

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

**Eine vergleichende Genexpressionsanalyse von Gap-Junction-
Strukturproteinen in oralen Plattenepithelkarzinomen und gesunder
Schleimhaut**

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

vorgelegt von
Tobias Brodmann
aus
Leinefelde

Göttingen 2012

D e k a n: Prof. Dr. med. C. Frömmel

I. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Dr. med. dent. F.-J. Kramer

II. Berichterstatter/-in: Prof. Dr. med. F.H. Brembeck

III. Berichterstatter/-in: Prof. Dr. rer. nat. P. Virsik-Köpp

Tag der mündlichen Prüfung: 23. April 2012

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung.....	1
1.1	Epidemiologie des Mundhöhlenkarzinoms	1
1.2	Ätiologie, Risikofaktoren und Pathogenese des Mundhöhlenkarzinoms.....	1
1.3	Tumorbiologie.....	3
1.3.1	Modelle zur Karzinogenese.....	4
1.3.2	Biologische Progression.....	5
1.3.2.1	Onkogene.....	5
1.3.2.2	Tumorsuppressorgene	6
1.3.2.3	Migration, Invasivität und Motilität.....	7
1.3.3	Klinische Progression.....	9
1.3.3.1	TNM-Klassifikation.....	9
1.3.3.2	Prognose.....	11
1.4	Connexine und Gap-Junctional-Intercellular-Communication.....	11
1.4.1	Gap-Junctional-Intercellular-Communication (GJIC).....	12
1.4.2	Connexine.....	13
1.4.3	Connexine und Tumorgenese.....	14
1.5	Fragestellung.....	20
2.	Material und Methoden.....	21
2.1	Patienten	21
2.2	Materialien.....	21
2.2.1	Geräte.....	21
2.2.2	Enzyme und Kits	22
2.2.3	Lösungen	22
2.2.4	Software.....	22
2.3	RNA- Isolierung.....	23
2.4	Quantifizierung und Qualitätskontrolle.....	24
2.5	Real-time PCR	24
2.5.1	Reverse Transkription.....	24
2.5.2	Primer	25
2.5.3	Schmelztemperatur.....	25
2.5.4	Real- Time- PCR.....	26
2.6	Statistische Analyse: Auswertung der real-time PCR.....	28

3.	Ergebnisse	29
3.1	Expression der Connexinsubtypen in oraler humaner Schleimhaut	29
3.2	Differentielle Connexinexpression im oralen Plattenepithelkarzinom	30
3.3	Differentialexpression von Connexin 45 und 43 in Relation	32
3.4	Korrelation der Genexpression mit klinischen Parametern	33
4.	Diskussion	34
4.1	Real-Time PCR	34
4.2	Grenzen	36
4.3	Biologischer Ansatz und Statistik	37
4.4	Ergebnisse der Genexpressionsanalyse	38
4.4.1	Keine differentielle Expression	38
4.4.2	Differentiell überexprimierte Connexine	40
4.4.3	Differentiell unterexprimierte Connexine	42
4.4.4	Korrelation mit Tumorstadium und klinischen Parametern	43
5.	Zusammenfassung	45
6.	Literaturverzeichnis	46
7.	Anhang	57
7.1	Patientenkollektiv	57
7.2	Qualitätskontrolle der analysierten RNA	58
7.3	Primercharakteristik	62

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie des Mundhöhlenkarzinoms

Krebserkrankungen stellen laut GREENLEE et al. (2000) nach kardialen Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache beim Menschen dar. Plattenepithelkarzinome der Mundhöhle waren 1990 bei Männern mit 141.200 Neuerkrankungen die achthäufigste maligne Tumorerkrankung. Die Prävalenz des Mundhöhlenkarzinoms zeigt regional erhebliche Unterschiede: Ein höherer Anteil wurde in Süd- und Westeuropa, Südasien, Südafrika, Australien und Neuseeland ermittelt (PARKIN et al. 1999). In vielen Entwicklungsländern ist das Mundhöhlenkarzinom im Vergleich zu anderen malignen Neoplasien häufiger vertreten. So ist mutmaßlich das in Indien verbreitete Betelnusskauen für den dort mit 40 % aller Krebserkrankungen extrem hohen Anteil des Mundhöhlenkarzinoms verantwortlich (AHLUWALIA 2005, TSAI et al. 2004). Mit 3% aller bösartigen Tumore entspricht das Auftreten eines Mundhöhlenmalignoms bei Männern in Industrienationen dem weltweiten Durchschnitt (JEMAL et al. 2004). Die häufigste histologische Erscheinungsform des Mundhöhlenkarzinoms ist das Plattenepithelkarzinom (RIEDE und SCHAEFER 1999). Es weist eine Häufung in der 7. Lebensdekade auf.

1.2 Ätiologie, Risikofaktoren und Pathogenese des Mundhöhlenkarzinoms

Wie vorangehend beschrieben, gibt es regionale Unterschiede in der relativen Häufigkeit des oralen Plattenepithelkarzinoms. Dies kann auf die verschiedenen lokal vorherrschenden Umwelteinflüsse zurückgeführt werden. In Entwicklungsländern kann das Kauen der Betelnuss als wesentlicher ätiologischer Faktor betrachtet werden (AHLUWALIA 2005, TSAI et al. 2004), während in Australien sonnenexponierte Mundbereiche, wie beispielsweise die Unterlippe, häufiger erkranken. In industrialisierten Regionen ist das Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle überdurchschnittlich häufig mit chronischem Alkohol- und Tabakabusus assoziiert. Beide Noxen werden in Verbindung mit schlechter Mundhygiene als Krankheitsauslöser diskutiert (ROSENQUIST et al. 2005). Dabei ist die karzinogene

Potenz von kombiniertem Alkohol- und Tabakkonsum hervorzuheben. Es wurde bei simultanem Missbrauch beider Noxen eine Potenzierung des Erkrankungsrisikos beobachtet (BLOT et al. 1988), welches im Vergleich zu Kontrollgruppen bis zu 13-fach erhöht ist (CASTELLSAGUÉ et al. 2004).

Des Weiteren kann, insbesondere für Oropharynxkarzinome mit Lagebeziehung zum lymphatischen Gewebe der Tonsillen, eine Infektion mit den humanen Papillomaviren 16 und 18 als ätiologisch relevant betrachtet werden (FAKHRY und GILLISON 2006). Dabei inaktivieren virale Onkoproteine die Tumorsuppressorgene RB (WIEST et al. 2002) und p53 (BALZ et al. 2003). Im Gegensatz dazu bewirkt der Nikotin- und Alkoholabusus das Entstehen einer von vornherein inaktiven Mutation des Protein 53 (BRENNAN et al. 1995; vgl. Abschnitt 1.5. „Tumorbiologie“).

Unter dem Einfluss oben genannter Risikofaktoren können Mundhöhlenkarzinome direkt aus gesunder Schleimhaut entstehen. Häufig werden klinisch jedoch Mundschleimhautveränderungen vorgefunden, welche aufgrund ihres Entartungsrisikos als Krebsvorstufen zu betrachten sind. Je nach Wahrscheinlichkeit zur malignen Transformation unterteilt man sie in obligate und fakultative Präkanzerosen. Die häufigste fakultative Form ist die Leukoplakie, ein weißes, nicht abwischbares, oft erhabenes Areal der Mundschleimhaut, welches histologisch durch eine verstärkte, abnorme Verhornung im Sinne einer Hyper- und Parakeratose gekennzeichnet ist. Abstinenz exogener Noxen kann zur Regression der Leukoplakie führen, während eine fortwährende Exposition in 5 bis 15 % der Fälle zu histologisch nachweisbaren, dysplastischen Veränderungen wie Pleomorphie oder Polaritätsverlust führt (RIEDE und SCHAEFER 1999). Auch diese dysplastischen Leukoplakien können wieder zur Ausheilung kommen. Jedoch entarten, in Abhängigkeit ihres Dysplasiegrades (SIN-Grad I-III, siehe unten), 20% zu einem „Carcinoma in situ“ (LUMERMAN et al. 1995). Histologisch werden die Präkanzerosen beim Vorliegen von Dysplasien und gestörter Histoarchitektur nach WHO in 3 „squamöse intraepitheliale Neoplasiegrade“ (SIN I-III) klassifiziert (GALE et al. 2005). SIN I wird beschrieben als Hyperplasie des basalen Drittels der Mukosa, während SIN II als Hyperplasie des basalen und mittleren Drittels definiert wird.

SIN III entspricht dem histologischen Bild einer schweren Dysplasie, beziehungsweise eines „Carcinoma in situ“, und ist somit als obligate Präkanzerose zu betrachten. Das Risiko der Entartung beträgt im Falle einer SIN I und SIN II jeweils 11%. Eine SIN III weist hingegen ein Malignitätsrisiko von 90 % auf (NEID und TANNAPFEL 2009).

1.3 Tumorbiologie

Zur Entstehung und Erhaltung eines jeden vielzelligen Organismus bedarf es eines empfindlich regulierten Gleichgewichts zwischen Teilung und Niedergang seiner Zellen. Dabei unterliegt jede einzelne Zelle einem starken Selektionsdruck, sodass die Krebserkrankung als natürliches Endstadium in der Evolution vielzelliger Organismen betrachtet werden kann (STRACHAN und READ 2005).

Eine Störung dieses Gleichgewichts durch eine Abfolge somatischer Mutationen, teils unter Beteiligung vererbter Prädispositionen, kann für die einzelne Zelle einen entscheidenden Selektionsvorteil bedeuten, auch wenn dies langfristig zu einer Schädigung des Gesamtorganismus führt.

Es ist Gegenstand intensiver Forschung, den mehrstufigen Weg einer normalen somatischen Zelle zur unkontrolliert proliferierenden Tumorzelle nachzuvollziehen.

Allgemein anerkannt ist, dass die maligne transformierende Zelle:

- Von äußeren Wachstumssignalen unabhängig werden muss,
- gegenüber äußeren wachstumshemmenden Signalen unabhängig werden muss,
- der Apoptose entgehen können muss,
- in der Lage sein muss, sich unbegrenzt zu teilen,
- in der Lage sein muss, kontinuierlich Gefäßneubildung zu induzieren
- und in der Lage sein muss, in Nachbargewebe einzudringen und Metastasen zu bilden (HANAHAN und WEINBERG 2000).

Aufgrund dieser Eigenschaften sind Tumorzellen in Bezug auf ihre zelluläre Überlebensstrategie sehr erfolgreich, bewirken aber dadurch eine in der Regel letale Schädigung des Gesamtorganismus. Um solch einem Selektionsnachteil entgegenzuwirken, etablierten sich mit Tumorsuppressoren komplexe Abwehrmechanismen, welche das Auftreten eines Tumors, zumindest vor dem Erreichen des reproduktiven Alters, verhindern. Mutationen dieser Tumorsuppressorgene bzw. ihrer Antagonisten, der Onkogene, können die Transformation einer gesunden Zelle in eine Krebszelle bewirken (STRACHAN und READ 2005). Auf beide Mechanismen soll im weiteren Verlauf dieser Arbeit noch eingegangen werden.

1.3.1 Modelle zur Karzinogenese

Die Tumorgenese ist ein äußerst komplexer und zum Teil noch unverstandener Prozess. Zum besseren Verständnis bedient man sich verschiedener Modelle, welche die Wirklichkeit aber nur bedingt exakt wiedergeben können. Drei dieser Modelle sollen im Folgenden beschrieben werden:

<i>3-Stufen Modell</i>	Initiation	Promotion	Progression →
<i>CRONIER</i>	Primärtumor		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
Tab.1: Übersicht Modelle zur Karzinogenese			

Das klassische Model zur Karzinogenese ist das Dreistufenmodell der malignen Transformation. Es unterteilt sich in Initiation, Promotion und Progression.

In der Initiation erfährt die Zelle eine Mutation von Regulationsgenen des Zellzyklus (Tumorsuppressor- oder Onkogenen), welche nicht durch Reparaturmechanismen beseitigt oder durch Apoptose ausgeschaltet wird. In der Phase der Progression findet ein Wachstumsstimulus der initiierten Zelle statt, der in einem präneoplastischen Fokus resultiert. Im letzten Schritt, der Progression, kommt es durch weitere Mutationen an Tumorsuppressorgenen zur eigentlichen malignen Transformation. Der transformierte Zellklon entdifferenziert sich zunehmend, wird immortal, teilt sich fortwährend und erlangt aus noch nicht bekannten Gründen die Fähigkeit zur Metastasierung. Man ist sich heute einig, dass die Beschreibung der Tumorgenese eines noch komplexeren Mehrstufenmodells bedarf. Das Dreistufenmodell hat sich dennoch etabliert (HANAHAN und WEINBERG 2000). Es wird in den Abschnitten 1.3.2.1 „Onkogene“ und 1.3.2.2 „Tumorsuppressorgene“ weiterführend erläutert.

Ein zweites Konzept unterteilt die Karzinogenese in drei histologische Stufen, und setzt diese zu drei repräsentativen Tumorzellphänotypen in Beziehung. *Primärtumor*, *invasiver Tumor* und *metastasierender Tumor* werden mit den zellulären Phänotypen dereguliertes Wachstum, *Motilität* und *Invasivität* sowie *Interaktion mit endothelialen Strukturen* korreliert (CRONIER et al. 2009). Dabei wird das Verhalten der transformierten Zelle zu ihrer Umgebung in den Fokus gerückt. Weiterführende Erläuterungen auf Grundlage dieses Modells folgen im Abschnitt 1.3.2.3 „Migration, Invasivität und Motilität“.

Um sich unter klinischen Aspekten mit der Karzinogenese auseinander zu setzen, sind die oben genannten Konzepte einer biologischen Progression allerdings ungeeignet. Da in dieser Arbeit Teilbereiche der Karzinogenese unter klinischen Gesichtspunkten in vivo untersucht werden sollen, wird ein entsprechendes Modell benötigt. Es bietet sich an, die Entwicklung einer Tumorerkrankung auf Grundlage des TNM-Klassifikationssystem zu beschreiben. Hierbei wird die fortschreitende Tumorerkrankung ebenfalls in Stadien eingeteilt, welche auf einer klinisch verifizierbaren, anatomischen Ausbreitung des Tumors beruhen. Diese werden in den drei Hauptdimensionen, Primärtumorausdehnung, lokalinvasiver Lymphknotenbefall und Fernmetastasen angegeben. Zahlreiche untergeordnete Determinanten ergänzen die Einteilung. Weitere Erläuterungen hierzu folgen in den Abschnitten 1.3.3 „Klinische Progression“ sowie 4.4 „Ergebnisse der Genexpressionsanalyse“.

1.3.2 Biologische Progression

1.3.2.1 Onkogene

Als Onkogene werden diejenigen Gene bezeichnet, welche nach Aktivierung die Proliferationsrate einer Zelle erhöhen. Ihre inaktiven Vorstufen werden als Proto-Onkogene bezeichnet. Nach ihren physiologischen Funktionen lassen sie sich in folgende fünf Klassen einteilen:

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

Die unphysiologische Aktivierung eines Proto-Onkogens kann auf verschiedene Art und Weise erfolgen:

So bewirkt zum Beispiel die *Amplifizierung* eines Proto-Onkogens einen quantitativen Funktionsgewinn für das entsprechende Onkogen, wie es beispielsweise beim

Brustkrebs für das ErbB2-Gen beobachtet wurde. Hierbei liegen die zusätzlichen Kopien auf kleinen, separaten Chromosomen oder als Insertionen innerhalb normaler Chromosomen vor (STRACHAN und READ 2005).

Durch *Punktmutationen* von Proto-Onkogenen kann es ebenfalls zu einer Aktivierung kommen. Bei diesem qualitativen Funktionsgewinn bleibt die Expressionsrate des Onkoproteins unverändert, jedoch wird dessen Struktur dahingehend verändert, dass phänotypisch eine Wachstumssteigerung resultiert. Dies ist beispielsweise häufig bei den Proteinen der Ras-Familie der Fall, welche Signale von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren übertragen. In vielen Tumoren, so zum Beispiel bei Darm-, Lungen- und Brustkrebs, wird durch eine Punktmutation die GTPase-Funktion der RAS-Proteine beeinträchtigt, was zur Akkumulation des Signalmoleküls GTP-Ras und schließlich zu einer übermäßig starken zellulären Reaktion auf das Wachstumssignal führt. (LOWY und WILLUMSEN 1993).

Schlussendlich können Onkogene auch durch *Translokationen* aktiviert werden, wobei entweder ein neues chimäres Gen entsteht oder ein Gen in eine transkriptionell aktivere Region des Genoms transloziert wird. Ein neues Onkogen entsteht zum Beispiel bei der chronischen myeloischen Leukämie. Durch balancierte, reziproke Bruchstückvereinigung von Chromosom 9 und Chromosom 22 entsteht das sogenannte „Philadelphia-Chromosom“, welches ein neues Fusionsgen, codierend für eine Tyrosinkinase mit transformierenden Eigenschaften, besitzt (CHISSOE et al. 1995).

1.3.2.2 Tumorsuppressorgene

Tumorsuppressorgene lassen sich als Antagonisten der Onkogene verstehen. Ihre Genprodukte, die Tumorsuppressorproteine, greifen regulierend in Zellteilungs- und Apoptosevorgänge ein. Sie sind somit in der Lage, Tumorstadium zu verhindern oder zu verzögern.

Durch Analyse von familiären und spontanen Retinoblastomfällen postulierten KNUDSON et al. (1971) das Paradigma der Tumorsuppressorgene, welches 1983 durch den Nachweis vererbter heterozygoter oder erworbener homozygoter Mutationen des Rb-Gens im Retinoblastom bewiesen wurde (CAVENEY et al. 1983). Prominente Vertreter der Tumorsuppressorproteine sind beispielsweise P53, zur Einleitung der Apoptose nach irreparablen DNA-Schäden, sowie P21 und P27. Als Inhibitoren der „Cyclin-abhängigen Kinasen“ stellen letztere wichtige

Kontrollinstanzen im Zellzyklus dar. Dem oben bereits erwähnten Rb-Protein kommt dabei eine zentrale Rolle zu. Es bindet und inaktiviert den zur DNA-Replikation unabdingbaren Transkriptionsfaktor E2F und verhindert dadurch den Eintritt in die S-Phase des Zellzyklus (HARBOUR und DEAN 2000).

