

**Modulation Gap Junction vermittelter
Zell-Zell-Kommunikation durch parakrin
wirkenden Transformierenden Wachstumsfaktor $\beta 1$ (TGF $\beta 1$):
Rolle in der Tumor-Stroma-Interaktion**

Inaugural-Dissertation
zur

Erlangung des Doktorgrades der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Dominik Stuhlmann

aus Düsseldorf

**Düsseldorf
2004**

**Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf**

Referent: PD Dr. Peter Brenneisen

Koreferent: Prof. Dr. Joachim Ernst

Tag der mündl. Prüfung: 21. Juli 2004

Abkürzungen

A375	Melanomzellen der Linie A375
A431	Plattenepithelkarzinomzellen der Linie SCL1
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosin-triphosphat
bp	Basenpaare
DMEM	Eagle´s Medium, nach Dubblecco´s Modifikation
DMSO	Dimethylsulfoxid
EZM	extrazelluläre Matrix
ER	endoplasmatisches Retikulum
FCS	fötales Kälberserum
HaCat	immortalisierte Keratinozyten
HDF	humane dermale Fibroblasten
MF	Myofibroblast
mM	mMol/L
mm	Millimeter
nM	nmol/L
MMP	Matrix-Metalloproteinase
nm	Nanometer
µm	Mikrometer
µM	µmol/L
pM	pmol/L
rpm	Rotationen pro Minute
s.	siehe
SCL1	Plattenepithelkarzinomzellen der Linie SCL1
Tab.	Tabelle
TBS	Tris-gepufferte isotonische Salzlösung
TBST	Tris-gepufferte isotonische Salzlösung mit 0,1% (v/v) TritonX100
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine
(v/v)	Volumenprozent
(w/v)	Gewichtsprozent
ZZK	Zell-Zell-Kommunikation

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung und Fragestellung	6
1.1 Einleitung	6
1.1.1 Gap Junctions	6
1.1.1.2 Aufbau und Funktion von Gap Junction-Kanälen	6
1.1.1.3 Bildung und Abbau von Gap Junction-Kanälen	9
1.1.1.4 Posttranslationale Modifikationen der Connexine	10
1.1.1.5 Permeabilität und Modell des Öffnung- & Schließ-Mechanismus von Gap Junction-Kanälen	11
1.1.1.6 Vielfältigkeit von Gap Junctions und ihre dominanten Effekte	12
1.1.1.7 Connexinexpression in der Haut	13
1.1.2 Aufbau und Funktion der menschlichen Haut	15
1.1.3 Mechanismen der malignen Progression	17
1.1.4 Das Plattenepithelkarzinom	21
1.1.5 ZZK und Karzinogenese	22
1.2 Fragestellung	25
2 Material und Methoden	26
2.1 Charakteristika der verwendeten Zelllinien	26
2.2 Isolation von Keratinozyten aus Biopsien	27
2.3 Isolation von Fibroblasten aus Biopsien	27
2.4 Stammhaltung und Anzucht der Zellen	28
2.5 Kryokonservierung und Revitalisierung von Zellen	28
2.6 Gewinnen der Überstände	29
2.7 Mykoplasmentest	29
2.8 Vitalitätsbestimmung von Zellen	30
2.9 Allgemeine Versuchsbedingungen	31
2.10 Kommunikationsassay (Mikroinjektion)	32
2.11 Kommunikationsassay („scrape loading“)	32
2.12 Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	33

