
39-8	links	26	P	2	gesunde Mukosa	1
40-8	rechts	26	P	1	gut differenziertes Ca	6
41-9	links	26	P	1	gesunde Mukosa	1
42-9	rechts	26	P	1	Dysplasie	4
43-10	rechts	26	P	2	Dysplasie	4

1 Präparat	2 Seite	3 Gen	4 Lokalisation Membran	5 Zahlencode Farbintensität)	6 Path. Befund Schleimhaut	7 path. Befund (Code)
1-13,6	links	26	M	0	gesunde Mukosa	1
2-13,6	rechts	26	M	0	gesunde Mukosa	1
3-13,7	links	26	M	0	gesunde Mukosa	1
4-13,7	rechts	26	M	0	Hyperkeratose	2
5-13,8	links	26	M	0	gesunde Mukosa	1
6-13,8	rechts	26	M	0	Dysplasie	4

7-13,9	links	26	M	0	gesunde Mukosa	1
8-13,9	rechts	26	M	0	Hyperkeratose	2
10-13,10	rechts	26	M	0	Hyperkeratose	2
12-14,2	rechts	26	M	0	Hyperkeratose	2
13-14,3	rechts	26	M	0	Hyperkeratose	2
15-14,5	rechts	26	M	0	gesunde Mukosa	1
16-3	rechts	26	M	0	Dysplasie	4
17-4	rechts	26	M	0	Hyperkeratose	1
18-5	rechts	26	M	0	Dysplasie	4
20-7	rechts	26	M	0	mikroinvasives Ca	5
21-8	rechts	26	M	0	mäßig differenziertes Ca	7
22-9	rechts	26	M	0	Hyperkeratose	2
24-1	links	26	M	0	mikroinvasives Ca	5
26-2	links	26	M	0	gesunde Mukosa	1
28-3	links	26	M	0	gesunde Mukosa	1
29-3	rechts	26	M	0	mikroinvasives Ca	5
30-4	links	26	M	0	gesunde Mukosa	1
31-4	rechts	26	M	0	mäßig differenziertes Ca	7
33-5	links	26	M	0	gesunde Mukosa	1
34-5	rechts	26	M	0	gut differenziertes Ca	6
35-6	links	26	M	0	gesunde Mukosa	1
36-6	rechts	26	M	0	mäßig differenziertes Ca	7
37-7	links	26	M	0	gesunde Mukosa	1
38-7	rechts	26	M	0	gut differenziertes Ca	6
39-8	links	26	M	0	gesunde Mukosa	1
40-8	rechts	26	M	0	gut differenziertes Ca	6
41-9	links	26	M	0	gesunde Mukosa	1
42-9	rechts	26	M	0	Dysplasie	4
43-10	rechts	26	M	0	Dysplasie	4

1 Präparat	2 Seite	3 Gen	4 Lokalisation Kern	5 Zahlencode Farbintensität	6 Path. Befund Schleimhaut	7 path. Befund (Code)
1-13,6	links	43	K	0	gesunde Mukosa	1
2-13,6	rechts	43	K	0	gesunde Mukosa	1
3-13,7	links	43	K	0	gesunde Mukosa	1
4-13,7	rechts	43	K	0	Hyperkeratose	2
5-13,8	links	43	K	0	gesunde Mukosa	1
6-13,8	rechts	43	K	1	Dysplasie	4
7-13,9	links	43	K	0	gesunde Mukosa	1
8-13,9	rechts	43	K	0	Hyperkeratose	2
10-13,10	rechts	43	K	0	Hyperkeratose	2
12-14,2	rechts	43	K	0	Hyperkeratose	2
13-14,3	rechts	43	K	0	Hyperkeratose	2
15-14,5	rechts	43	K	0	gesunde Mukosa	1
16-3	rechts	43	K	0	Dysplasie	4
17-4	rechts	43	K	0	Hyperkeratose	2
18-5	rechts	43	K	0	gesunde Mukosa	1
20-7	rechts	43	K	0	gesunde Mukosa	1
21-8	rechts	43	K	0	mäßig differenziertes Ca	7
23-9	links	43	K	0	gesunde Mukosa	1
24-1	links	43	K	0	mikroinvasives Ca	5
26-2	links	43	K	0	gesunde Mukosa	1
28-3	links	43	K	0	gesunde Mukosa	1
29-3	rechts	43	K	0	mikroinvasives Ca	5
30-4	links	43	K	0	gesunde Mukosa	1