Der Funktionsverlust von Tumorsuppressorgenen kann auf verschiedene Art und Weise erfolgen. Vererbte oder sporadisch auftretende *Punktmutationen*, wie beim Rb-Gen im Retinoblastom, bewirken die Expression eines funktionsunfähigen Tumorsuppressorproteins (CAVENEY et al. 1983), während die *Methylierung* eines Tumorsuppressorgen-Promotors dazu führt, dass die Transkription des entsprechenden Gens reduziert oder komplett verhindert wird (BAYLIN und HERMAN 2000, JONES und BAYLIN 2007).

In der Regel ist der Funktionsverlust beider Allele eines Tumorsuppressorgens die Voraussetzung für eine maligne Transformation, wobei durch Vererbung einer heterozygoten Mutation die Wahrscheinlichkeit des Funktionsverlustes durch eine zweite Mutation erhöht ist.

Die exakten, molekularen Regulationsmechanismen von Onko- und Tumorsuppressorgenen sind momentan Gegenstand intensiver Untersuchungen. Unter anderem besitzen verschiedene Connexine neben ihrer Funktion als Kanalprotein auch die Fähigkeit, sowohl Tumorsuppressor- als auch Onkogene direkt zu beeinflussen. Dieses zeigt sich unter anderem in Connexin-induzierter Akkumulation klassischer Tumorsuppressorproteine, Wachstumsinhibition oder Zellzyklusverlängerung. Aufgrund dessen werden Connexine als „*Tumorsuppressorgene II. Klasse*“ bezeichnet (CRONIER et al. 2009). Im Einzelnen sollen diese Beobachtungen im Abschnitt 1.6.3 „Connexine und Tumorgenese“ weiterführend erläutert werden.

1.3.2.3 Migration, Invasivität und Motilität

Die folgenden Ausführungen basieren auf dem oben bereits vorgestellten Modell nach CRONIER (vgl. Abschnitt 1.3.1 „Modelle zur Karzinogenese“). Hierbei wird die Karzinogenese in drei histologische Stadien unterteilt und diese mit verschiedenen zellulären Phänotypen der Tumorzellen korreliert. Viele Tumore weisen die Tendenz auf, lokal invasiv zu wachsen und nach Einbruch in Lymph- oder Blutgefäße

Tochtergeschwulste zu bilden. Invasion und Metastasierung erfordern zusätzliche genetische Veränderungen in der Tumorzelle.

Nach dem *Primärtumorwachstum*, welches phänotypisch mit dereguliertem Zellwachstum einhergeht, folgt mit der Loslösung der Zelle aus dem Gewebeverbund die *Invasionsphase*. In diesem Zusammenhang kommt es zur Produktion von Proteinen, welche die Proteolyse physikalischer Barrieren wie der Basallamina und extrazellulärer Matrix erlauben, die Adhäsion in lokaler extrazellulärer Umgebung ermöglichen sowie die Tumorzellmotilität fördern (STRACHAN und READ 2005).

Da die abgrenzende Basalmembran keine den Zelltransit erlaubenden Poren besitzt (PARISH et al. 1992), muss ihre Proteolyse aktiv herbeigeführt werden. Dazu bindet die Tumorzelle über Oberflächenrezeptoren der Integrin- und Nichtintegrinfamilien an Laminin, Typ-IV-Kollagen, Fibronectin und andere Glykoproteine der Basallamina (LÖFFLER et al. 2006), woraufhin an diesen Stellen lokalisierte Zonen der Auflösung entstehen. Die Ursache dieser erhöhten proteolytischen Aktivität erklärt sich durch eine Störung des fein regulierten Gleichgewichts zwischen extrazellulären Proteinase und ihren Inhibitoren. Die Erlangung von Motilität ist eine weitere Voraussetzung für die *Invasionsphase*, welche dazu führt, dass Tumorzellen gerichtet die Basalmembran überwinden und sich proteolytisch durch die extrazelluläre Matrix bewegen können. Phänotypisch zeigen die Zellen pseudopodienartige Ausstülpungen in Bewegungsrichtung, welche durch Tumorzellzytokine autokrin reguliert werden, aber auch chemotaktischen Einflüssen folgen können (LÖFFLER et al. 2006).

Um entfernte Gewebe zu *metastasieren*, müssen maligne Zellen Anschluss an die Gefäßzirkulation erlangen. Dazu müssen diese aus ihrem gefäßfreien, epithelialen Kompartiment in das vaskularisierte Stroma infiltrieren, sich an endotheliale Strukturen binden und sie im Rahmen der Intravasion schlussendlich überwinden (CRONIER et al. 2009).

Die sich in dieser Entwicklung wandelnden Phänotypen der Tumorzellen bedingen zwangsläufig auch Veränderungen ihrer gap-junction-vermittelten Zellkontakte. Wie diese sich im Einzelnen darstellen, wird im Abschnitt 1.4.3 „Connexine und Tumorgenese“ erläutert.

1.3.3 Klinische Progression

1.3.3.1 TNM-Klassifikation

Als drittes Konzept zur Karzinogenese (vgl. 1.3.1 „Modelle zur Karzinogenese“) soll nun die Tumorentwicklung unter klinischen Gesichtspunkten anhand der TNM-Klassifikation näher erläutert werden.

Haben die motilen Tumorzellen den Kontakt zum Zellverband verloren, breiten sie sich zunächst horizontal im epithelialen Gewebeverbund aus. Solange die Karzinomzellen die Basalmembran des Epithels respektieren, ist von einem „Carcinoma in situ“ die Rede, nach Proteolyse dieser biologischen Barriere vom invasiven Karzinom.

In dessen Wachstumsverlauf kann es zur Metastasierung sowohl in die regionalen Lymphknoten des Halses als auch in entfernte Organe kommen. Bei Letzterem werden Lunge, mediastinale und abdominale Lymphknoten, Leber und Skelett bevorzugt befallen (KOTWALL et al. 1987). Zunächst zur statistischen Erfassung verschiedener Patientenkollektive entwickelte die UICC und AJCC (*Union internationale contre le cancer, American Joint committee on cancer*) seit 1950 ein einheitliches Klassifikationssystem für alle malignen Tumore (WITTEKIND et al. 2002). Die Progression der Erkrankung kann unter Bezugnahme auf die anatomische Tumorausbreitung durch die drei Hauptdeterminanten Primärtumor (*T*), regionale Lymphknotenmetastasen (*N*) und Fernmetastasen (*M*) klinisch definiert werden. Das System lässt aber auch Angaben zur histologischen Differenzierung (*Grading, G*), zur Lymphgefäß- und Veneninvasion des Primärtumors (*L, V*), zur Sicherheit des Befundes (*Certainty, C*) und zur Beurteilung eines Residualtumors (*R*) zu. Für die drei Hauptdimensionen *T*, *N* und *M* wurden für jeden einzelnen malignen Tumor exakte, die jeweilige Anatomie respektierende Grenzen definiert.

Im Folgenden werden diese für das Mundhöhlen- und Lippenkarzinom wiedergegeben (WITTEKIND et al. 2002):

T Bedeutung

X Keine Beurteilung möglich

0 Kein Primärtumor nachweisbar

is Carcinoma in situ

1 Tumordurchmesser maximal 2 cm

2 Tumordurchmesser 2 bis 4 cm

3 Tumordurchmesser mindestens 4 cm

4a *Lippenkarzinom*: Infiltration durch kortikalen Knochen, in N. alveolaris inferior,

4b Infiltration in Spatium masticatoricum, Proc. pterygoideus oder Schädelbasis

N Bedeutung

X Keine Beurteilung möglich

0 Keine regionalen Lymphknotenmetastasen

1 Solitäre Metastase in ipsilaterale Lymphknoten, maximal 3 cm Durchmesser

2a Solitäre Metastase in ipsilaterale Lymphknoten, 3 bis 6 cm Durchmesser

2b Multiple Metastasen in ipsilaterale Lymphknoten, maximal 6 cm Durchmesser

2c Metastase(n) in kontralateralem/n Lymphknoten, maximal 6 cm Durchmesser

3 Zervikale Lymphknotenmetastase mit Durchmesser über 6 cm

M Bedeutung

X Keine Beurteilung möglich

0 Keine Fernmetastasen nachweisbar

1 Fernmetastasen nachweisbar

Da sich alleine aus den drei Hauptdimensionen T, N und M im Falle des oralen Plattenepithelkarzinoms 168 mögliche Kombinationen ergeben, wurden von UICC und AJCC 5 Hauptstadien definiert, die Patienten mit verschiedenen TNM-Klassifikationen, aber vergleichbar weit fortgeschrittener Tumorerkrankung zusammenfassen:

<i>Stadium</i>	<i>T</i>	<i>N</i>	<i>M</i>
0	is	0	0
I	1	0	0
II	2	0	0
III	1-2	1	0
IVa	1-3	2	0
IVb	0-4b	3	0
IVc	0-4b	0-3	1

1.3.3.2 Prognose

Die Prognose des erkrankten Individuums wird in hohem Maße von der Anzahl der Lymphknotenmetastasen und deren histologisch nachgewiesenen Kapseldurchbrüchen bestimmt (SNOW et al. 1982, WOOLGAR et al. 1995). Weitere Faktoren, die die Überlebenswahrscheinlichkeit beeinflussen, sind die Größe des Primärtumors, die Resezierbarkeit des Tumors, das Vorliegen von Fernmetastasen (WOOLGAR et al. 1995), eine perineurale Invasion des Tumors sowie das UICC-/AJCC-Stadium der Erkrankung (PARSONS et al. 1997).

Beeinflussung der 1-, 2- und 5-Jahresüberlebensrate (1-, 2-, 5-JÜR) durch Lymphknotenmetastasen (nach WOOLGAR et al. 1995):

	<u>1-JÜR</u>	<u>2-JÜR</u>	<u>5-JÜR</u>
Insgesamt (n=123)	84%	69%	65%
Keine Lymphknotenmetastasen	95%	86%	86%
Mit Lymphknotenmetastasen	71%	52%	44%

1.4 Connexine und Gap-Junctional-Intercellular-Communication

Die Kommunikation zwischen Zellen und Zellverbänden ist Grundvoraussetzung für die Entwicklung und das Fortbestehen eines jeden vielzelligen Organismus. Dazu gibt es unterschiedliche Wege der Signalübertragung.

Weit voneinander entfernte Zellen und Gewebe kommunizieren über endokrine Botenstoffe oder neuronale Signale. Auf lokaler Ebene dagegen treten Zellen oft

direkt über Zell-Zell-Verbindungen mit ihrer Nachbarschaft in Kontakt. Diese Art des Informationsaustausches ist essentiell für die zelluläre Proliferation, Differenzierung und Koordination im Gewebeverbund.

Ein Beispiel direkter Zell-Zell-Kommunikation sind Gap-Junction-Kanäle. Diese besonderen Zell-Zell-Verbindungen kommen in nahezu allen menschlichen Geweben vor.

1.4.1 Gap-Junctional-Intercellular-Communication (GJIC)

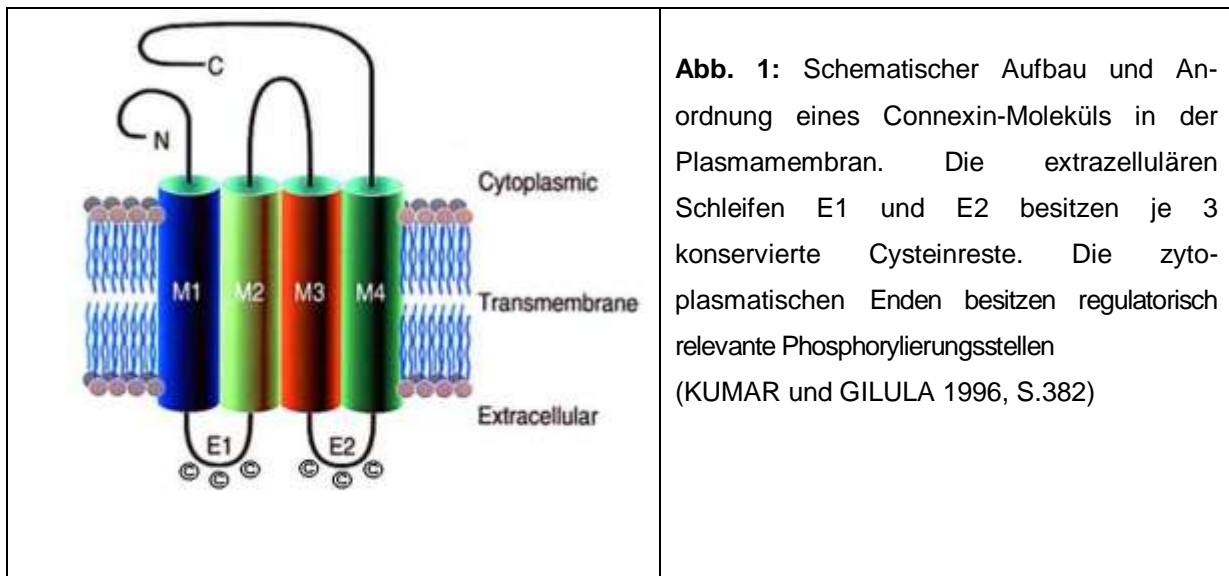
Die Grundlage der *Gap-Junctional-Intercellular-Communication (GJIC)* bilden die Gap-Junctions. Diese Kanäle verbinden die zytoplasmatischen Kompartimente zweier benachbarter Zellen direkt miteinander. Durch passive Diffusion ermöglichen sie ATP-unabhängig und relativ unspezifisch den Austausch niedermolekularer, hydrophiler Moleküle bis zu einem Molekulargewicht von 1,2 kDa. So können beispielsweise Ionen (Na^+ , Ca^{2+} , K^+ , Cl^-), Metabolite aus dem Aminosäure-, Fett-Kohlenhydrat- oder Nukleotidstoffwechsel sowie Signalmoleküle (cAMP, IP₃) die interzellulären Kanäle leicht passieren. Für Makromoleküle wie DNA oder Proteine ist dies jedoch nicht möglich (LOEWENSTEIN 1981).

Diese Eigenschaften bedingen die Beteiligung der Gap-Junctions an vielfältigen zellulären und interzellulären Aktionen, unter anderem der Weiterleitung hormoneller Signale via *second Messengern* (SAEZ et al. 1989, BEDNER et al. 2006), der Übertragung elektrischer Signale in Herzmuskelzellen und glatter Muskulatur sowie der Aufrechterhaltung der Gewebshomöostase durch Diffusion von Metaboliten und Wasser (LOEWENSTEIN 1981). Aufgrund dieser elektrischen und metabolischen Kopplung ermöglichen Gap-Junction-Kanäle die Synchronisation zellulärer Funktionen im Gewebeverbund (CZYZ 2008). Beispielsweise sind die Connexine 37, 40, 43 und 45 im kardio-vaskulären System entscheidend an der Regulation und Synchronisation des Gefäßwandtonus beteiligt (SCHMIDT et al. 2008). Gap-Junctions setzen sich aus den 21 bekannten humanen Connexinsubtypen zusammen, kommen gewebespezifisch in den meisten adulten Zellen vor und treten in der Regel als sogenannte *Gap-Junction-Plaques* in der Zellmembran lokal gehäuft auf.

1.4.2 Connexine

Grundbausteine der interzellulären Gap-Junction-Kanäle sind die Connexine, eine heterogene Familie membrandurchspannender Proteine. Beim Menschen sind 21 verschiedene Subtypen bekannt, deren Größe zwischen 23 kDa und 62 kDa variiert. Das Molekulargewicht liegt auch der Nomenklatur zugrunde (zum Beispiel: Connexin 26, Connexin 30.3, usw.).

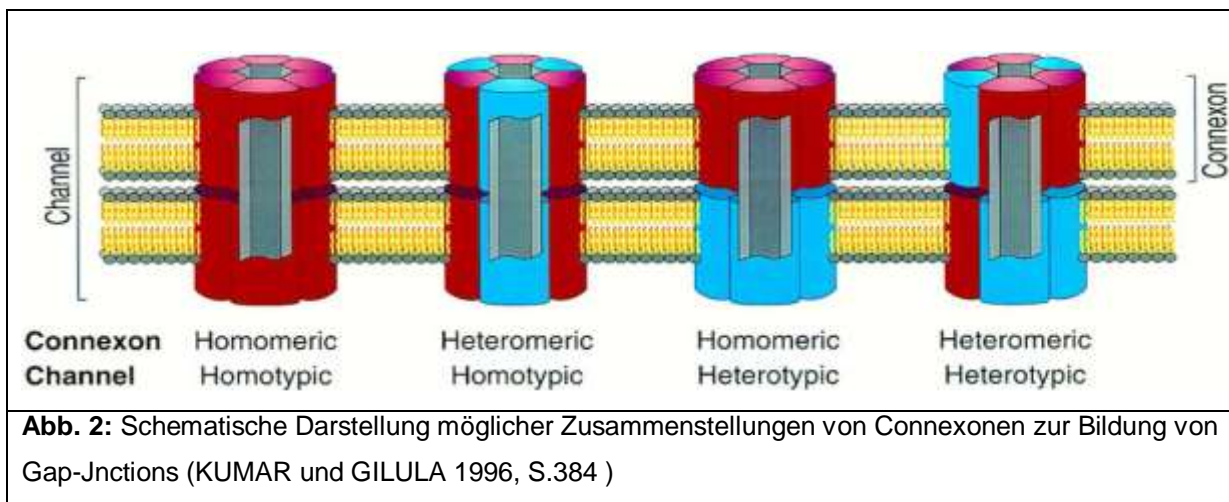
Der schematische Aufbau eines Connexins ist in Abbildung 1 dargestellt.



Das C- und das N-terminale Ende sowie eine zytoplasmische Schleife, die verschiedene regulatorisch relevante Phosphorylierungsstellen aufweist, befinden sich intrazellulär. Diese sind für jedes der 21 humanen Connexine spezifisch und in der Lage mit zytoplasmatischen Molekülen zu interagieren. Auf diese Weise erklärt sich auch die Gewebespezifität der Connexine. Nur in einer Zelle mit der physiologischen, molekularen Umgebung im Zytosol kann ein Connexin alle Funktionen im Sinne einer Connexin-Protein-Interaktion wahrnehmen (CRONIER et al. 2009). Beispielsweise berichteten FU et al. (2004) über eine Inhibition des Zellwachstums in Gliomzellen infolge einer Interaktion des Connexin 43 mit dem Protein CCN3.