2.13 Immunologischer Nachweis (Western-Blot)	35
2.14 Immunhistochemischer Nachweis	36
2.15 Proteinbestimmung	36
2.16 Quantifizierung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) mittels Epifluoreszenz	37
2.17 Quantifizierung von freiem, zellulären Calcium mittels Epifluoreszenz	37
2.18 RT-PCR	38
2.19 Agarose-Gelelektrophorese	40
2.20 Invasionsassay	41
3 Ergebnisse	42
3.1 Detektierbarkeit von Connexin43 in sekundären Hautfibroblasten, sekundären Keratinozyten sowie SCL1-Plattenepitheltumorzellen	42
3.2 Immunzytochemische Darstellung von kokultivierten Fibroblasten und SCL1-Zellen	44
3.3 Tumorzell-abhängige Verminderung der ZZK von Fibroblasten in der Kokultur	46
3.4 Die homologe ZZK von Hautfibroblasten wird durch einen parakrin wirkenden, von SCL1- Zellen sezernierten Faktor erniedrigt	47
3.5 Tumorzell-abhängige Verminderung der homologen ZZK von Fibroblasten im 3D-Dermisäquivalent	48
3.6 Zeitabhängige Wirkung der Tumorzellüberstände auf die homologe ZZK der Fibroblasten	49
3.7 Die Wirkung der SCL1-Überstände ist reversibel	51
3.8 Maligne Hautzellen vermindern die homologe ZZK von Fibroblasten	52
3.9 Transkriptionell, translational und posttranslational unabhängige Verminderung der homologen ZZK von Fibroblasten	53
3.10 Calcium-abhängige Verminderung der homologen ZZK von Fibroblasten	57
3.11 Reaktive Sauerstoffspezies (ROS)-abhängige Verminderung der homologen ZZK von Fibroblasten	60
3.12 Identifikation von Tumorzellen sezernierten TGFβ1 als Verursacher der Verminderung der homologen ZZK von Fibroblasten	64
3.14 TGFβ1 abhängige Transdifferenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten und deren positiver Einfluss auf die Invasionskapazität von Tumorzellen	69
4 Diskussion	72
5 Perspektiven	81
6 Zusammenfassung	82

1 Einleitung und Fragestellung

1.1 Einleitung

1.1.1 Gap Junctions

Als im Verlaufe der Evolution aus Einzellern mehrzellige Organismen wurden, mussten diese eine Reihe von Anpassungen realisieren, die die Kooperation der Einzelzellen des Organismus gewährleisten.

Es entstanden sogenannte „Junctions“; Zellverbindungen, die in drei Subtypen unterteilt werden:

1. undurchlässige Verbindungen - Tight Junctions
2. Haftverbindungen - Adhensionsverbindungen, Desmosomen
3. kommunizierende Verbindungen - Gap Junctions

Dabei stellen Gap Junctions eine der häufigsten Zellverbindungen dar, die von der Embryogenese bis zur Koordination adulter Gewebe eine wesentliche Rolle spielen.

1.1.1.2 Aufbau und Funktion von Gap Junction-Kanälen

Die Erkenntnis, dass die Zellen mehrzelliger Organismen mit ihren Nachbarzellen direkt und indirekt interagieren und zwischen ihnen ein Stoffaustausch stattfindet ist lange bekannt. Anfänglich konnte nur bei Herzmuskelzellen (1-3) und bei Neuronen (4-6) ein Ionenfluss, also eine elektrische Kopplung zwischen den Zellen nachgewiesen werden. Später wurde auch in nicht erregbaren Zelltypen eine metabolische Kopplung, also der Austausch größerer Metabolite (7,8) und der Austausch von Tracer-Farbstoffen (9) beobachtet. Die für elektrische Kopplung verantwortlichen Strukturen wurden elektronenmikroskopisch als 2-3 nm kleine Verengung des interzellulären Spalts zwischen den Membranen (engl.; gap) als lokale,

plaqueähnliche Region nachgewiesen (10). Später wurden durch Gefrierbruchtechniken innere Membranstrukturen von Gap Junction-Plaques gezeigt (11,12). Diese elektronenmikroskopischen Ergebnisse führten zu dem noch heute im Wesentlichen gültigen Modell der Gap Junctions