31-4	rechts	43	K	0	gut differenziertes Ca	6
32-2	rechts	43	K	0	mikroinvasives Ca	5
33-5	links	43	K	0	gesunde Mukosa	1
34-5	rechts	43	K	0	Dysplasie	4
35-6	links	43	K	0	gesunde Mukosa	1
36-6	rechts	43	K	0	mäßig differenziertes Ca	7
37-7	links	43	K	0	gesunde Mukosa	1
38-7	rechts	43	K	0	gut differenziertes Ca	6
39-8	links	43	K	0	gesunde Mukosa	1
40-8	rechts	43	K	0	gut differenziertes Ca	6
41-9	links	43	K	0	gesunde Mukosa	1
42-9	rechts	43	K	0	Dysplasie	4
43-10	rechts	43	K	0	Dysplasie	4

1 Präparat	2 Seite	3 Gen	4 Lokalisation Plasma	5 Zahlencode Farbintensität	6 Path. Befund Schleimhaut	7 path. Befund (Code)
1-13,6	links	43	P	3	gesunde Mukosa	1
2-13,6	rechts	43	P	2	gesunde Mukosa	1
3-13,7	links	43	P	2	gesunde Mukosa	1
4-13,7	rechts	43	P	2	Hyperkeratose	2
5-13,8	links	43	P	2	gesunde Mukosa	1
6-13,8	rechts	43	P	2	Dysplasie	4
7-13,9	links	43	P	3	gesunde Mukosa	1
8-13,9	rechts	43	P	1	Hyperkeratose	2
10-13,10	rechts	43	P	1	Hyperkeratose	2
12-14,2	rechts	43	P	3	Hyperkeratose	2
13-14,3	rechts	43	P	3	Hyperkeratose	2
15-14,5	rechts	43	P	1	gesunde Mukosa	1
16-3	rechts	43	P	3	Dysplasie	4
17-4	rechts	43	P	1	Hyperkeratose	2
18-5	rechts	43	P	3	gesunde Mukosa	1
20-7	rechts	43	P	1	gesunde Mukosa	1
21-8	rechts	43	P	1	mäßig differenziertes Ca	7
23-9	links	43	P	3	gesunde Mukosa	1
24-1	links	43	P	1	mikroinvasives Ca	5
26-2	links	43	P	2	gesunde Mukosa	1
28-3	links	43	P	3	gesunde Mukosa	1
29-3	rechts	43	P	2	mikroinvasives Ca	5
30-4	links	43	P	2	gesunde Mukosa	1
31-4	rechts	43	P	2	gut differenziertes Ca	6
32-2	rechts	43	P	1	mikroinvasives Ca	5
33-5	links	43	P	2	Gesunde Mukosa	1
34-5	rechts	43	P	2	Dysplasie	4
35-6	links	43	P	2	gesunde Mukosa	1
36-6	rechts	43	P	1	mäßig differenziertes Ca	7
37-7	links	43	P	3	gesunde Mukosa	1
38-7	rechts	43	P	2	gut differenziertes Ca	6
39-8	links	43	P	3	gesunde Mukosa	1
40-8	rechts	43	P	1	gut differenziertes Ca	6
41-9	links	43	P	2	gesunde Mukosa	1
42-9	rechts	43	P	1	Dysplasie	4
43-10	rechts	43	P	2	Dysplasie	4