Jedes Connexin-Protein besteht aus 4 parallel angeordneten Transmembrandomänen (M1-M4). M3 weist einen hohen Anteil hydrophiler Aminosäuren auf. Diese kleiden das Kanallumen nach innen aus und ermöglichen so die Passage hydrophiler Metabolite durch die hydrophobe Zellmembran (YEAGER und GILULA 1992). Zwei extrazellulär gelegene Schleifen (E1 und E2)

vervollständigen das Protein. Je sechs Connexine lagern sich in der Membran zu einem Connexon, einem eine Pore umschließenden Hemikanal, zusammen. Jeweils zwei Connexone zweier benachbarter Membranen kommunizieren über ihre extrazellulären Schleifen miteinander, und bilden einen *Gap-Junction*-Kanal (BERG et al. 2007). Besteht dieser aus zwei identischen Hemikanälen, bezeichnet man ihn als homotypisch. Unterscheiden sich die Connexone, ist von heterotypen Kanälen die Rede. Analog dazu wird ein Connexon aus sechs identischen Connexinen bestehend als homomer, andernfalls als heteromer definiert.



Die Zusammensetzung eines *Gap-Junction*-Kanals hat entscheidenden Einfluss auf dessen Permeabilität und Regulation, wobei nicht jede Kombination möglich ist (ELFGANG et al. 1995, WHITE et al. 1995). So ist beispielsweise das Connexin 43 nicht in der Lage, mit dem Subtyp 26 (BEYER et al. 2001), wohl aber mit Connexin 45 heteromere Kanäle zu bilden (MARTINEZ et al. 2002), welche sich in Porengröße und Permeabilität von den homomeren Gap-Junctions dieser Connexine unterscheiden (GRIKSCHAIT et al. 2008, KOVAL et al. 1995).

1.4.3 Connexine und Tumorgenese

Humane Malignome sind mit einer dysfunktionellen *Gap-Junctional-Intercellular-Communication* (GJIC) assoziiert. Bereits länger ist bekannt, dass der Verlust der Wachstumskontrolle einer entarteten Zelle mit einer defizienten GJIC einhergeht. (LOEWENSTEIN 1979). Aufgrund dieser Erkenntnis wurde später die Hypothese aufgestellt, *Gap-Junction*-Zellverbindungen gingen während der Karzinogenese verloren, und entkoppeln auf diesem Weg die Tumorzelle von ihrer externen Wachstumskontrolle. Dabei bleiben jedoch zwei entscheidende Aspekte unbeachtet:

Der erste unbeachtete Aspekt ist, dass zwischen Connexinen als Kanalprotein der *Gap Junctions* einerseits und Connexinen als eigenständige, intrazellulär agierende Reaktionspartner andererseits unterschieden werden muss. Bekannt ist, dass die Restauration der Connexinexpression in connexin-defizienten Tumorzelllinien in vitro deren Wachstum verringert und sich der tumoröse Phänotyp der Zellen zurückbildet (CHEN et al. 1995, EGHBALI et al. 1990, EGHBALI et al. 1991). Dies ist mit einer verlängerten G1 Phase, einer verminderten Expression der Onkogene Cyclin-A, -D1 und -D2 oder einer Akkumulation klassischer Tumorsuppressoren wie P27 und dem Rb-Protein assoziiert (KOFFLER et al. 2000, TABERNERO et al. 2006, ZHANG YW et al. 2001, vgl. Abschnitt 1.5.2 „Biologische Progression“). Bei den meisten der oben zitierten Studien wurden Connexine über Transfektion in connexin-defiziente Tumorzellen eingebracht, infolgedessen kam es zu einer Wachstumsinhibition. In diesem Zuge konnte auch häufig die Etablierung einer intakten GJIC beobachtet werden, was alleinig als Bestätigung der Hypothese diskutiert wurde, die GJIC gehe im Rahmen der Karzinogenese verloren und entziehe so die maligne Zelle der extrazellulären Wachstumskontrolle. Dass diese Beteiligung der Connexine an zellulären Wachstumsregulationen nicht allein von der GJIC ausgeht, zeigen mehrere jüngere Untersuchungen. Es konnten ähnliche wachstumshemmende Effekte und Regression maligner Phänotypen beobachtet werden, ohne dass es zur Ausbildung funktionsfähiger Zell-Zell-Kanäle kam (IONTA et al. 2009, KALRA et al. 2006, McLACHLAN et al. 2006, OLBINA und ECKHART 2003). Auch KRUTOVSKIKH et al. (2000) konnten in vivo zeigen, dass es nach Connexin-43-Transfektion zur Wachstumsreduktion kam, wobei sich die Connexine atypischerweise im Zytoplasma befanden. Diese Beobachtungen implizieren, dass Connexine, speziell der Subtyp 43, proliferationsinhibierende Effekte ausüben können, unabhängig von ihrer Fähigkeit *Gap-Junction*-Kanäle zu formen (CRONIER et al. 2009). Wie in Abschnitt 1.6.2 „Connexine“ beschrieben, besitzen die Connexine ein zytoplasmatisches, C-terminales Ende (WILLECKE et al. 2002), welches zahlreiche, subtyp-spezifische, regulatorisch relevante Phosphorylierungsstellen aufweist, und darüber hinaus Interaktion mit intrazellulären Proteinen erlaubt (HERVE et al. 2004). Es wurde von direkter Interaktion des zytoplasmatischen Connexin-43-C-Terminus mit dem Tumorsuppressor Caveolin-1 und daraus resultierender Wachstumsinhibition berichtet (LANGLOIS et al. 2010). Ähnliche

Beobachtungen wurden auch an anderen Connexin-Protein Paarungen gemacht (FU et al. 2004). Interessanterweise scheinen für diese Effekte in Tumorzellen in erster Linie die C-Termini der Membranproteine verantwortlich zu sein: Die Transfektion lediglich des Carboxyl-Endes eines Connexins in Tumorzellen bewirkte dieselbe Negativ-Regulation des Zellwachstums, wie sie zuvor durch das gesamte Connexinmolekül hervorgerufen werden konnte (DANG et al. 2003, MOORBY und PATEL 2001, ZHANG YW et al. 2003a). Es liegt nahe, dass die physiologischen Funktionen der Connexine weit über den transmembranösen Stofftransport hinausgehen. Allerdings sind diese über den Stofftransport hinausgehenden Funktionen vom Connexinsubtyp abhängig (MESNIL et al. 1995). Beispielsweise bewirkte bei Leberkarzinomzelllinien eine Transfektion mit Connexin 26 die Rückbildung des malignen Phänotyps (YANO et al. 2001), was in Lungenkarzinomzellen jedoch nur nach Connexin-43-Transfektion zu beobachten war (XU HT et al. 2008). Es ist davon auszugehen, dass solche tumorsuppressiven Effekte nur mit jenen Connexinsubtypen zu erwarten sind, die auch ursprünglich unter physiologischen Bedingungen vom untersuchten Gewebe exprimiert wurden (CRONIER et al. 2009). Dies erklärt auch das gewebespezifische Auftreten der verschiedenen Kanalproteine in unterschiedlichen, adulten Geweben. Ein Connexin, welches physiologischerweise in einem bestimmten Gewebe exprimiert wird, findet auch nur dort seine „gewohnte molekulare Umgebung“ vor, um all seine Aufgaben wahrnehmen zu können (BOND et al. 1994, CRONIER et al. 2009, MESNIL et al. 1995). Die genauen molekularen Abläufe der überwiegenden Mehrheit solcher Connexin-Protein-Interaktionen sind momentan gar nicht oder nur sehr spärlich verstanden und bedürfen noch weitergehender Untersuchungen.

Unkontrolliertes Tumorwachstum geht mit dem Versagen von Kontrollmechanismen an mehreren Punkten im Zellzyklus einher (vgl. Abschnitte 1.3.1. „Modelle zur Karzinogenese“ und 1.3.2.1 bzw. 1.3.2.2. Onko- und Tumorsuppressorgene). Ob letztendlich die GJIC, die Connexine direkt oder beide Mechanismen gemeinsam für diese proliferationshemmenden Effekte ursächlich sind, wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Bei Etablierung einer suffizienten GJIC können auch die daran beteiligten Connexine über ihre C-Termini Einfluss nehmen. Andererseits existieren auch Studien, die belegen, dass über Gap-Junctions Signalmoleküle, wie beispielsweise Second Messenger, ausgetauscht werden, welche auf diesem Weg in die Zellzyklusregulation eingreifen (KAMEI et al. 2003). Möglicherweise liegen in

beiden Fällen Regulationsmechanismen unterschiedlicher Art vor. Jüngere Untersuchungen tendieren eher zur Hypothese der direkten Protein-Connexin-Interaktion (BATES et al. 2007).

Der zweite, häufig unbeachtete Aspekt bei der Rolle der Connexine in der Tumorgenese ist die Komplexität der Krebserkrankung. In ihrer Entwicklung durchläuft eine maligne Tumorzelle verschiedene Stadien. (vgl. Abschnitte 1.3.1. "Modelle zur Karzinogenese" und 1.3.2.3. „Migration, Invasivität und Motilität“). Von diesen phänotypischen Veränderungen der Tumorzellen, sind auch deren interzelluläre Kontaktstrukturen, einschließlich Gap-Junctions, betroffen (CRONIER et al. 2009). Die oben genannten jüngeren Untersuchungen zur Assoziation von GJIC-bedingten Stofftransporten, Connexin-Protein-Interaktionen und Wachstumsregulationen fanden ausschließlich an in-vitro-Modellen statt, welche lediglich Aussagen über die tumorbiologischen Aspekte während der Primärwachstumsphase nach CRONIER (2009) zulassen. Dort konnte gezeigt werden, dass die maligne Transformation und das sich anschließende Primärtumorwachstum mit einer defizienten GJIC einhergeht (LEITHE et al. 2006, MESNIL et al. 2005). Auch die reduzierte Expression einzelner Connexine ist an mehreren Tumorzelllinien sowie Primärtumoren belegt (JAMIESON et al. 1998, NAUS et al. 1991, SAUNDERS et al. 2001, YAMASAKI et al. 1999).

Das spätere Invasionsstadium ist durch einzelne, den Gewebeverbund verlassende, motile Tumorzellen gekennzeichnet. Die amöboide Migrationsbewegung beruht im Wesentlichen auf der dynamischen Umgestaltung fibrillärer Proteine (Aktin), den Einbau von Membranvesikeln in Bewegungsrichtung, sowie der Adhäsion an extrazelluläre Matrixkomponenten (EGGER 2005). Zusammenhänge zwischen Zellmigration und Connexinexpression wurden erstmals während der Embryogenese im Tiermodell beobachtet (REAUME et al. 1995). Heute ist an mehreren, embryogenen Modellen belegt, dass Connexine eine Beteiligung an physiologischen Zellmigrationsvorgängen besitzen. So wurde beobachtet, dass die Zellwanderung aus der Neuralleiste von Connexin 43 vermittelter GJIC abhängt (HUANG GY et al. 1998). Weitere Untersuchungen zeigen, dass Connexin 43 befähigt ist, mit *Vinculin* und weiteren aktin-bindenden Proteinen zu interagieren, und dadurch den dynamischen Umbau des Zytoskelettes zu beeinflussen (XU X et al. 2006). Im Verlauf der Hirnentwicklung vermitteln die Connexine 26 und 43 Neuronenmigration

entlang radialer Gliazellfasern. Dabei treten diese nicht als typische Zell-Zell-Kanäle auf, sondern bilden dynamische, adhäsive Kontakte welche mit dem internen Zytoskelett interagieren (ELIAS et al. 2007). Unter kanzerogenen Bedingungen zeigten sich ähnliche Beobachtungen. Es bestätigte sich bei Untersuchungen an HeLa- und Glioblastomzelllinien, dass diese nach Connexin-43-Transfektion ein erhöhtes Invasionspotential besaßen (BATES et al. 2007, GRAEBER und HULSER 1998), sowie dass Zellmigrationsvorgänge von der Anwesenheit des Connexins 43 abhängig waren (ZHANG W et al. 2003b). Interessanterweise kam es in diesem Zusammenhang auch zu einer verstärkten Expression verschiedener Matrix-Metallo-Proteinasen (vgl. 1.3.2.3 „Migration, Invasivität und Motilität“). Die extrazellulären Domänen des Connexin 43 bewirkten nach Transfektion ein erhöhtes Adhäsionsvermögen in Gliomzelllinien. (LIN et al. 2002). Allerdings existieren auch widersprüchliche Aussagen, welche nach Connexin 43 knock-out an Mammakarzinomzelllinien vermehrtes Wachstum und erhöhte Invasivität beschreiben (KALRA et al. 2006).

Im Metastasierungsstadium werden die frei beweglichen Tumorzellen schließlich wieder ortsständig, um mit der endothelialen Barriere zu interagieren und diese im Rahmen der Intravasation schlussendlich zu überwinden (ZHANG W et al. 2003a). Interaktionen mit vaskulären Endothelzellen, in Form einer stabil etablierten GJIC konnten bei Glioblastom- (XIE et al. 1997), Melanom- (ITO et al. 2000), und Mammakarzinomzellen (POLLMANN et al. 2005) nachgewiesen werden. Auch dass die Fähigkeit der Tumorzellen zur Diapedese durch das Endothel mit dem Vorhandensein funktioneller Gap-Junction-Plaques korreliert, wurde in vitro gezeigt (POLLMANN et al. 2005). Darüber hinaus gibt es unter anderem in-vivo-Untersuchungen am Tiermodell, die belegen, dass die in frühen Stadien des Primärtumorwachstums unterdrückten Connexine 43 und 26 in Lymphknotenmetastasen dieser Tumore wieder präsent sind (KAMIBAYASHI et al. 1995, KANCZUGA-KODA et al. 2006). Es scheint allerdings, analog zur Wachstumsregulation, eine Connexin-Spezifität zu bestehen. Da von Endothelzellen lediglich die Connexine 37, 40 sowie 43 (CRONIER et al. 2009) exprimiert werden, ist theoretisch davon auszugehen, dass Kommunikation nur homotypisch über diese oder heterotypisch über kompatible Connexine erfolgen kann (vgl. Abschnitt 1.4.1 “GJIC“). Dabei geht nach in-vitro-Untersuchungen von einer heterologen GJIC ein größeres Metastasierungspotential aus (KAPOOR et al. 2004).

Stadium I	Stadium II	Stadium III	
Primärtumor (In situ)	Invasiver Tumor	Metastatische Zellen → Metastase	Histolog. Stadien
dereguliertes Zellwachstum	Zell-Loslösung, Motilität, Gewebeeinfiltration	Intravasion → Extravasion	Zellulärer Phänotyp
GJIC	GJIC	GJIC	Zell-Zell-Kontakte

Tab 2: Modifiziert nach CRONIER et al. 2009, S. 325)

Zusammenfassend können Connexine, sowohl als einzelnes zytoplasmatisches Protein als auch in ihrer Funktion als membranständiger Gap-Junction-Kanal, die Entwicklung von Tumoren in Abhängigkeit vom Stadium der Tumorerkrankung beeinflussen. Scheinen sie im initialen Stadium der Tumorerkrankung als Tumorsuppressoren zu fungieren, so haben sie in späteren Stadien eher onkogenen Charakter (CRONIER et al. 2009).

1.5 Fragestellung

Die Beteiligung der Connexine an der Karzinogenese ist seit mehreren Jahrzehnten Gegenstand intensiver Untersuchungen. Dabei existieren in der Literatur nur sehr wenige Informationen über die Connexinverteilung in humaner oraler Schleimhaut. Deshalb war es unter anderem Gegenstand der Vorüberlegungen zu dieser Arbeit, eine geeignete Auswahl an zu untersuchenden Connexinen zu treffen. Am Tiermodell konnte gezeigt werden, dass in der Epidermis der Maus die Connexine 26, 30.3, 31, 31.1, 43 und 45 exprimiert werden (BUTTERWECK et al. 1994, HENNEMANN et al. 1992, BUDUNOVA et al. 1996).

Weiterhin wurden in humaner Schleimhaut des Larynx die Subtypen 26, 30 und 43 nachgewiesen (SCHNEIDER et al. 2002). Lediglich VILLARET et al. (2000) sowie AL MOUSTAFA et al. (2002) berichteten im Rahmen von Microarray-Screening-Untersuchungen an heterogenen humanen Tumoren im Kopf-Halsbereich von Überexpression des Connexin 26 beziehungsweise Unterexpression des Connexin 31. Im Zusammenhang mit der Tumorgenese existieren für Connexin 26 und 43 zahlreiche Studien, welche antiproliferative Effekte sowie die Regression maligner zellulärer Phänotypen belegen. Dabei handelt es sich in der überwiegenden Mehrzahl um in-vitro-Untersuchungen (HIRSCHI et al. 1996, YANO et al. 2001, MOMIYAMA et al. 2003), zum Teil auch um Erkenntnisse aus in-vivo-Versuchen am Tiermodell (QIN et al. 2002). Für das am besten untersuchte Connexin 43 sind bereits erste molekularbiologische Zusammenhänge zur Zellzyklusbeeinflussung in vitro bekannt (ZHANG YW et al. 2001, ZHANG YW et al. 2003b).

Aufgrund des Mangels systematischer in-vivo-Studien zur Bedeutung der Connexine für die Karzinogenese des oralen Plattenepithelkarzinoms sollen folgende Fragestellungen in dieser Arbeit bearbeitet werden:

1. Welche Connexinsubtypen werden in klinisch gesunder humaner oraler Mukosa exprimiert?
2. Welche Connexinsubtypen werden beim intraindividuellen Vergleich im oralen Plattenepithelkarzinom differentiell exprimiert?
3. Ist eine Korrelation von differentieller Expression und klinischen Parametern, insbesondere dem klinischen Tumorstadium, nachweisbar ?

2 Material und Methoden

2.1 Patienten

Die Untersuchung der humanen Proben wurde durch die Ethik-Kommission der Georg-August-Universität Göttingen geprüft und befürwortet (Votum vom 28.02.07 Antragsnummer: 27/4/06). An der vorliegenden Studie nahmen n=15 Patienten teil, welche im Zeitraum vom Juni 2006 bis zum August 2007 an der Universitätsmedizin Göttingen wegen eines Mundhöhlenkarzinoms behandelt wurden. Einschlusskriterium war ein histologisch bestätigtes Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle, welches innerhalb des Monats vor der Tumorresektion erstdiagnostiziert worden war. Ausschlusskriterien waren neoadjuvante Radio- oder Chemotherapie, oder der Nachweis eines Zweitkarzinoms. Das Patientenkollektiv bestand aus 10 männlichen und 5 weiblichen Patienten mit einem Durchschnittsalter von 58,5 Jahren. Detaillierte klinische Daten zum Patientenkollektiv befinden sich im Anhang A.

Von jedem Patienten wurde nach Aufklärung und Einwilligung in die Teilnahme an dieser Studie während der Tumorresektion je eine Tumorprobe aus dem makroskopisch sicher als Karzinomgewebe imponierenden Areal sowie eine Schleimhautprobe aus der gegenüberliegenden Wange entnommen. Die Gewebeproben wurden über Nacht bei 4° Celsius in RNA-later® Lösung inkubiert, anschließend eingefroren und bis zur Isolierung der RNA bei -80°C gelagert.

2.2 Materialien

2.2.1 Geräte

ND-1000 Spektrofotometer, NanoDrop Technologies, Wilmington (USA)

2100 Bioanalytiker, Agilent Technologies Sales & Services GmbH & Co.KG.,
Waldbrunn

Homogenisator Ultra-Turrax T8, IKA-Werke, Staufen

MylQ real-time PCR Detection System, Bio-Rad Laboratories GmbH, München

Tischzentrifuge 5810 R, Eppendorf, Wesseling-Berzdorf

Mikrozentrifugen 5815 R und 5815 D, Eppendorf, Wesseling-Berzdorf

Vortex-Genie 2, Scientific Industries, New York (USA)
Elektrophoresekammer MIDI 1, Carl Roth, Karlsruhe
Spannungserzeuger Power Pac Basic Supply, Bio-Rad Laboratories GmbH,
München

2.2.2 Enzyme und Kits

1 kb DNA Ladder (15615-024), Invitrogen GmbH, Karlsruhe
DNase I, RNase-frei 50-375 U/μl (18047-019), Invitrogen GmbH, Karlsruhe
iScript cDNA Synthesis Kit (170-8890), Bio-Rad Laboratories, Hercules (USA)
iQ SYBR Green Supermix (170-8882), Bio-Rad Laboratories, Hercules (USA)
RNase Out (RNase Inhibitor), Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Roti®-Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (A156.1), Carl Roth GmbH & Co. KG,
Karlsruhe
Qiagen RNeasy Mini Kit (74104), Qiagen GmbH, Hilden
QIAquick PCR purification Kit (28104), Qiagen GmbH, Hilden

2.2.3 Lösungen

DEPC-Wasser

1 ml	Diethylpyrocarbonat
ad 1000 ml	Aqua bidest

10 x TBE-Puffer

108 g (0,9 mol)	Tris Base
55 g (0,9 mol)	Borsäure
7,44 g (0,02 mol)	EDTA-Na ₂ -Salz
ad 1000 ml	Aqua bidest

0,5 x TBE-Puffer

50 ml	10 x TBE-Puffer
950 ml	Aqua bidest

2.2.4 Software

Primer3: http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi
NCBI BLAST: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>
MFold (ZUKER 2003): <http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/>

2.3 RNA- Isolierung

Die entnommenen Gewebeproben wurden im RLT-Puffer des Qiagen RNeasy Kits homogenisiert, bis durch visuelle Kontrolle keine Gewebereste im Probengefäß festgestellt werden konnten. Anschließend wurde das Homogenisat 3 Minuten bei 12.000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Probengefäß pipettiert und im Verhältnis 1:1 mit 70% Ethanol vermischt. Das Gemisch wurde umgehend in eine RNeasy-Säule überführt und für 15 s bei 12.000 U/min zentrifugiert. Hierbei erfolgte die Bindung der RNA an die Silica-Membran der RNeasy-Säule. Es erfolgten drei konsekutive Waschschrte mit Zugabe von zunächst 700µl RW1-Puffer und anschließend jeweils 500µl RPE-Puffer und Zentrifugationsdauern von 15s, 15s und 120s. Der durch die Silica-Membran zentrifugierte Waschpuffer wurde jeweils verworfen. Zuletzt wurde die in der Säule gebundene RNA durch zwei Elutionsschritte mit jeweils 40µl RNase freiem Wasser in ein Volumen von 80µl aufgenommen. Nach RNA-Isolation erfolgte mittels DNase I der Abbau genomischer DNA.

5 µl 1 M Tris/HCl pH 7,5

1 µl 1 M MgCl₂

1 µl DNase I (10 U/µl)

0,5 µl RNase Inhibitor (40 U/µl)

12,5 µl RNase freies Wasser

80 µl RNA-Eluat

100 µl Gesamtvolumen

Dieser Ansatz wurde für 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde ein Gemisch aus Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25/24/1 v/v/v) im Verhältnis 1:1 (v/v) hinzugefügt und die Probe für 2 Minuten bei Raumtemperatur mit 13.000 U/min zentrifugiert. Die dabei entstandene RNA enthaltende obere wässrige Phase wurde in ein neues Eppendorf-Cup überführt und darin im Verhältnis 1:1 (v/v) mit Isopropanol und im Verhältnis 1:10 (v/v) mit 3 M Natriumazetat vermischt. Bei der anschließenden auf 4°C gekühlten Zentrifugation über 15 Minuten bei 13.000 U/min setzte sich ein RNA enthaltendes Pellet am Boden des Probengefäßes ab. Der darüber stehende Überstand wurde verworfen und das Pellet zweimal mit 1 ml 70%

Ethanol und folgender fünfminütiger Zentrifugation gewaschen. Nach der darauf folgenden Trocknung des RNA-Pellets wurde es über 10 Minuten bei 42°C in 40 µl RNase freiem Wasser resuspendiert.

2.4 Quantifizierung und Qualitätskontrolle

Nach der Isolierung der RNA sowie dem enzymatischen Verdau der DNA wurden aus allen RNA-Proben jeweils 1,5 µl zur Quantifizierung am NanoDrop-Messstand eingesetzt. Anschließend erfolgte die Qualitätskontrolle aller RNA-Proben durch Einsatz der vom Hersteller empfohlenen Menge am Bioanalyzer-Messstand (siehe Anhang B).

2.5 Real-time PCR

2.5.1 Reverse Transkription

Nach der unter 2.4. genannten Qualitätskontrolle wurden aus allen Karzinom- und Mukosabiopsien jeweils 200 ng RNA mit dem iScript cDNA Synthesis Kit in cDNA revers transkribiert:

4 µl	5x iScript Reaction Mix
1 µl	iScript reverse Transkriptase
200 ng	RNA-Probe
ad 20 µl	H ₂ O _{nukleasefrei}
20 µl Gesamtvolumen	

Darüber hinaus wurden drei Proben von Patienten, welche aus der Untersuchung ausgeschlossen wurden, zur Etablierung und Optimierung der real-time PCR in dem 5-fachen oben genannten cDNA-Syntheseschritt eingesetzt. Die drei daraus resultierenden cDNA-Proben wurden als Standard zusammengefasst.

2.5.2 Primer

Die verwendeten Primer wurden mit der Software Primer3 aus den Gensequenzen der NCBI Genbank entnommen. Mit dem von ZUKER (2003) beschriebenen Algorithmus konnten Substrukturen innerhalb des einzelnen Primers, zwischen beiden Primern sowie im Amplifikationsprodukt eines Paares ausgeschlossen werden. Weiterhin wurde jeder Primer mit dem Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) vom National Center of Biotechnology Information (NCBI) bezüglich seiner Spezifität überprüft. Es wurden jeweils unmodifizierte lyophilisierte Primer à 0,02 µmol von Metabion, Deutschland (www.metabion.de) bezogen. Die in Probengefäßen gelieferten Oligonukleotide wurden in Stammlösungen à 100 µM H₂O gelöst und hieraus Aliquots in einer Verdünnung auf 10 µM hergestellt. Für jedes Primerpaar wurde die optimale Arbeitstemperatur von 60°C verifiziert. Im Anschluss wurden die Primer in mehreren Vorversuchen etabliert. Zuerst wurden alle Primer mittels PCR an der Standardprobe auf ihre Funktionsfähigkeit getestet. Dabei wurde, um das Entstehen von Nebenprodukten ausschließen zu können, auch eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Anschließend wurde mittels standardisierter Verdünnungsreihen die Effizienz der real-time PCR überprüft. Schlussendlich wurden die Längen der Reaktionsprodukte mittels Gelelektrophorese evaluiert. Anhand dieser Vorversuche konnte aus mehreren alternativen Oligonukleotiden für jedes Connexin das bestmöglich arbeitende Primerpaar bestimmt werden.

2.5.3 Schmelztemperatur

Zunächst wurde bei allen Primern der zu untersuchenden Gene die errechnete Schmelztemperatur verifiziert. Hierzu wurde eine real-time PCR mit dem iQ SYBR Green Kit durchgeführt:

12,5 µl	iQ SYBR Green Supermix
0,4 µl	Primer (fwd)
0,4 µl	Primer (rev)
10,7 l	H ₂ O _{dest.}
<u>1 µl</u>	<u>cDNA (Standardprobe)</u>
25 µl	Gesamtvolumen

Programm:

1 x	98,0°C	0'30"
40 x	94,0°C	0'01"
	60,0-64,0°C	0'15" Temperaturgradient über Probentriplet. Echtzeitanalyse
	72,0°C	0'01"
1 x	94,0°C	0'15"
1 x	60,0°C	0'30"
75 x	55,0-92,0°C	0'10" Jede Wiederholung mit Erhöhung der Temperatur um 0,5°C, Echtzeitanalyse

Es wurde die temperaturabhängige Spezifität jeder PCR-Reaktion anhand der Schmelzkurve und anhand einer Gelelektrophorese auf einem 1,5% Agarosegel analysiert. Hierbei konnte für alle oben genannten Primerpaare ausgeschlossen werden, dass ein Produkt entstand, welches nicht der erwarteten Basenpaarlänge entsprach (siehe Anhang C). Weiterhin lag in Übereinstimmung mit der errechneten Schmelztemperatur bei allen Primern bei 60° C die höchste Effizienz der PCR Reaktion vor.

2.5.4 Real- Time- PCR

Für die Quantifizierung der Biopsien wurde jede einzelne Reaktion für die real-time PCR wie folgt angesetzt:

20 µl Mastermix:

12,5 µl iQ SYBR Green Supermix

6,7 µl H₂O_{dest.}

0,4 µl Primer (fwd)

0,4 µl Primer (rev)

5 µl Template (cDNA)

25 µl Gesamtvolumen

Das folgende zeitoptimierte Programm war am Bio-Rad iQ5 real-time Detection-System in Vorversuchen etabliert worden:

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

Für die einzelnen real-time PCR Versuche wurden Probenplatten mit 96 Reaktionsgefäßen verwendet, welche mit einer transparenten Versiegelungsfolie verschlossen werden konnten. Auf jeweils zwei Platten wurde durch Einsatz der zuvor etablierten Primerpaare die Expression der 8 untersuchten Connexingene in Mukosa- und Karzinombiopsien von jeweils einem Patienten analysiert. Dabei wurde für jedes Connexin und GAPDH eine absteigende Verdünnungsreihe über vier 10er-Potenzen erstellt. Weiterhin wurden technische Triplikate der cDNA von jeweils einer Tumorprobe und der dazugehörigen Schleimhautkontrolle eines Patienten analysiert. Die Negativkontrolle – „no template control“ – jedes Versuches wurde durch Zugabe von 5 µl sterilem Wasser anstatt Patienten-cDNA angesetzt. Sie ermöglichte den Ausschluss einer artifiziellen DNA-Kontamination des PCR-Mastermixes. Weiterhin wurden die Positionen der Gewebeproben des einzelnen zu untersuchenden Patienten beibehalten, um Effekte der unterschiedlichen PCR-Effizienz oder Fluoreszenzdetektion auf den Probenplatten auszuschließen.

2.6 Statistische Analyse: Auswertung der real-time PCR

Zur Auswertung der Expressionsunterschiede der acht Connexine wurde in dieser Arbeit die Methode zur relativen Quantifizierung angewandt. Die Expressionsdaten wurden auf GAPDH als Referenzgen normalisiert, und die differentielle Expression der einzelnen Connexinsubtypen über die CT- Werte sowie die Effizienz der PCR Reaktion mit folgender Formel berechnet (PFAFFL 2001).

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

Dabei ist E die entsprechende Effizienz der real-time PCR, berechnet anhand der Steigung standardisierter Verdünnungsreihen. Der CT -Wert (*threshold cycle*) ist als der Reaktionszyklus definiert, an welchem das Fluoreszenzsignal die Hintergrundfluoreszenz merklich übersteigt. Er markiert somit den Beginn der exponentiellen Phase der Reaktion. Der relative Expressionsquotient (R) eines Zielgens wird auf der Basis von E und der Abweichung der CT -Werte der unbekannt Probe gegen eine Kontrolle (*Standard*) berechnet, und in Verhältnis zu einem Referenzgen ausgedrückt.

Da bei den Expressionswerten keine Normalverteilung zu erwarten war, wurden die Expressionsdaten mithilfe des Wilcoxon-Rangsummentests statistisch ausgewertet. Die resultierenden p -Werte wurden zur Beseitigung einer α -Fehler Kumulierung mit der Holm-Methode angepasst. Bei p -Werten unter 0,05 wurden signifikante Unterschiede angenommen.

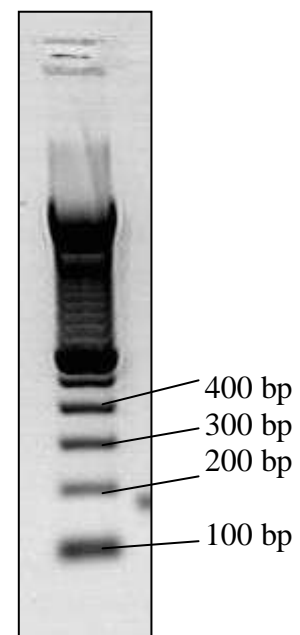
3 Ergebnisse

3.1 Expression der Connexinsubtypen in oraler humaner Schleimhaut

In Biopsien humaner, oraler Mukosa und oraler Plattenepithelkarzinome war der Nachweis folgender Connexinsubtypen möglich:

- Connexin 26
- Connexin 30
- Connexin 30.3
- Connexin 31
- Connexin 31.1
- Connexin 40
- Connexin 43 und
- Connexin 45.

Connexin 32 und Connexin 50 konnten in Tumor- und Schleimhautproben mit verschiedenen Primerpaaren nicht nachgewiesen werden. Es ist davon auszugehen, dass diese Subtypen in humaner oraler Mukosa nicht exprimiert werden.



Invitrogen 1 kb Ladder

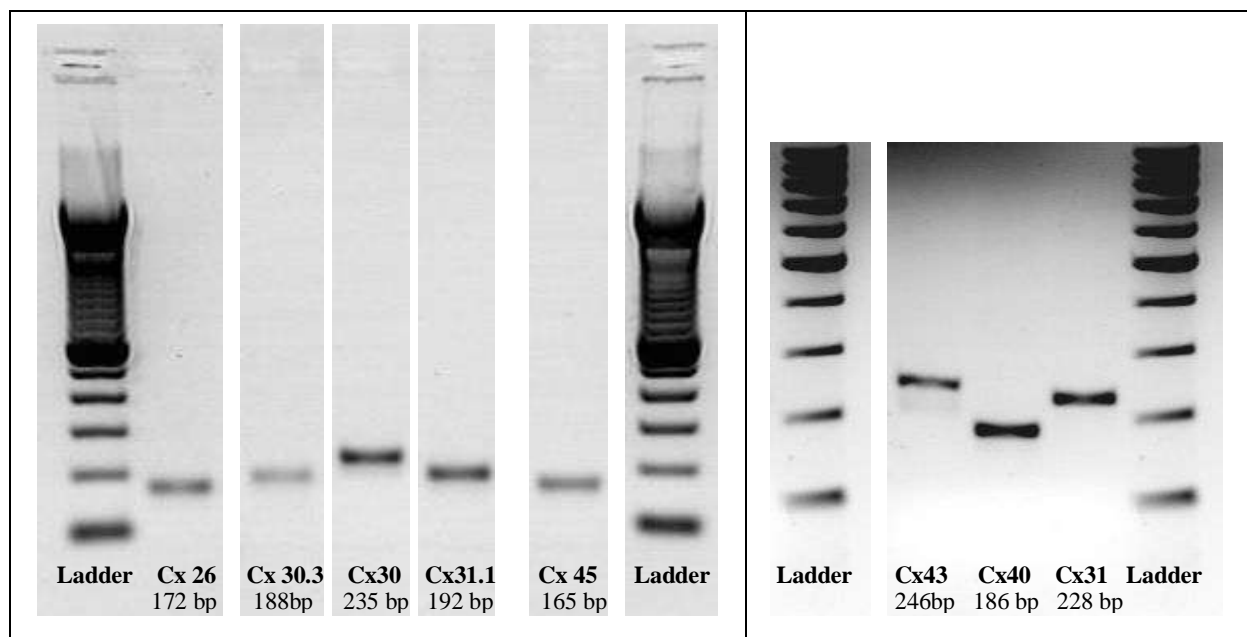
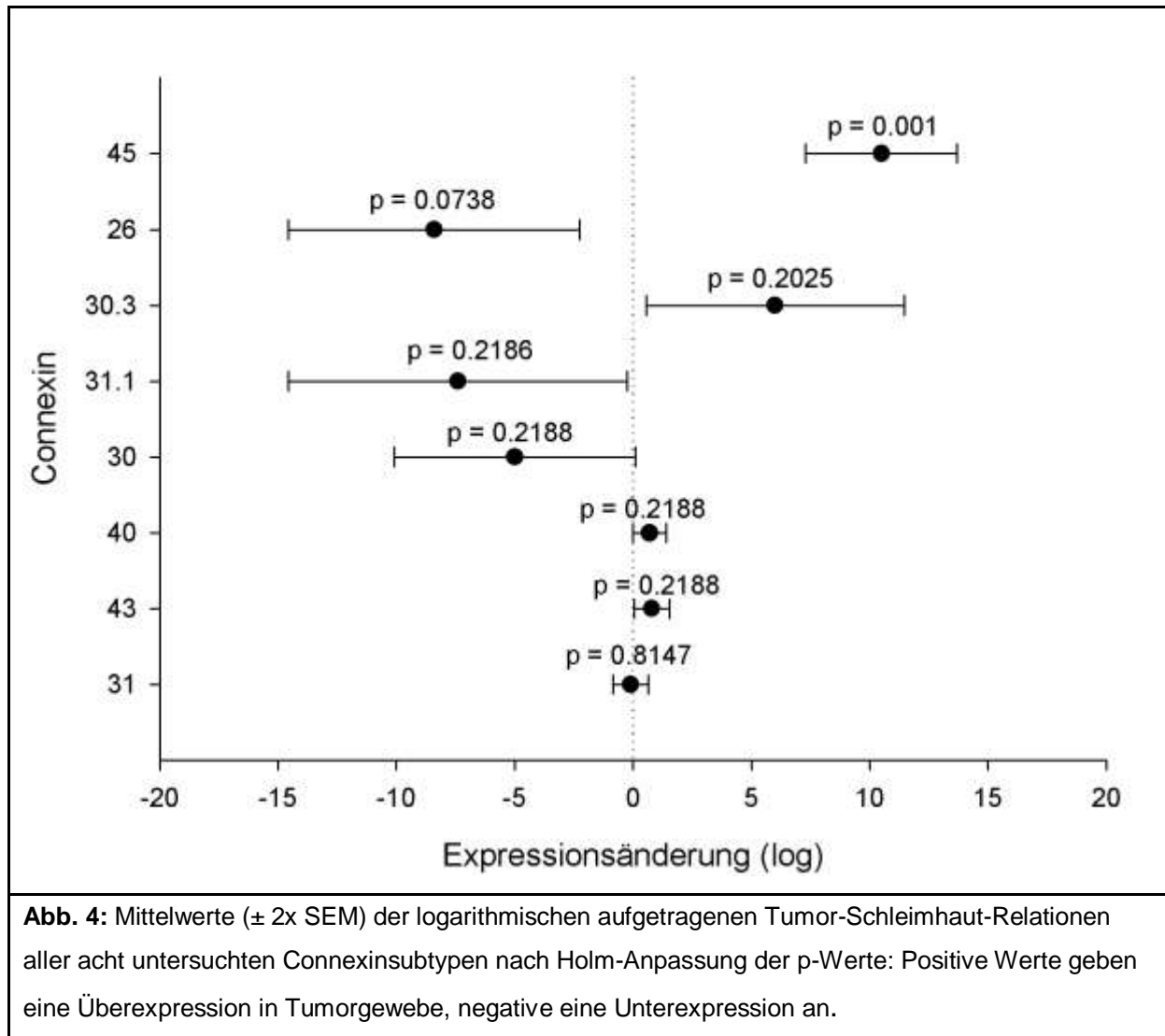