1 Präparat	2 Seite	3 Gen	4 Lokalisation Membran	5 Zahlencode Farbintensität	6 Path. Befund Schleimhaut	7 path. Befund (Code)
1-13,6	links	43	M	0	gesunde Mukosa	1
2-13,6	rechts	43	M	0	gesunde Mukosa	1
3-13,7	links	43	M	0	gesunde Mukosa	1
4-13,7	rechts	43	M	3	Hyperkeratose	2
5-13,8	links	43	M	0	gesunde Mukosa	1
6-13,8	rechts	43	M	3	Dysplasie	4
7-13,9	links	43	M	0	gesunde Mukosa	1
8-13,9	rechts	43	M	1	Hyperkeratose	2
10-13,10	rechts	43	M	1	Hyperkeratose	2
12-14,2	rechts	43	M	0	Hyperkeratose	2
13-14,3	rechts	43	M	2	Hyperkeratose	2
15-14,5	rechts	43	M	1	gesunde Mukosa	1
16-3	rechts	43	M	1	Dysplasie	4
17-4	rechts	43	M	0	Hyperkeratose	2
18-5	rechts	43	M	2	gesunde Mukosa	1
20-7	rechts	43	M	0	gesunde Mukosa	1
21-8	rechts	43	M	0	mäßig differenziertes Ca	7
23-9	links	43	M	1	gesunde Mukosa	1
24-1	links	43	M	0	mikroinvasives Ca	5
26-2	links	43	M	1	gesunde Mukosa	1
28-3	links	43	M	1	gesunde Mukosa	1
29-3	rechts	43	M	3	mikroinvasives Ca	5
30-4	links	43	M	1	gesunde Mukosa	1
31-4	rechts	43	M	2	gut differenziertes Ca	6
32-2	rechts	43	M	2	mikroinvasives Ca	5
33-5	links	43	M	1	gesunde Mukosa	1
34-5	rechts	43	M	1	Dysplasie	4
35-6	links	43	M	1	gesunde Mukosa	1
36-6	rechts	43	M	1	mäßig differenziertes Ca	7
37-7	links	43	M	2	gesunde Mukosa	1
38-7	rechts	43	M	1	gut differenziertes Ca	6
39-8	links	43	M	2	gesunde Mukosa	1
40-8	rechts	43	M	1	gut differenziertes Ca	6
41-9	links	43	M	2	Gesunde Mukosa	1
42-9	rechts	43	M	2	Dysplasie	4
43-10	rechts	43	M	2	Dysplasie	4

1 Präparat	2 Seite	3 Gen	4 Lokalisation Kern	5 Zahlencode Farbintensität	6 Path. Befund Schleimhaut	7 path. Befund (Code)
1-13,6	links	45	K	0	gesunde Mukosa	1
2-13,6	rechts	45	K	0	gesunde Mukosa	1
3-13,7	links	45	K	0	gesunde Mukosa	1
4-13,7	rechts	45	K	3	Hyperkeratose	2
5-13,8	links	45	K	0	gesunde Mukosa	1
6-13,8	rechts	45	K	0	Dysplasie	4
7-13,9	links	45	K	0	gesunde Mukosa	1
8-13,9	rechts	45	K	0	Hyperkeratose	2
10-13,10	rechts	45	K	0	Hyperkeratose	2
12-14,2	rechts	45	K	3	Hyperkeratose	2
13-14,3	rechts	45	K	0	Hyperkeratose	2
15-14,5	rechts	45	K	1	gesunde Mukosa	1
16-3	rechts	45	K	2	Dysplasie	4

17-4	rechts	45	K	1	Hyperkeratose	2
18-5	rechts	45	K	0	Hyperkeratose	2
20-7	rechts	45	K	1	mikroinvasives Ca	5
21-8	rechts	45	K	0	mäßig differenziertes Ca	7
22-9	rechts	45	K	2	Dysplasie	4
23-9	links	45	K	0	Hyperkeratose	2
24-1	links	45	K	0	mikroinvasives Ca	5
25-1	rechts	45	K	0	gesunde Mukosa	1
26-2	links	45	K	0	gesunde Mukosa	1
28-3	links	45	K	0	gesunde Mukosa	1
29-3	rechts	45	K	2	mikroinvasives Ca	5
30-4	links	45	K	0	gesunde Mukosa	1
31-4	rechts	45	K	0	mäßig differenziertes Ca	7
32-2	rechts	45	K	0	mikroinvasives Ca	5
33-5	links	45	K	2	gesunde Mukosa	1
34-5	rechts	45	K	0	Dysplasie	4
35-6	links	45	K	0	gesunde Mukosa	1
36-6	rechts	45	K	0	mäßig differenziertes Ca	7
37-7	links	45	K	0	gesunde Mukosa	1
38-7	rechts	45	K	0	gut differenziertes Ca	6
39-8	links	45	K	0	gesunde Mukosa	1
40-8	rechts	45	K	2	gut differenziertes Ca	6
41-9	links	45	K	0	gesunde Mukosa	1
42-9	rechts	45	K	0	Dysplasie	4
43-10	rechts	45	K	3	mikroinvasives Ca	5