Abb.3: Gelelektrophorese der in Tumor- und Schleimhautproben amplifizierten Connexin DNA

3.2 Differentielle Connexinexpression im oralen Plattenepithelkarzinom

Beim Vergleich der Tumorproben mit ihren intraindividuellen Schleimhautkontrollen zeigten die untersuchten Connexine ein differentielles Expressionsmuster:



Connexin 45 und Connexin 30.3 waren in den Tumorproben 10,5- und 6,0-log-fach überexprimiert. Nach der Holm-Anpassung zur Korrektur des alpha-Fehlers bei multiplen Tests war nur das Connexin 45 signifikant überexprimiert (adj. $p=0,001$, Tabelle 1; Abbildung 1). Connexin 30.3 überschreitet das Signifikanzniveau von $p=0,05$. Die Connexine 26, 30 und 31.1 waren in den Tumorproben tendenziell unterexprimiert. Connexin 26 war -8,4 log-fach unterexprimiert. Die Connexine 30 und 31.1 zeigten eine 7,4 log-fache bzw. eine 5,0 log-fache Unterexpression im Vergleich zu den Schleimhautkontrollen. Nach Holm-Anpassung überschreitet

Connexin 26 mit $p=0,0738$ das Signifikanzniveau von $p=0,05$. Die Unterexpression der Connexine 30 und 31.1 war statistisch ebenfalls nicht signifikant.

Die Connexine 31, 40 und 43 zeigten keine relevanten differentiellen Expressionsunterschiede zwischen Tumorproben und Schleimhautkontrollen. Dies galt sowohl vor, als auch nach der Holm-Anpassung für multiples Testen.

Connexin	P	p (Holm-angepasst)	log Fold Change	95% KI für log Fold Change
45	0,0000	0,0001	10,5	[7,3; 13,7]
26	0,0105	0,0738	-8,4	[-14,6; -2,3]
30.3	0,0338	0,2025	6,0	[0,5, 11,4]
30	0,0437	0,2186	-7,4	[-14,5; -0,2]
31.1	0,0547	0,2188	-5,0	[-10,1; 0,1]
43	0,0558	0,2188	0,7	[0,0; 1,5]
40	0,0712	0,2188	0,8	[-0,1;1,7]
31	0,8147	0,8147	-0,1	[-0,8;0,7]

Tab. 3: p-Werte und Fold Changes für den Vergleich der Connexingenexpression in Tumor und Schleimhaut

3.3 Differentialexpression von Connexin 45 und 43 in Relation

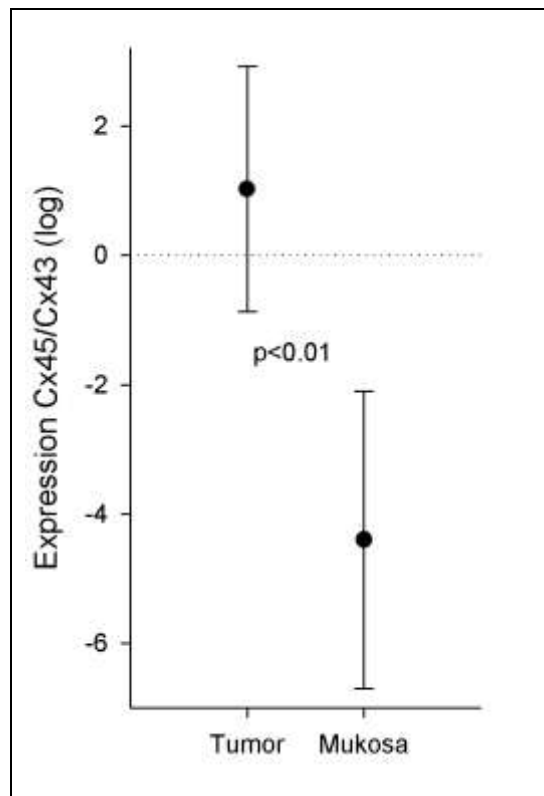
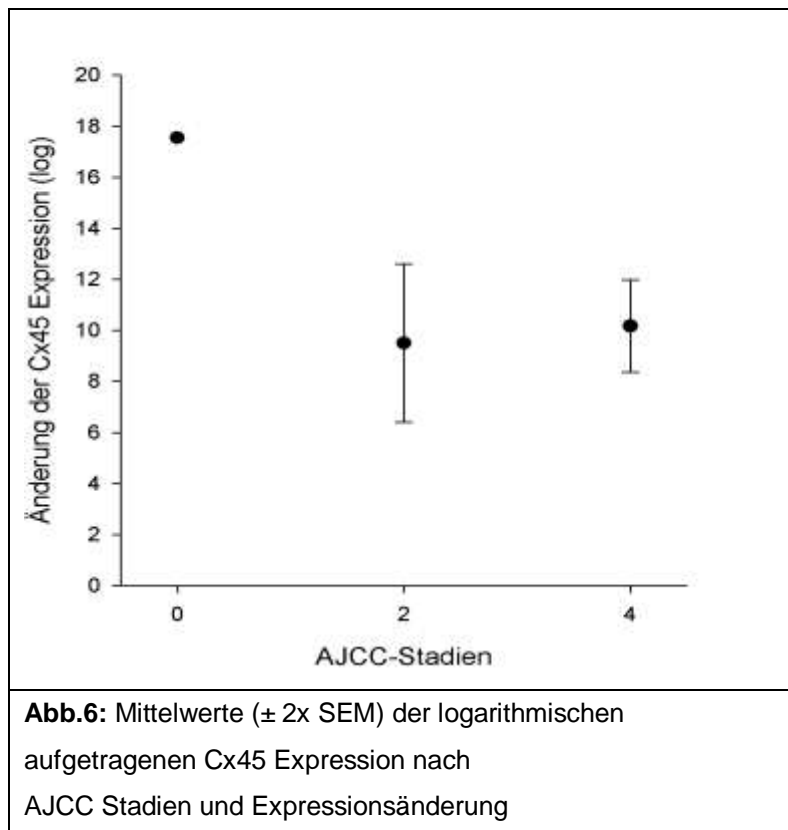


Abb.5: Mittelwerte ($\pm 2x$ SEM) der logarithmischen aufgetragenen Cx45/Cx43 Relationen in Tumor und Schleimhaut

Wegen ihres funktionellen Zusammenschlusses in Connexonen und heterotypischen Gap-Junctions (siehe Abschnitt 1.4.2 „Connexine“ und 4.4 „Expressionsergebnisse“) wurde das Verhältnis der Genexpression des Connexin 45 zum Connexin 43 separat untersucht. Die Relation war, verglichen mit den Schleimhautkontrollen, in den Tumorproben stark erhöht ($p<0,01$, Abbildung 6).

3.4 Korrelation der Genexpression mit klinischen Parametern



Die differentielle Genexpression aller Connexine unterschied sich in frühen und späten Stadien der Tumorerkrankung nicht signifikant voneinander (für Connexin 45 in Abbildung 6 exemplarisch dargestellt). Es war weiterhin keine Korrelation mit Risikofaktoren wie Alkohol- oder Tabakkonsum oder epidemiologischen Parametern wie Geschlecht feststellbar. Auch das histopathologische Grading stellte keine signifikante Einflussgröße für die differentielle Genexpression der untersuchten Connexine dar.

4 Diskussion

4.1 Real-Time PCR

Die quantitative real-time PCR ist eine etablierte, sensitive Methode der DNA-Quantifizierung. Durch reverse Transkription von RNA in cDNA kann diese Methode auch zur Genexpressionsanalyse auf mRNA-Ebene genutzt werden. Die real-time PCR basiert auf der Aufzeichnung von zur Menge der DNA proportionalen Fluoreszenzaktivität bestimmter Fluorophore während der Reaktion in Echtzeit. Zur Quantifizierung werden dabei keine absoluten Mengen eines PCR Produkts gemessen, sondern vielmehr die Kinetik der Reaktion genutzt.

Als Maß für die Quantifizierung der Startmenge wird der sogenannte CT-Wert (*threshold cycle*) herangezogen. Dieser entspricht dem PCR Zyklus einer Reaktion, ab dem sich die Fluoreszenzaktivität deutlich von der Hintergrundfluoreszenz abhebt. Im Falle einer 100% Effizienz der PCR verdoppelt sich mit jedem Zyklus die DNA-Produktmenge und analog dazu das Fluoreszenzsignal. Das heißt die Reaktion folgt nun einem exponentiellen Verlauf. Ein um einen Zyklus geringerer CT-Wert entspricht idealisiert der doppelten Menge an Ausgangs-DNA.

Bei der relativen Quantifizierung werden nicht die absoluten DNA-Startkopienzahlen oder -Konzentrationen bestimmt, sondern die Expression des zu untersuchenden Gens wird auf ein zweites, ubiquitär und homogen exprimiertes Referenzgen (*GAPDH*) und eine Probe mit standardisierter Genexpression bezogen. Somit ist es möglich, aus PCR-Effizienz und C_T -Wert für jedes untersuchte Gen einer Probe dessen differentielle Expression in Bezug auf das Housekeeping-Gen (*GAPDH*) als Referenz zu berechnen. Die Vorteile dieser Normalisierung liegen in der Reduzierung der Varianz der Expressionsergebnisse, da Gewebe- und Matrixeffekte, unterschiedliche RNA-Extraktionseffizienzen sowie Fehler bei der reversen Transkription innerhalb einer experimentellen Probe gleichermaßen das Zielgen und das Referenzgen betreffen. (PFAFFL 2001). Eine Endpunkt-PCR mit semiquantitativer Anfärbung von Gelelektrophoresebanden ist der oben beschriebenen Methode unterlegen, da hier nicht nur die eingesetzte DNA-Menge,

sondern auch die Effizienz der PCR-Reaktion das Messergebnis beeinflussen kann (SCHMITTGEN et al. 2000).

Um die Änderung der DNA-Konzentration im Reaktionsverlauf zu bestimmen, bieten sich mehrere Möglichkeiten an. Der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green bindet unspezifisch an Doppelstrang-DNA, und emittiert daraufhin Licht bekannter Wellenlänge proportional zur entstandenen DNA-Menge. Allerdings ist die artifizielle Beeinflussung des detektierten Signals durch die Bindung des Farbstoffes an unspezifische PCR-Produkte möglich (SCHNEEBERGER et al. 1995). Aus diesem Grund ist es notwendig, nach abgeschlossener Genexpressionsanalyse jeder untersuchten Probe eine Schmelzkurvenanalyse durchzuführen, um die Entstehung unspezifischer PCR Produkte mit von der Zielsequenz abweichenden Basenpaarverhältnissen ausschließen zu können (RIRIE et al. 1997).

Beim TaqMan-Assay kann wegen der hohen Spezifität des Fluoreszenzsignals auf eine Schmelzkurvenanalyse verzichtet werden, woraus sich ein zeitlich effizienterer und ökonomischerer Arbeitsablauf ergeben würde. Bei dieser Methode wird zu den beiden Primern noch eine hoch-sequenzspezifische Sonde hinzugefügt, welche erst bei Amplifikation durch die Taq-Polymerase ein Fluoreszenzsignal freisetzt. Auch bei suboptimalem Primerdesign entsteht hierbei ein spezifisches Signal. Allerdings ist der TaqMan-Assay der SYBR Green Methode im Hinblick auf die Sensitivität unterlegen (SCHMITTGEN et al. 2000).

Aus diesem Grund wurde in der hier vorliegenden Arbeit ein SYBR-Green-PCR-Ansatz verwendet, und bei allen untersuchten Proben wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. In den Fällen, bei denen der Verdacht einer unspezifischen PCR-Reaktion bestand, wurden die entstandenen Produkte einer Auftrennung durch Gelelektrophorese zugeführt. Die in der zu erwartenden Nukleotidlänge differierenden Proben wurden einer späteren Auswertung entzogen. Insofern ist davon auszugehen, dass die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte real-time PCR für den Nachweis der jeweiligen PCR-Produkte spezifisch war.

4.2 Grenzen

Mittels real-time PCR kann die Genexpression auf mRNA-Ebene untersucht werden. Unterschiedliche Genexpressionen in verschiedenen Proben bedeuten unter diesen Umständen Unterschiede in der Transkription. Diese können physiologisch reguliert oder durch genomische Mutationen bedingt sein. Auch die Translation der hier untersuchten mRNA in der Proteinbiosynthese kann Regulationsmechanismen unterworfen sein, die mithilfe der hier verwendeten Methoden nicht erfasst werden können. Deshalb haben Schlussfolgerungen von mRNA-Expressionsmustern auf biologische Funktionen nur dann eine Gültigkeit, wenn keinen signifikanten posttranskriptionellen Veränderungen vorausgesetzt werden. Jedoch wurden im Rahmen der Karzinogenese Connexinexpressionsregulationsmechanismen beobachtet, welche sich erst auf Proteinebene vollziehen (BUDUNOVA et al. 1995, XIA et al. 2009). Dies bedeutet für die differentielle Genexpressionsanalyse, dass eine Äquivalenz der mRNA-Transkription in Tumor- und Schleimhautproben nicht unbedingt posttranslational Gültigkeit besitzen muss. Umgekehrt kann jedoch bei Unterschieden auf mRNA-Ebene auch eine differentielle Expression auf Proteinebene angenommen werden. Die mRNA-Genexpressionsanalyse lässt außerdem keine Schlüsse auf die Lokalisation der untersuchten Gap-Junction-Strukturproteine zu. So können Connexine Regulationen im Verlauf der Karzinogenese bewirken, obwohl sich aufgrund unphysiologischer, zytoplasmatischer Lokalisation der Proteine keine funktionierende GJIC etablieren kann (HUANG RP et al. 1998). Für die Connexine Cx45 sowie Cx26 sollte in weiterführenden Untersuchungen geklärt werden, wie diese im Rahmen der Karzinogenese des Plattenepithelkarzinoms der Mundhöhle reguliert werden. Interessant wäre dabei zu erfahren, inwiefern sich die differentielle Transskription auf Proteinebene fortsetzt. Auch die intrazelluläre Lokalisation der hier untersuchten Connexine mittels Immunhistochemie bleibt noch zu untersuchen.

Bei der Diskussion einer Connexinbeteiligung an der Genese des oralen Plattenepithelkarzinoms ergeben sich aus zweierlei Gründen Schwierigkeiten:

Zum Ersten beruhen, mit wenigen Ausnahmen, die bisherigen Erkenntnisse fast ausschließlich auf in vitro durchgeführten Untersuchungen. Im Hinblick auf den tumorsuppressiven Effekt durch Restauration einer supprimierten

Connexinexpression konnten Diskrepanzen zwischen zweidimensionalen Zellkulturen und in-vivo-Untersuchungen belegt werden (McLACHLAN et al. 2006). Zum Zweiten liegen für die epithelialen Gewebe der Mundhöhle und des oberen Schlundbereichs keine exakten Kenntnisse über physiologischerweise dort exprimierte Connexinsubtypen vor. So berichteten lediglich OZAWA et al. (2007) von unterschiedlichen Proteinkonzentrationen der Subtypen 26 und 30 in gesunder humaner Mukosa und Kopf-Hals-Tumoren. Die Untersuchung basiert jedoch auf einem heterogenen Patientenprobenkollektiv, wobei nur 6 Patientenproben aus Mundhöhlenkarzinomen stammen, von denen ein Teil radio- und chemotherapeutisch vorbehandelt worden war.

4.3 Biologischer Ansatz und Statistik

Zur Untersuchung der acht ausgewählten Connexinsubtypen im Verlauf der Karzinogenese der Mundschleimhaut wurde ein intraindividueller Versuchsansatz mit gepaarten Schleimhaut- und Tumorproben von insgesamt 15 Patienten gewählt. Die Verwendung einer intraindividuellen Kontrolle hat den Vorteil, dass aufgrund einer geringeren Varianz kleinere Stichproben zum Nachweis von Unterschieden ausreichend sind. Da es sich hierbei um verbundene Stichproben mit einer nicht zu erwartenden Normalverteilung handelt, wurde in dieser Arbeit die statistische Analyse der Messwerte mittels Wilcoxon Rangsummentest durchgeführt. Dieser Test prüft, ob sich zwei abhängige Stichproben (*Schleimhaut- und Tumorprobe*) in ihrer zentralen Tendenz (*Connexinexpression*) unterscheiden. Da diese statistische Methode die Ränge der Messdaten analysiert, ist der Wilcoxon-Test im Vergleich zu parametrischen Tests (T-Tests) unempfindlicher gegenüber extremen Messwerten. Als weiterer Vorteil gilt, dass eine Normalverteilung nicht vorausgesetzt werden muss. Als nachteilig muss erwähnt werden, dass die Informationen der Daten nicht vollständig ausgenutzt werden (WEIß 2008). Um die Wahrscheinlichkeit falsch positiver Testergebnisse weiterhin zu minimieren und die Häufigkeit signifikanter Einflussfaktoren nicht zu überschätzen, wurde für alle Messwerte eine α -Fehler-Korrektur nach Holm durchgeführt. Diese Prozedur verringert die Wahrscheinlichkeit falsch positiver, erhöht aber zugleich das Risiko falsch negativer Ergebnisse.

4.4 Ergebnisse der Genexpressionsanalyse

Folgender Fragestellung sollte im Rahmen dieser Arbeit nachgegangen werden:

Werden Im Rahmen der oralen Plattenepithelkarzinogenese bei intraindividuellem Vergleich von Tumorproben und Schleimhautkontrollen auf mRNA-Ebene Connexine differentiell exprimiert, und inwiefern korreliert dies mit klinischen Parametern?

Nach dem heutigen Verständnis der Tumorbilogie wäre zu erwarten, dass Tumorsuppressorgene im Rahmen der Karzinogenese herunterreguliert oder auf translationeller oder funktioneller Ebene gehemmt werden. So wurde im Zusammenhang einer beginnenden Tumorerkrankung häufig eine verminderte Connexinexpression in Verbindung mit anormaler GJIC beobachtet (MESNIL et al. 2005). Diese pauschale Erwartung vernachlässigt jedoch die komplexen Funktionen der Connexine als transmembranäre Kanalproteine oder intrazelluläre Interaktionspartner in den unterschiedlichen Entwicklungsstadien der Tumorerkrankung (vgl. Abschnitt 1.3.1. „Modelle zur Karzinogenese“). Versuche an unterschiedlichen Zelllinien belegen, dass die Wiedereinführung der Expression bestimmter Connexine die Abkehr von tumorösen Phänotypen bewirken. Diese Tatsache war häufig unabhängig von der Etablierung einer intakten GJIC (IONTA et al. 2009, HUANG RP et al. 1998, KALRA et al. 2006, MOMIYAMA et al. 2003). Außerdem ist die Krebserkrankung nicht nur als dereguliertes Wachstum, sondern auch durch die lokale Gewebeinvasion des Tumors, sowie die Aussaat metastatischer Zellen charakterisiert. Betrachtet man in diesem Zusammenhang im initialen Stadium der Wachstumsderegulation Connexine als Tumorsuppressoren, so scheinen sie in späteren Erkrankungsstadien eher als Onkogene zu agieren (CRONIER et al. 2009), die den Brückenschlag vom lokal invasiven Tumor zum metastasierenden Krebs bewerkstelligen (ITO et al. 2000). Unter diesen Vorbetrachtungen sind die Expressionsdaten der untersuchten Connexine zu interpretieren.

4.4.1 Keine differentielle Expression

Bei den in dieser Arbeit untersuchten Gewebeproben wurden die **Connexine 30, 31, 40** und **43** im Tumorgewebe weder über- noch unterexprimiert. Der Vergleich zwischen Tumor- und Schleimhautproben zeigte bei allen 4 Connexinen nur minimale quantitative Unterschiede, außerdem wurde das Signifikanzniveau weit

überschritten. Von Connexin 30 sind sowohl Unterexpression in Kopf-Hals-Tumoren als auch proliferationshemmende Effekte am Tiermodell in vitro beobachtet worden (OZAWA et al. 2007, PRINCEN et al. 2001). Allerdings muss die Aussagekraft von in-vitro-Studien kritisch hinterfragt werden, da sich derartige Untersuchungen von Connexinen als Tumorsuppressoren nicht ohne weiteres unter komplexen in-vivo-Bedingungen bestätigen lassen (McLACHLAN et al. 2006). Von Connexin 40 ist bekannt, dass es im Rahmen der Plazentogenese die Trophoblastenmigration und -invasion in vitro negativ reguliert (WRIGHT et al. 2006). Derartige Einflüsse konnten in vivo für das orale Plattenepithelkarzinom mit der hier verwendeten Methode nicht bestätigt werden. Von Connexin 31 wird in der Literatur im Rahmen der Karzinogenese nicht berichtet, so dass in diesem Zusammenhang von keiner differentiellen Expression dieses Subtyps ausgegangen werden kann. Auch die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen diese Annahme.

Das Connexin 43 gehört zu den am besten untersuchten Vertretern dieser Proteinfamilie. Im Bezug auf Karzinogenese, Proliferation und Apoptose liegen zahlreiche Daten vor. Was die Rolle dieses Connexins während der Karzinogenese angeht, so herrschen unterschiedliche Auffassungen. Zum einen gibt es Berichte, über die onkogene Potenz des Connexin 43 (VILLARES et al. 2009, ZHANG D et al. 2007). Es existiert allerdings eine große Mehrheit an Untersuchungen, welche tumorsupprimierende Eigenschaften wie Proliferationshemmung durch negative Regulation von Onkoproteinen (Skp-2) und positive Regulation von Tumorsuppressorproteinen (p27) durch Connexin 43 beschreiben (ZHANG YW et al. 2001, ZHANG YW et al. 2003b). Ähnliche Beobachtungen wurden bei in-vivo-Untersuchungen an Keratinozyten im Tiermodell gemacht. Für Connexin 43 konnte beispielsweise durch direkte Interaktion mit dem Tumorsuppressor *Caveolin-1* eine verringerte Invasivität nachgewiesen werden (LANGLOIS et al. 2010). Es gibt zahlreiche Studien, die im Verlauf der Karzinogenese eine Reduktion dieses Connexins belegen (XING et al. 2007). Auffallend dabei ist allerdings, dass trotz reduzierter Proteinkonzentration eine normale Transkription auf mRNA-Ebene zu beobachten ist (XIA et al. 2009). Andere Untersuchungen an ähnlichen Modellen bestätigen dieses Phänomen (BUDUNOVA et al. 1995). Der dort im Verlauf der Karzinogenese auftretende Mangel an Connexin 43 lässt sich nicht mit dessen konstant hohem mRNA-Spiegel vereinen, weshalb bei karzinogenen Prozessen von einer posttranslationalen Regulation dieses Connexins ausgegangen werden kann.

Abschließend bleibt festzuhalten, dass in den in-vivo-Untersuchungen dieser Arbeit keine relevanten Expressionsänderungen des Connexin 43 auf m-RNA Ebene auftraten, was aber, wie oben beschrieben, auf Protein Ebene nicht ausgeschlossen werden kann.

4.4.2 Differentiell überexprimierte Connexine

In dieser Arbeit konnte weiterhin gezeigt werden, dass **Connexin 45**, im Vergleich mit den Schleimhautkontrollen, im oralen Plattenepithelkarzinom signifikant überexprimiert war. Der Literatur gibt es zu diesem Connexin nur wenige humane in-vivo-Untersuchungen zu entnehmen. Dennoch soll im Folgendem versucht werden, die Überexpression anhand verschiedener Hypothesen zu erklären.

Vergleichsweise gut untersucht wurde das Connexin 45 in Bezug auf seine Co-Expression mit dem Connexin 43. In Übereinstimmung mit den Daten dieser Arbeit, berichteten UDAKA et al. (2007) von einer starken Überexpression des Connexin 45 im Vergleich zum Connexin 43 in vivo im Mausmodell. Die beiden Connexine sind in der Lage, gemeinsam heteromere Gap-Junctions zu formen (MARTINEZ et al. 2002). Die resultierenden Kanäle besitzen ein geringeren Durchmesser und infolgedessen eine verringerte Diffusionskapazität im Vergleich zu den homomeren Connexin-43-Analoga (KOVAL et al. 1995, GRIKSCHEIT et al. 2008). Diese Beeinflussung der Passageeigenschaften wurde auch in vitro an verschiedenen Osteoblastenzelllinien bestätigt. Dort konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass die Erhöhung des Cx45/Cx43-Expressionsverhältnisses über eine verringerte GJIC einen veränderten zellulären Phänotyp hervorbrachte. Im Detail bewirkte Connexin 45 dabei die Reduzierung der GJIC. Dies hatte nachweislich die Negativregulation der zur osteozytären Differenzierung essentiellen Gene *Osteocalcin* und *BSP (bone sialo-protein)* zur Folge, vermutlich über die veränderte Diffusion interzellulärer Signalmoleküle (LECANDA et al. 1998). Im Gegenzug bewirkte die Erhöhung der Connexin-43-Expression genau gegenteilige Effekte, sodass die beiden Proteine als Antagonisten verstanden werden können.

Ähnliche Beobachtungen wurden in vivo am insuffizienten Herzen gemacht. Dort kam es zu einer positiven Regulation von Connexin 45, bei paralleler Unterexpression von Connexin 43, mit anschließender Ausbildung heteromerer Gap-Junction-Kanäle (YAMADA et al. 2003). BETSUYAKU et al. (2006) bestätigten diese

Beobachtungen und zeigten, dass Patienten infolge dieser relativen Connexin-45-Überexpression eine alternierende heteromere GJIC mit verringerter Porengröße (KOVAL et al. 1995) und veränderten spannungsgesteuerten Diffusionseigenschaften hervorbringen (BUKAUSKAS et al. 2002) was in erhöhter Anfälligkeit für ventrikuläre Arrhythmien resultiert.

Auch in der hier vorliegenden Arbeit zeigte sich eine erhöhte Expression von Connexin 45 in Relation zu Connexin 43.

Ob auch im oralen Plattenepithelkarzinom dadurch die Zell-Zell-Kommunikation beeinflusst wird und ebenfalls in Differenzierungs- (LECANDA et al. 1998) oder Wachstumsvorgänge (TROSKO et al. 2004) eingreift, bleibt Gegenstand weiterführender Untersuchungen.

Eine weitere Hypothese bezieht sich auf die Beteiligung des Connexin 45 an der Karzinogenese, welche in der Literatur bisher nur spärlich beschrieben ist. So wurde beispielsweise die differentielle Expression des Connexin 45 in humanen Lungenfibroblasten und in verschiedenen Lungenkarzinomzelllinien nachgewiesen (ZHANG ZQ et al. 2004). Bei der Maus wird Connexin 45 in gesundem Lungengewebe und in fortgeschrittenen Lungentumoren vorgefunden, nicht aber in initialen kleineren Tumoren der Lunge (UDAKA et al. 2007). Diese Beobachtungen decken sich mit den Ergebnissen aus dieser Arbeit. Bei den untersuchten Tumorproben ist in ihrer überwiegenden Mehrheit auch von einem fortgeschrittenen, bereits lokal invasiven Erkrankungsstadium auszugehen (siehe Anhang A). Weiterhin wird berichtet, dass in Connexin-43-exprimierenden-Zellen eine Co-Lokalisation mit Connexin 45 ein deutlich verringertes Zellkupplungsverhalten zur Folge hat (KOVAL et al. 1995, YAMADA et al. 2003). Ein Zusammenhang zwischen Loslösung der Tumorzellen vom Primärtumor im Rahmen der Migration und einem verringerten Zellkupplungsverhalten infolge erhöhter Connexin-45-Expression wäre eine Erklärung für den signifikanten Anstieg des Membranproteins in diesen fortgeschrittenen Tumorproben (siehe Anhang A).

Darüber hinaus kann eine weitere Hypothese sein, dass die Überexpression des Connexin 45 als Reaktion einer vorausgegangenen Unterexpression eines anderen Connexins erfolgt. Dieses wurde beispielsweise im Gewebe von Zahnpulpen beobachtet. Dort bewirkte die Unterexpression von Connexin 43 durch antisense-Oligonukleotide eine Heraufregulierung des Connexin 45 (CHUNG et al. 2007). Da, wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, im oralen Schleimhautepithel Connexin 43 jedoch

nicht differentiell exprimiert ist, käme für eine gegenläufige Regulation des Connexin 45 nur ein in diesem Gewebe unterexprimierter Subtyp in Betracht. Die Frage, ob Connexin 45 bei Initiation, Promotion oder Progression von oralen Plattenepithelkarzinomen eine Schlüsselrolle spielt, oder ob es lediglich als Reaktion auf die Unterexpression eines anderen Connexins verstärkt exprimiert wird, bleibt Gegenstand weiterer Untersuchungen.

Die Expression des **Connexin 30.3** war im Tumorgewebe ebenfalls erhöht, wenngleich die Überexpression aufgrund des erhöhten Signifikanzniveaus nur als Tendenz betrachtet werden sollte. In der Literatur ist dieses Connexin äußerst dürftig untersucht. Im Zusammenhang mit Karzinogenese, Zellzyklus oder Apoptose liegen keine Studien vor.

4.4.3 Differentiell unterexprimierte Connexine

Bei den in dieser Arbeit in vivo untersuchten oralen Plattenepithelkarzinomproben war das **Connexin 26** im Vergleich zur gesunden Schleimhaut stark unterexprimiert. Der Wilcoxon-Test erwies sich als statistisch signifikant. Nach Holm-Korrektur wurde das Signifikanzniveau von 0,05 allerdings knapp überschritten, sodass die Unterexpression von Connexin 26 nur als tendenziell einzustufen ist. Das Connexin 26 kommt vermehrt in Keratinozyten, Hepatozyten sowie im Sinnesepithel der Chochlea vor. Mutationen dieses Gens bewirken in der Regel angeborenen Hörverlust und oder hyperkeratotische Entwicklungsstörungen der Haut (GERIDO et al. 2007).

In der Literatur werden diesem Connexin potentielle tumorsupprimierende Eigenschaften in Karzinomen der Brust zugewiesen (LEE et al. 1991). Wachstumshemmende Effekte (HIRSCHI et al. 1996), die Revision des malignen Phänotyps (MOMIYAMA et al. 2003) sowie die negative Regulation der Neoangiogenese (QIN et al. 2003) wurden für verschiedene Brustkrebszelllinien beschrieben.

Weitere in-vitro-Untersuchungen an HeLa- und HepG2-Zellen zeigten die Beteiligung des Connexin 26 an der kontaktinduzierten Wachstumsinhibition in diesen Zelllinien (MESNIL et al. 2005, YANO et al. 2001). Ein möglicher, molekularer Mechanismus führt über die tumorsuppressiven Effekte der *all-trans*-Retinsäure (ATRA), welche nach Beobachtungen von MASGRAU-PEYA et al. (1997) Connexin

26 in vivo induziert. Diese Eigenschaften würden mit der tendenziellen Unterexpression dieses Connexins, so wie sie in dieser Arbeit beobachtet wurde, korrelieren. Es bedarf jedoch weitergehender Untersuchungen, um dessen Rolle im Verlauf der oralen Plattenepithelkarzinogenese zu evaluieren.

Ebenfalls unterexprimiert war das **Connexin 31.1**. Zu diesem Connexinsubtyp ist bislang ebenfalls nur sehr wenig bekannt. Dennoch wird in der Literatur im Zusammenhang mit der Karzinogenese im Kopf-Hals-Bereich (BROGHAMMER et al. 2004, AL MOUSTAFA et al. 2002) wie auch im Tiermodell (BUDUNOVA et al. 1995) in vivo von einer Unterexpression des Connexin 31.1 berichtet. Die nach Wilcoxon-Test bestehende signifikante Unterexpression war nach der Holm-Anpassung nicht mehr nachweisbar. Auch war die tendenzielle Unterexpression des Connexin 31.1 (32-fach) nicht dermaßen ausgeprägt wie beim Connexin 26 (344-fach).

4.4.4 Korrelation mit Tumorstadium und klinischen Parametern

Es konnte keine Korrelation der Überexpression von Connexin 45 mit folgenden untersuchten, klinischen Parametern nachgewiesen werden: Geschlecht, Alkoholabusus, Nikotinabusus, histopathologischem Grading, Primärtumorausdehnung, Lymphknotenstatus und AJCC-Stadium. Dies kann bedeuten, dass die Überexpression des Connexin 45 tatsächlich in keinem Zusammenhang mit klinischen Einflussfaktoren steht. Es ist aber auch möglich, dass eventuell bestehende Korrelationen mit den Untersuchungen in dieser Arbeit nicht erfasst werden konnten. Dafür sprechen folgende Aspekte:

Bei intraindividuellen Vergleichen, wie etwa der differentiellen Connexinexpression an einem Patienten handelt es sich um verbundene Stichproben mit geringer Varianz. Es ist möglich, dass ein Zusammenhang zwischen Überexpression und klinischen Parametern besteht, welcher aufgrund der erhöhten Varianz wie sie bei interindividuellen Vergleichen mit unverbundenen Stichproben vorliegt, mit einer Stichprobenanzahl von $n = 15$ nicht detektiert werden kann.

Ein weiterer Aspekt, welcher den fehlenden Nachweis einer Korrelation mit klinischen Daten erklärt, ist die mangelnde Kongruenz der verschiedenen Tumormodelle (vgl. Abschnitt 1.3.1.). Klinisch unterschiedlich weit fortgeschrittene Primärtumoren sind nach dem klassischen 3-Stufen-Modell zur Karzinogenese wahrscheinlich alle im

Progressionsstadium anzusiedeln, und bilden somit tumorbiologisch ein recht homogenes Kollektiv.

Die differentielle Connexinexpressionsanalyse, idealerweise basierend auf der Stadieneinteilung nach CRONIER et al. (2009), würde jedoch die Schwierigkeit bergen, dass Primärtumoren sowie die entsprechenden lokalen Lymphknotenresektate beurteilt werden sollten. Allerdings ist eine RNA-Isolierung durch die histopathologische Fixierung der Lymphknotenpräparate in besonderem Maße erschwert. Deshalb kann man sich in dieser Arbeit nur auf die klinische Klassifikation nach AJCC-Tumorstadien beziehen. Eine eventuelle Korrelation zwischen differentieller Connexinexpression in oralen Plattenepithelkarzinomen und einer Tumorstadieneinteilung nach histomorphologischen Gesichtspunkten sollte Gegenstand zukünftiger Nachforschungen sein.

5 Zusammenfassung

Mit der Fragestellung, inwiefern Connexine in humanen oralen Plattenepithelkarzinomen exprimiert werden und sich diese Expression in Bezug auf gesunde Schleimhaut im intraindividuellen Vergleich unterscheidet, wurde eine quantitative real-time PCR-Analyse durchgeführt. Die differentielle Genexpressionsanalyse an n=15 Patienten umfasste die folgenden Connexinsubtypen: Connexin 26, Connexin 30, Connexin 30.3, Connexin 31, Connexin 31.1, Connexin 32, Connexin 40, Connexin 43, Connexin 45 und Connexin 50. Connexin 32 und Connexin 50 wurden in oraler Mukosa und in oralen Plattenepithelkarzinomen nicht exprimiert.