1 Präparat	2 Seite	3 Gen	4 Lokalisation Plasma	5 Zahlencode Farbintensität	6 Path. Befund Schleimhaut	7 path. Befund (Code)
1-13,6	links	45	P	3	gesunde Mukosa	1
2-13,6	rechts	45	P	2	gesunde Mukosa	1
3-13,7	links	45	P	2	gesunde Mukosa	1
4-13,7	rechts	45	P	3	Hyperkeratose	2
5-13,8	links	45	P	0	gesunde Mukosa	1
6-13,8	rechts	45	P	1	Dysplasie	4
7-13,9	links	45	P	2	gesunde Mukosa	1
8-13,9	rechts	45	P	2	Hyperkeratose	2
10-13,10	rechts	45	P	1	Hyperkeratose	2
12-14,2	rechts	45	P	3	Hyperkeratose	2
13-14,3	rechts	45	P	1	Hyperkeratose	2
15-14,5	rechts	45	P	1	gesunde Mukosa	1
16-3	rechts	45	P	0	Dysplasie	4
17-4	rechts	45	P	1	Hyperkeratose	2
18-5	rechts	45	P	1	Hyperkeratose	2
20-7	rechts	45	P	0	mikroinvasives Ca	5
21-8	rechts	45	P	0	mäßig differenziertes Ca	7
22-9	rechts	45	P	0	Dysplasie	4
23-9	links	45	P	0	Hyperkeratose	2
24-1	links	45	P	2	mikroinvasives Ca	5
25-1	rechts	45	P	2	gesunde Mukosa	1
26-2	links	45	P	2	gesunde Mukosa	1
28-3	links	45	P	2	gesunde Mukosa	1
29-3	rechts	45	P	1	mikroinvasives Ca	5
30-4	links	45	P	2	gesunde Mukosa	1
31-4	rechts	45	P	1	mäßig differenziertes Ca	7
32-2	rechts	45	P	1	mikroinvasives Ca	5

33-5	links	45	P	2	gesunde Mukosa	1
34-5	rechts	45	P	1	Dysplasie	4
35-6	links	45	P	2	gesunde Mukosa	1
36-6	rechts	45	P	1	mäßig differenziertes Ca	7
37-7	links	45	P	2	gesunde Mukosa	1
38-7	rechts	45	P	1	gut differenziertes Ca	6
39-8	links	45	P	2	gesunde Mukosa	1
40-8	rechts	45	P	1	gut differenziertes Ca	6
41-9	links	45	P	2	gesunde Mukosa	1
42-9	rechts	45	P	1	Dysplasie	4
43-10	rechts	45	P	2	mikroinvasives Ca	5

1 Präparat	2 Seite	3 Gen	4 Lokalisation Membran	5 Zahlencode Farbintensität	6 Path. Befund Schleimhaut	7 path. Befund (Code)
1-13,6	links	45	M	0	gesunde Mukosa	1
2-13,6	rechts	45	M	0	gesunde Mukosa	1
3-13,7	links	45	M	0	gesunde Mukosa	1
4-13,7	rechts	45	M	0	Hyperkeratose	2
5-13,8	links	45	M	0	gesunde Mukosa	1
6-13,8	rechts	45	M	0	Dysplasie	4
7-13,9	links	45	M	0	gesunde Mukosa	1
8-13,9	rechts	45	M	0	Hyperkeratose	2
10-13,10	rechts	45	M	0	Hyperkeratose	2
12-14,2	rechts	45	M	0	Hyperkeratose	2
13-14,3	rechts	45	M	0	Hyperkeratose	2
15-14,5	rechts	45	M	0	gesunde Mukosa	1
16-3	rechts	45	M	0	Dysplasie	4
17-4	rechts	45	M	0	Hyperkeratose	2
18-5	rechts	45	M	0	Hyperkeratose	2
20-7	rechts	45	M	0	mikroinvasives Ca	5
21-8	rechts	45	M	0	mäßig differenziertes Ca	7
22-9	rechts	45	M	0	Dysplasie	4
23-9	links	45	M	0	Hyperkeratose	2
24-1	links	45	M	0	mikroinvasives Ca	5
25-1	rechts	45	M	0	gesunde Mukosa	1
26-2	links	45	M	0	gesunde Mukosa	1
28-3	links	45	M	0	gesunde Mukosa	1
29-3	rechts	45	M	0	mikroinvasives Ca	5
30-4	links	45	M	0	gesunde Mukosa	1
31-4	rechts	45	M	0	mäßig differenziertes Ca	7
32-2	rechts	45	M	0	mikroinvasives Ca	5
33-5	links	45	M	0	gesunde Mukosa	1
34-5	rechts	45	M	0	Dysplasie	4
35-6	links	45	M	0	gesunde Mukosa	1
36-6	rechts	45	M	0	mäßig differenziertes Ca	7
37-7	links	45	M	0	gesunde Mukosa	1
38-7	rechts	45	M	0	gut differenziertes Ca	6
39-8	links	45	M	0	gesunde Mukosa	1
40-8	rechts	45	M	0	gut differenziertes Ca	6
41-9	links	45	M	0	gesunde Mukosa	1
42-9	rechts	45	M	0	Dysplasie	4
43-10	rechts	45	M	0	mikroinvasives Ca	5

10.3 Ergebnisse des Fisher-Tests

Mit Hilfe der Daten aus Anhang 2 wurden die Ergebnisse für den Fisher-Test ermittelt. Diese sind in den nachfolgenden Tabellen zusammengestellt.

Cx 26 Kern

Färbung Befund \	0	1	2	3	p-Wert
Gesund	11	3	0	0	p-Wert : 0,1185185
Dysplasie	3	2	0	0	
Karzinom	9	0	0	0	

Cx 26 Plasma

Färbung Befund \	0	1	2	3	p-Wert
Gesund	1	6	6	1	p-Wert: 0,04440401
Dysplasie	0	2	3	0	
Karzinom	4	5	0	0	

Cx 26 Membran

Färbung Befund \	0	1	2	3	p-Wert
Gesund	14	0	0	0	p-Wert: 1
Dysplasie	5	0	0	0	
Karzinom	9	0	0	0	

Cx 43 Kern

Färbung Befund	0	1	2	3	p-Wert
Gesund	17	0	0	0	p-Wert: 0,1666667
Dysplasie	4	1	0	0	
Karzinom	8	0	0	0	

Cx 43 Plasma

Färbung Befund	0	1	2	3	p-Wert
Gesund	0	2	8	7	p-Wert: 0.05354627
Dysplasie	0	1	3	1	
Karzinom	0	5	3	0	

Cx 43 Membran

Färbung Befund	0	1	2	3	p-Wert
Gesund	6	7	4	0	p-Wert: 0.6290338
Dysplasie	2	2	0	1	
Karzinom	2	3	2	1	

Cx 45 Kern

Färbung Befund	0	1	2	3	p-Wert
Gesund	13	1	1	0	p-Wert: 0.3316675
Dysplasie	3	0	2	0	
Karzinom	6	1	2	1	

Cx 45 Plasma

Färbung Befund	0	1	2	3	p-Wert
Gesund	1	1	12	1	p-Wert: 0.000461335
Dysplasie	2	3	0	0	
Karzinom	0	5	2	2	

Cx 45 Membran

Färbung Befund	0	1	2	3	p-Wert
Gesund	15	0	0	0	p-Wert: 1
Dysplasie	5	0	0	0	
Karzinom	10	0	0	0	

Danksagungen

Herrn Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Henning Schliephake danke ich für dieses interessante und spannende Promotionsthema.

Ohne Herrn Dr. med. Dr. med. dent. Florian Fialka wäre diese Arbeit nicht entstanden. Danke für seine außergewöhnliche Betreuung, welche sich in ständiger Erreichbarkeit, produktiver Kritik und seinem fortdauernden Einsatz zur Diskussion widerspiegelte.

Frau Antje Ahrbecker und Frau Christina Schäfer möchte ich für die hervorragende Zusammenarbeit im Labor und die Bereitstellung der histologischen Präparate danken.

Frau Dr. med. Julia Kitz danke ich für die semiquantitative Bestimmung der histologischen Präparate.