Es konnten 8 Connexinsubtypen identifiziert werden, von denen nun zum Teil erstmals gezeigt werden konnte, dass sie physiologischerweise in oraler Schleimhaut exprimiert werden: Connexin 26, Connexin 30, Connexin 30.3, Connexin 31, Connexin 31.1, Connexin 40, Connexin 43 und Connexin 45. Davon zeigte Connexin 45 in Tumorgewebe eine signifikante Überexpression, Connexin 26 war tendenziell unterexprimiert. Eine Korrelation mit klinischen Parametern, wie beispielsweise Tumorstadium, bestand nicht.

Bisher existiert eine Vielzahl von Untersuchungen zu Connexinen im Rahmen der Karzinogenese, die für diese nur ein sehr heterogenes Rollenverständnis zulassen. Dieses Verständnis wird durch eine Vielzahl verwendeter Modelle, sowie die Komplexität der Krebserkrankung, aber auch durch viele bis heute unverstandene Funktionen der Connexine erschwert. Hier bedarf es weiterer Untersuchungen, um die Beteiligung von Gap-Junctions und Connexinen an der humanen Karzinogenese zu beleuchten.

6 Literaturverzeichnis

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

Al Moustafa AE, Alaoui-Jamali MA, Batist G, Hernandez-Perez M, Serruya C, Alpert L, Black MJ, Sladek R, Foulkes WD (2002): Identification of genes associated with head and neck carcinogenesis by cDNA microarray comparison between matched primary normal epithelial and squamous carcinoma cells. *Oncogene* 21, 2634-2640

Balz V, Scheckenbach K, Gotte K, Bockmuhl U, Petersen I, Bier H (2003): Is the p53 inactivation frequency in squamous cell carcinomas of the head and neck underestimated? Analysis of p53 exons 2-11 and human papillomavirus 16/18 E6 transcripts in 123 unselected tumor specimens. *Cancer Res* 63, 1188-1191

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

Baylin SB, Herman JG (2000): DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics. *Trends Genet* 16, 168-174

Bedner P, Niessen H, Odermatt B, Kretz M, Willecke K, Harz H (2006): Selective permeability of different connexin channels to the second messenger cyclic AMP. *J Biol Chem* 281, 6673-6681

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

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

Beyer EC, Gemel J, Martinez A, Berthoud VM, Valiunas V, Moreno AP, Brink PR (2001): Heteromeric mixing of connexins: compatibility of partners and functional consequences. *Cell Commun Adhes* 8, 199-204

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

Bond SL, Bechberger JF, Khoo NK, Naus CC (1994): Transfection of C6 glioma cells with connexin32: the effects of expression of a nonendogenous gap junction protein. *Cell Growth Differ* 5, 179-186

Brennan JA, Boyle JO, Koch WM, Goodman SN, Hruban RH, Eby YJ, Couch MJ, Forastiere AA, Sidransky D (1995): Association between cigarette smoking and mutation of the p53 gene in squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 332, 712-717

Broghammer M, Leistenschneider P, Baus-Loncar M, Blin N, Sasiadek MM, Pusch CM (2004): Reduced expression of connexin 31.1 in larynx cancer is not caused by GJB5 mutations. *Cancer Lett* 214, 225-229

Budunova IV, Carbajal S, Slaga TJ (1995): The expression of gap junctional proteins during different stages of mouse skin carcinogenesis. *Carcinogenesis* 16, 2717-2724

Budunova IV, Carbajal S, Slaga TJ (1996): Effect of diverse tumor promoters on the expression of gap-junctional proteins connexin (Cx)26, Cx31.1, and Cx43 in SENCAR mouse epidermis. *Mol Carcinog* 15, 202-214

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

Butterweck A, Elfgang C, Willecke K, Traub O (1994): Differential expression of the gap junction proteins connexin45, -43, -40, -31, and -26 in mouse skin. *Eur J Cell Biol* 65, 152-163

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

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

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

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

Chung CK, Muramatsu T, Uekusa T, Sasaki H, Shimono M (2007): Inhibition of connexin 43 expression and function in cultured rat dental pulp cells by antisense oligonucleotide. *Cell Tissue Res* 329, 295-300

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

- Czyz J (2008): The stage-specific function of gap junctions during tumorigenesis. *Cell Mol Biol Lett* 13, 92-102
- 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
- de Bono JS, Rowinsky EK (2002): The ErbB receptor family: a therapeutic target for cancer. *Trends Mol Med* 8, S19-26
- Egger G: Die akute Entzündung: Grundlagen, Pathophysiologie und klinische Erscheinungsbilder der Unspezifischen Immunität 1.Auflage; Springer-Verlag GmbH, Wien 2005
- Eghbali B, Kessler JA, Spray DC (1990): Expression of gap junction channels in communication-incompetent cells after stable transfection with cDNA encoding connexin 32. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 1328-1331
- Eghbali B, Kessler JA, Reid LM, Roy C, Spray DC (1991): Involvement of gap junctions in tumorigenesis: transfection of tumor cells with connexin 32 cDNA retards growth in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 10701-10705
- Elfgang C, Eckert R, Lichtenberg-Frate H, Butterweck A, Traub O, Klein RA, Hulser DF, Willecke K (1995): Specific permeability and selective formation of gap junction channels in connexin-transfected HeLa cells. *J Cell Biol* 129, 805-817
- Elias LA, Wang DD, Kriegstein AR (2007): Gap junction adhesion is necessary for radial migration in the neocortex. *Nature* 448, 901-907
- Evan GI, Littlewood TD (1993): The role of c-myc in cell growth. *Curr Opin Genet Dev* 3, 44-49
- Fakhry C, Gillison ML (2006): Clinical implications of human papillomavirus in head and neck cancers. *J Clin Oncol* 24, 2606-2611
- Fu CT, Bechberger JF, Ozog MA, Perbal B, Naus CC (2004): CCN3 (NOV) interacts with connexin43 in C6 glioma cells: possible mechanism of connexin-mediated growth suppression. *J Biol Chem* 279, 36943-36950
- 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
- Gerido DA, DeRosa AM, Richard G, White TW (2007): Aberrant hemichannel properties of Cx26 mutations causing skin disease and deafness. *Am J Physiol Cell Physiol* 293, C337-345

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

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

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

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

Harbour JW, Dean DC (2000): Rb function in cell-cycle regulation and apoptosis. *Nat Cell Biol* 2, E65-67

Hennemann H, Dahl E, White JB, Schwarz HJ, Lalley PA, Chang S, Nicholson BJ, Willecke K (1992): Two gap junction genes, connexin 31.1 and 30.3, are closely linked on mouse chromosome 4 and preferentially expressed in skin. *J Biol Chem* 267, 17225-17233

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

Hirschi KK, Xu CE, Tsukamoto T, Sager R (1996): Gap junction genes Cx26 and Cx43 individually suppress the cancer phenotype of human mammary carcinoma cells and restore differentiation potential. *Cell Growth Differ* 7, 861-870

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

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

Ionta M, Ferreira RA, Pfister SC, Machado-Santelli GM (2009): Exogenous Cx43 expression decrease cell proliferation rate in rat hepatocarcinoma cells independently of functional gap junction. *Cancer Cell Int* 9, 22

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

Jamieson S, Going JJ, D'Arcy R, George WD (1998): Expression of gap junction proteins connexin 26 and connexin 43 in normal human breast and in breast tumours. *J Pathol* 184, 37-43

Jemal A, Tiwari RC, Murray T, Ghafoor A, Samuels A, Ward E, Feuer EJ, Thun MJ (2004): Cancer statistics, 2004. *CA Cancer J Clin* 54, 8-29

- Jones PA, Baylin SB (2007): The epigenomics of cancer. *Cell* 128, 683-692
- Kallioniemi OP, Kallioniemi A, Kurisu W, Thor A, Chen LC, Smith HS, Waldman FM, Pinkel D, Gray JW (1992): ERBB2 amplification in breast cancer analyzed by fluorescence in situ hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 5321-5325
- Kalra J, Shao Q, Qin H, Thomas T, Alaoui-Jamali MA, Laird DW (2006): Cx26 inhibits breast MDA-MB-435 cell tumorigenic properties by a gap junctional intercellular communication-independent mechanism. *Carcinogenesis* 27, 2528-2537
- Kamei J, Toyofuku T, Hori M (2003): Negative regulation of p21 by beta-catenin/TCF signaling: a novel mechanism by which cell adhesion molecules regulate cell proliferation. *Biochem Biophys Res Commun* 312, 380-387
- 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
- Kapoor P, Saunders MM, Li Z, Zhou Z, Sheaffer N, Kunze EL, Samant RS, Welch DR, Donahue HJ (2004): Breast cancer metastatic potential: correlation with increased heterotypic gap junctional intercellular communication between breast cancer cells and osteoblastic cells. *Int J Cancer* 111, 693-697
- Knudson AG, Jr. (1971): Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 68, 820-823
- Koffler L, Roshong S, Kyu Park I, Cesen-Cummings K, Thompson DC, Dwyer-Nield LD, Rice P, Mamay C, Malkinson AM, Ruch RJ (2000): Growth inhibition in G(1) and altered expression of cyclin D1 and p27(kip-1) after forced connexin expression in lung and liver carcinoma cells. *J Cell Biochem* 79, 347-354
- Kotwall C, Sako K, Razack MS, Rao U, Bakamjian V, Shedd DP (1987): Metastatic patterns in squamous cell cancer of the head and neck. *Am J Surg* 154, 439-442
- Koval M, Geist ST, Westphale EM, Kemendy AE, Civitelli R, Beyer EC, Steinberg TH (1995): Transfected connexin45 alters gap junction permeability in cells expressing endogenous connexin43. *J Cell Biol* 130, 987-995

Krutovskikh VA, Troyanovsky SM, Piccoli C, Tsuda H, Asamoto M, Yamasaki H (2000): Differential effect of subcellular localization of communication impairing gap junction protein connexin43 on tumor cell growth in vivo. *Oncogene* 19, 505-513

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

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

Lecanda F, Towler DA, Ziambaras K, Cheng SL, Koval M, Steinberg TH, Civitelli R (1998): Gap junctional communication modulates gene expression in osteoblastic cells. *Mol Biol Cell* 9, 2249-2258

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

Leithe E, Sirnes S, Omori Y, Rivedal E (2006): Downregulation of gap junctions in cancer cells. *Crit Rev Oncog* 12, 225-256

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

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

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

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

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

Lumerman H, Freedman P, Kerpel S (1995): Oral epithelial dysplasia and the development of invasive squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 79, 321-329

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

Masgrau-Peya E, Salomon D, Saurat JH, Meda P (1997): In vivo modulation of connexins 43 and 26 of human epidermis by topical retinoic acid treatment. *J Histochem Cytochem* 45, 1207-1215

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

Mesnil M, Krutovskikh V, Piccoli C, Elfgang C, Traub O, Willecke K, Yamasaki H (1995): Negative growth control of HeLa cells by connexin genes: connexin species specificity. *Cancer Res* 55, 629-639

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

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

Moorby C, Patel M (2001): Dual functions for connexins: Cx43 regulates growth independently of gap junction formation. *Exp Cell Res* 271, 238-248

Naus CC, Bechberger JF, Caveney S, Wilson JX (1991): Expression of gap junction genes in astrocytes and C6 glioma cells. *Neurosci Lett* 126, 33-36

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

Olbina G, Eckhart W (2003): Mutations in the second extracellular region of connexin 43 prevent localization to the plasma membrane, but do not affect its ability to suppress cell growth. *Mol Cancer Res* 1, 690-700

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

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

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

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

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

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

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

Princen F, Robe P, Gros D, Jarry-Guichard T, Gielen J, Merville MP, Bours V (2001): Rat gap junction connexin-30 inhibits proliferation of glioma cell lines. *Carcinogenesis* 22, 507-513

Qin H, Shao Q, Curtis H, Galipeau J, Belliveau DJ, Wang T, Alaoui-Jamali MA, Laird DW (2002): Retroviral delivery of connexin genes to human breast tumor cells inhibits in vivo tumor growth by a mechanism that is independent of significant gap junctional intercellular communication. *J Biol Chem* 277, 29132-29138

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

Reaume AG, de Sousa PA, Kulkarni S, Langille BL, Zhu D, Davies TC, Juneja SC, Kidder GM, Rossant J (1995): Cardiac malformation in neonatal mice lacking connexin43. *Science* 267, 1831-1834

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

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

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

Saez JC, Connor JA, Spray DC, Bennett MV (1989): Hepatocyte gap junctions are permeable to the second messenger, inositol 1,4,5-trisphosphate, and to calcium ions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 2708-2712

Saunders MM, Seraj MJ, Li Z, Zhou Z, Winter CR, Welch DR, Donahue HJ (2001): Breast cancer metastatic potential correlates with a breakdown in homospecific and heterospecific gap junctional intercellular communication. *Cancer Res* 61, 1765-1767

Schmidt VJ, Wolfle SE, Boettcher M, de Wit C (2008): Gap junctions synchronize vascular tone within the microcirculation. *Pharmacol Rep* 60, 68-74

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

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

Schneider B, Teschner M, Sudermann T, Pikula B, Lautermann J (2002): Expression of gap junction proteins (connexin 26, 30, 32, 43) in normal mucosa, hyperkeratosis and carcinoma of the human larynx. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 64, 324-329

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

Strachan T, Read AP: *Molekulare Humangenetik*. 3. Auflage; Elsevier GmbH, München 2005

Taberner A, Sanchez-Alvarez R, Medina JM (2006): Increased levels of cyclins D1 and D3 after inhibition of gap junctional communication in astrocytes. *J Neurochem* 96, 973-982

Trosko JE, Chang CC, Upham BL, Tai MH (2004): Ignored hallmarks of carcinogenesis: stem cells and cell-cell communication. *Ann N Y Acad Sci* 1028, 192-201

Tsai WC, Tsai ST, Ko JY, Jin YT, Li C, Huang W, Young KC, Lai MD, Liu HS, Wu LW (2004): The mRNA profile of genes in betel quid chewing oral cancer patients. *Oral Oncol* 40, 418-426

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

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

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

Weiß C: *Basiswissen Medizinische Statistik*. 4.Auflage; Springer-Verlag GmbH, Berlin 2008

White TW, Paul DL, Goodenough DA, Bruzzone R (1995): Functional analysis of selective interactions among rodent connexins. *Mol Biol Cell* 6, 459-470

- Wiest T, Schwarz E, Enders C, Flechtenmacher C, Bosch FX (2002): Involvement of intact HPV16 E6/E7 gene expression in head and neck cancers with unaltered p53 status and perturbed pRb cell cycle control. *Oncogene* 21, 1510-1517
- 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
- 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
- Wright JK, Dunk CE, Perkins JE, Winterhager E, Kingdom JC, Lye SJ (2006): EGF modulates trophoblast migration through regulation of Connexin 40. *Placenta* 27 Suppl A, S114-121
- 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 HT, Li QC, Zhang YX, Zhao Y, Liu Y, Yang ZQ, Wang EH (2008): Connexin 43 recruits E-cadherin expression and inhibits the malignant behaviour of lung cancer cells. *Folia Histochem Cytobiol* 46, 315-321
- Xu X, Francis R, Wei CJ, Linask KL, Lo CW (2006): Connexin 43-mediated modulation of polarized cell movement and the directional migration of cardiac neural crest cells. *Development* 133, 3629-3639
- Yamada KA, Rogers JG, Sundset R, Steinberg TH, Saffitz JE (2003): Up-regulation of connexin45 in heart failure. *J Cardiovasc Electrophysiol* 14, 1205-1212
- Yamasaki H, Omori Y, Krutovskikh V, Zhu W, Mironov N, Yamakage K, Mesnil M (1999): Connexins in tumour suppression and cancer therapy. *Novartis Found Symp* 219, 241-254; discussion 254-260

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

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

Zhang W, Nwagwu C, Le DM, Yong VW, Song H, Couldwell WT (2003b): Increased invasive capacity of connexin43-overexpressing malignant glioma cells. *J Neurosurg* 99, 1039-1046

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

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

Zhang YW, Nakayama K, Morita I (2003b): A novel route for connexin 43 to inhibit cell proliferation: negative regulation of S-phase kinase-associated protein (Skp 2). *Cancer Res* 63, 1623-1630

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

Zuker M (2003): Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res* 31, 3406-3415

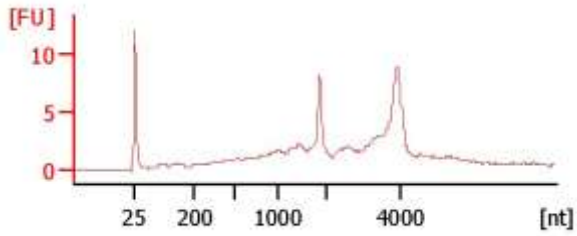
7 Anhang

7.1 Patientenkollektiv

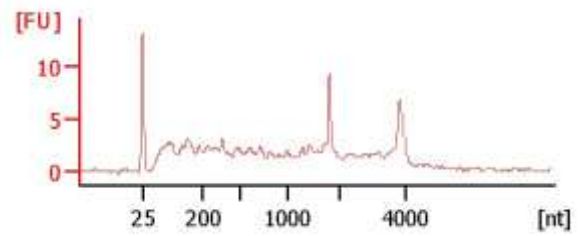
Patient	Geschlecht	Geburtsdatum	T	N	AJCC-Stadium	Grading	Tabakkonsum	Alkoholkonsum
1	Männlich	01.04.45	4 A	2 C	4	2	Ja	Ja
2	Männlich	25.12.45	2	0	2	2	Ja	Ja
3	Männlich	07.08.53	2	0	2	1	Ja	Ja
4	Weiblich	02.04.44	4	0	4	2	Ja	Nein
5	Weiblich	17.09.27	4	0	4	2	Nein	Nein
6	Männlich	16.12.66	4	1	4	2	Ja	Ja
7	Männlich	29.07.57	4	2 B	4	3	Ja	Ja
8	Männlich	16.06.56	4	1	4	2	Ja	Ja
9	Männlich	20.02.62	4	2 B	4	2	Ja	Ja
10	Männlich	18.10.75	2	0	2	2	Ja	Nein
11	weiblich	23.07.48	4	0	4	3	Ja	Ja
12	Weiblich	22.08.44	Cis	0	0	1	Ja	Ja
13	Weiblich	18.03.51	2	0	2	2	Ja	Nein
14	Männlich	04.01.40	4	1	4	2	Ja	Ja
15	männlich	03.12.29	2	0	2	2	ja	nein

Patientencharakteristik: Fernmetastasen sowie neoadjuvante Radio-bzw. Chemotherapie waren Ausschlusskriterien

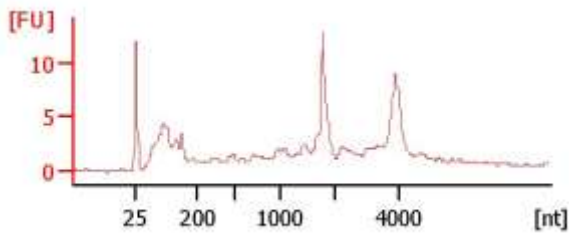
7.2 Qualitätskontrolle der analysierten RNA



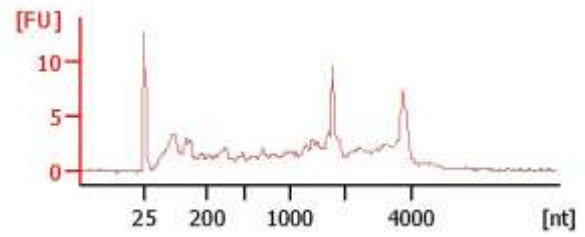
S1



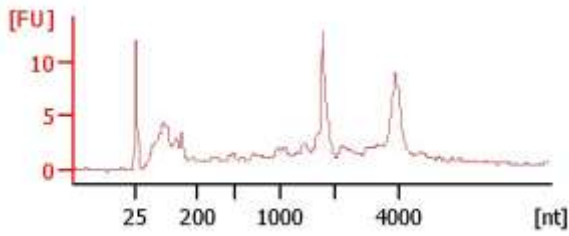
T1



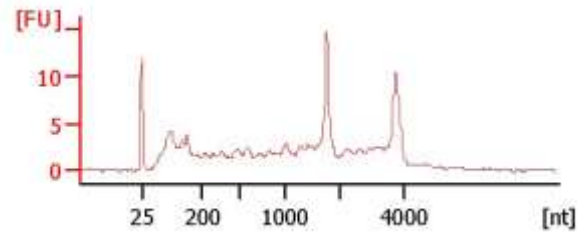
S5



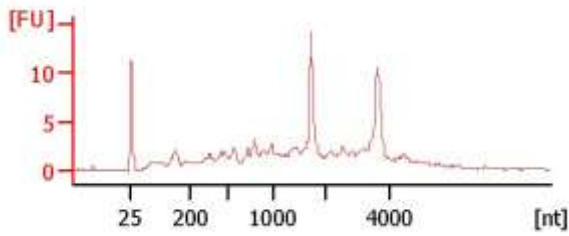
T5



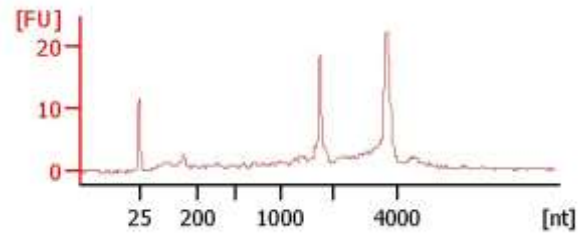
S6



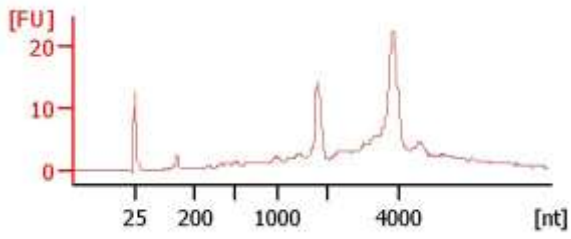
T6



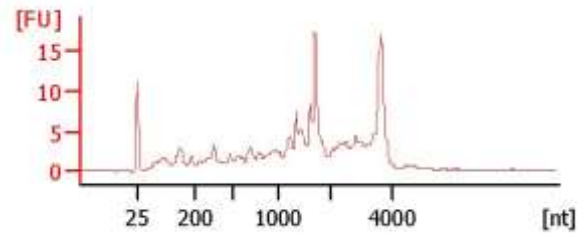
S7



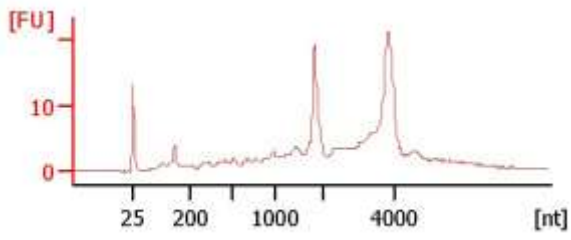
T7



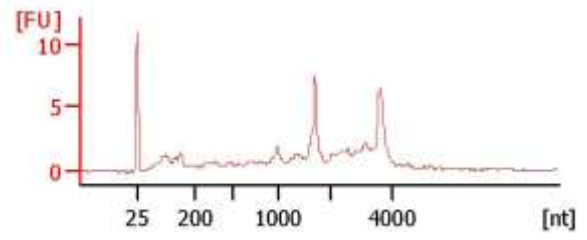
S8



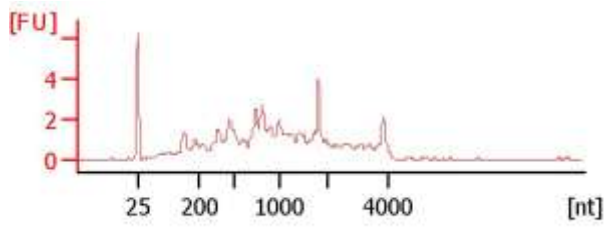
T8



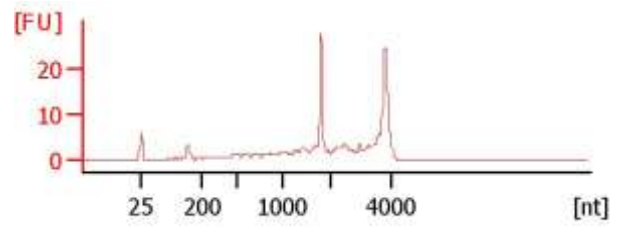
S9



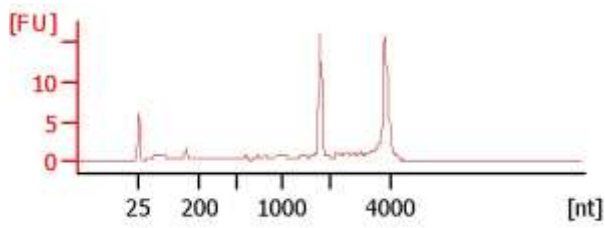
T9



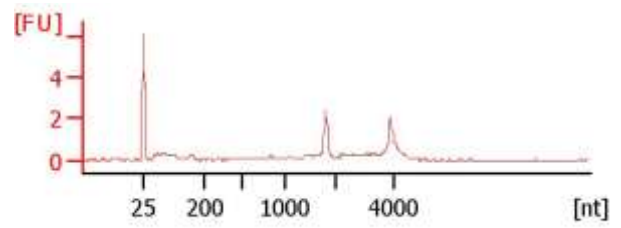
S11



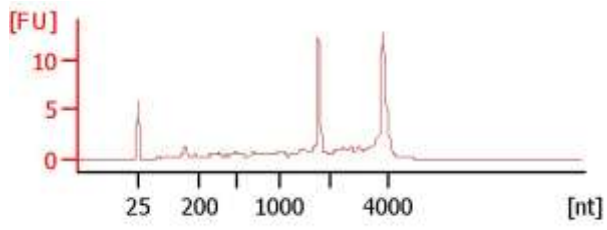
T11



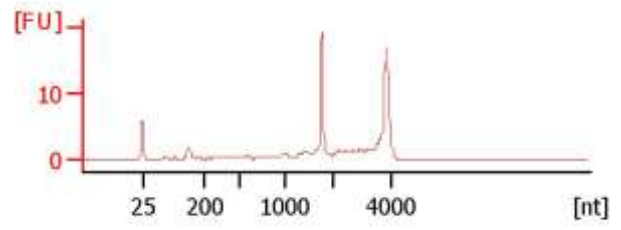
S12



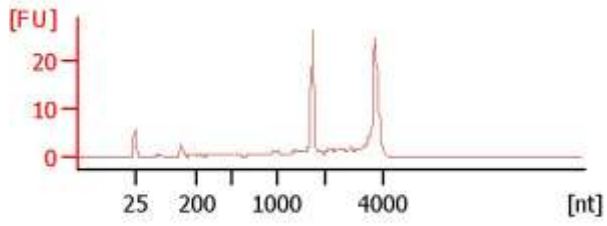
T12



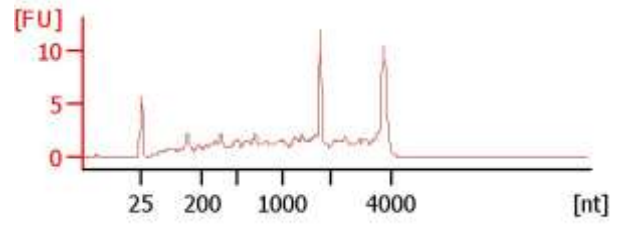
S13



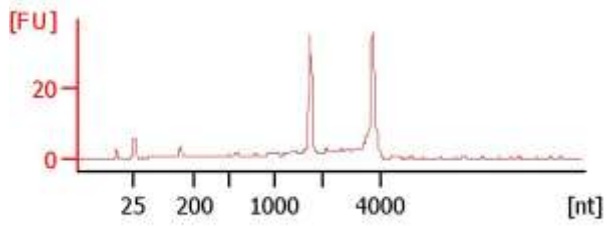
T13



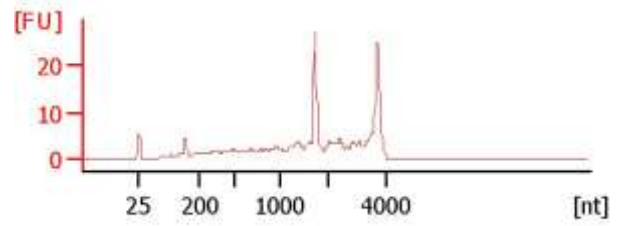
S14



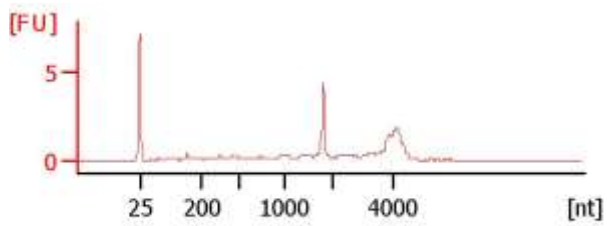
T14



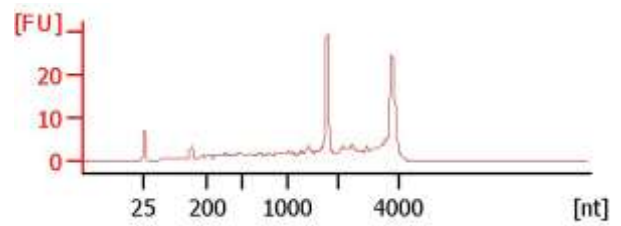
S16



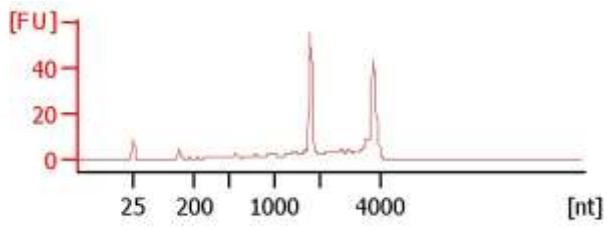
T16



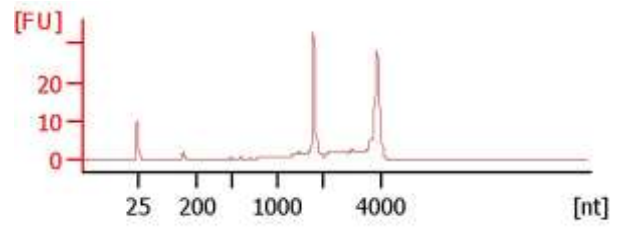
S18



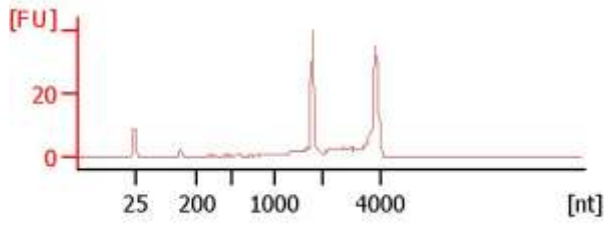
T18



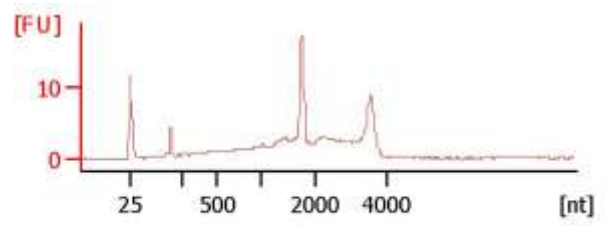
S21



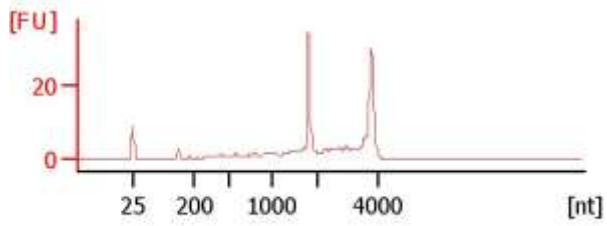
T21



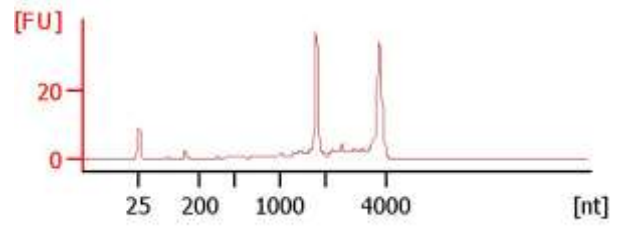
S22



T22



S23



T23

7.3 Primercharakteristik

Gen	Primerausrichtung und -sequenz		Umspannte Produktlänge
Cx26	Fwd	5' - ACTCCACCAGCATTGGAAAG - 3'	172 Basenpaare
	Rev	5' - TGGGAGATGGGGAAGTAGTG - 3'	
Cx30	Fwd	5' - AGGGATCTTGCCCTCATTCT - 3'	235 Basenpaare
	Rev	5' - GCAGACGAAGTCCTCTTGCT - 3'	
Cx30.3	Fwd	5' - TCTGGCTGTCTGTGGTGTTC - 3'	188 Basenpaare
	Rev	5' - CGTGACCAGGATGAGCTGTA - 3'	
Cx31	Fwd	5' - ACACAACAGCAGCACAGAGG - 3'	228 Basenpaare
	Rev	5' - TTCCACTGAGCCAAGTGATG - 3'	
Cx31.1	Fwd	5' - CCTGAGTGGGGTCAACAAGT - 3'	192 Basenpaare
	Rev	5' - TGGGACACAGGGAAGAACTC - 3'	
Cx40	Fwd	5' - TAGGCAAGGTCTGGCTCACT - 3'	186 Basenpaare
	Rev	5' - TGATCTGCAGCACCCAGTAG - 3'	
Cx43	Fwd	5' - AGCAGTCTGCCTTTCGTTGT - 3'	246 Basenpaare
	Rev	5' - TCTGCTTCAAGTGCATGTCC - 3'	
Cx45	Fwd	5' - GCACTGCCAGTAGCAAATCA - 3'	165 Basenpaare
	Rev	5' - CCAACAGCATCCCTGAAGAT - 3'	
GAPDH	Fwd	5' - GAGTCAACGGATTTGGTCGT - 3'	185 Basenpaare
	Rev	5' - GACAAGCTTCCCGTTCTCAG - 3'	
Primercharakteristik: Liste der zur Genexpressionsanalyse verwendeten Primer			

Danksagungen

Herrn Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Franz-Josef Kramer möchte ich dafür danken, dieses spannende Promotionsthema sowie die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten humanen Proben überlassen bekommen zu haben.

Herrn Dr. med. Dr. med. dent. Florian Fialka danke ich für die exzellente Betreuung, die molekularbiologische Einarbeitung und die Hilfestellungen bei Patientenauswahl und Selektion der zu untersuchenden Gene. Weiterhin danke ich ihm für seine immerwährende Erreichbarkeit, seine stetige Bereitschaft zur Diskussion sowie für seine konstruktive Kritik, ohne die diese Arbeit nicht entstanden wäre.

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

Meiner Schwägerin Petra Brodmann danke ich für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Lebenslauf

Am 14.08.1983 wurde ich in Leinefelde als vierter Sohn von Erich Brodmann, Bauingenieur, und Margitta Brodmann, Postbeamtin, geboren. Ich besuchte von 1990 bis 1994 die Konrad-Hentrich-Grundschule in Leinefelde und anschließend von 1994 bis 2002 das Gottfried-Wilhelm-Leibniz-Gymnasium in Leinefelde. Meine Abitursprüfung legte ich im Juni 2002 mit dem Ergebnis 1,4 ab. Da ich als vierter Sohn meiner Eltern nach Wehrpflichtgesetz §11 Abs.2, Satz 3 von meiner Wehrpflicht befreit wurde, begann ich im Oktober 2002 das Studium der Zahnheilkunde in Göttingen. Die zahnärztliche Vorprüfung absolvierte ich im März 2005 mit der Note 1,7. Im Dezember 2007 beendete ich mit dem Gesamtergebnis „gut“ und im Alter von 24 Jahren mein Studium der Zahnheilkunde. Ab Januar 2008 war ich in der Zahnarztpraxis Bernhard Erzberger in Göttingen als zahnärztlicher Ausbildungsassistent tätig, und begann mit den Vorarbeiten der hier vorliegenden Promotionsarbeit. Nach einem Wechsel in die Zahnarztpraxis Dr. Jürgen Wenzel, Göttingen, schloss ich meine Assistenzarztzeit im Dezember 2009 ab. Im September 2010 schied ich auf eigenen Wunsch aus der Praxis aus, um diese Dissertationsarbeit zu beenden, und anschließend in Nürnberg eine drei jährige Weiterbildung zum Oralchirurgen zu absolvieren..