Gap Junctions sind Anhäufungen von Transmembrankanälen, die die Zytoplasmen benachbarter Zellen direkt verbinden. Dabei stellt jede Zelle jeweils Halbkanäle (Connexone) zur Verfügung, die aneinander andocken, und gemeinsam den vollständigen Kanal bilden. Ein Connexon hat einen Außendurchmesser von ca. 7-8 nm und ragt 1 nm über die Zellmembran in den Interzellularraum hinaus (13). Jeder Halbkanal ist ein Hexamer aus konzentrisch angeordneten Connexin-Proteinen. Das Connexon ist in der Aufsicht rosettenförmig (14). Im geöffneten Zustand beträgt der Durchmesser eines Gap Junction-Kanals 1 bis 1,5 nm (15-17)

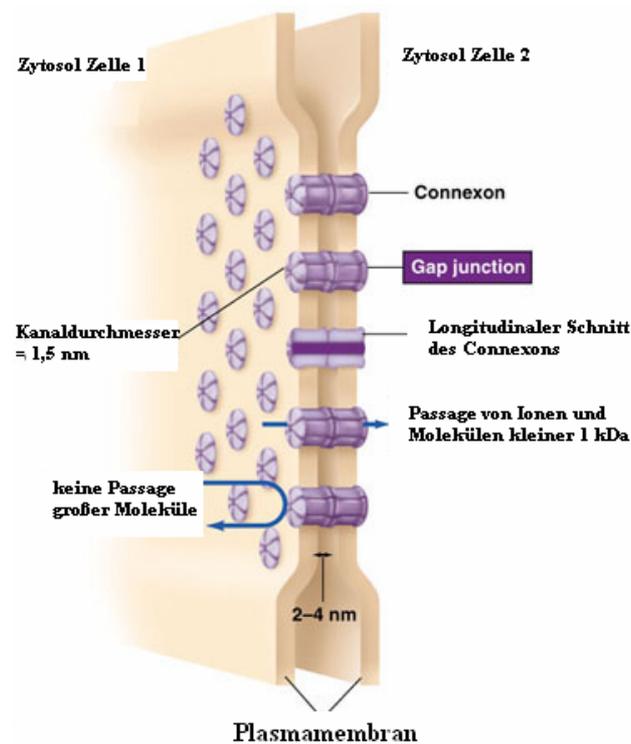


Abb.1
Darstellung von Gap Junctions (Quelle: Internet, Neuronal Physiology, Colorado, verändert)
<http://www.colorado.edu/epob/epob1220lynch/image/figure3k.jpg>

Studien über 3D-Strukturen der Gap Junction-Kanäle aus Connexin43 zeigen, dass diese einen Außendurchmesser von 6-7 nm und einen Öffnungsdurchmesser von ca. 4 nm haben (18). Die zentrale Pore verengt sich in der Nähe des Membranaustritts in den extrazellulären Spalt auf 1-1,5 nm, und weitet sich dann wieder im Kontaktbereich der Halbkanäle zu ca. 2 nm. Die Länge eines Halbkanals beträgt 8,5-12,5 nm. Er ragt 1,5-6 nm in das Zytoplasma und

zu 1,5-2 nm in den extrazellulären Raum hinein. Es wurde weiterhin gezeigt, dass die Connexinuntereinheiten der beiden Connexone nicht direkt aufeinander liegen, sondern die Halbkanäle jeweils um 30° gedreht zueinander ausgerichtet sind, so dass eine Connexinuntereinheit jeweils mit zwei gegenüberliegenden Untereinheiten interagiert (19,20). In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass Gap Junction ähnliche Strukturen in fast allen festen Geweben von fast allen mehrzelligen Tieren, von Ciliaten bis zum Menschen, zu finden waren (21,22). Es scheint, dass Gap Junction-Kanäle eine Voraussetzung für mehrzelliges Leben sind. Gap Junction-Kanäle sind nicht nur für kleine Ionen, sondern auch für größere Moleküle mit einem Molekulargewicht von bis zu ca. 1000 Dalton durchlässig. Dies ermöglicht den interzellulären Austausch von Aminosäuren, Zuckern und Nukleotiden, sowie sekundären Botenstoffen wie cAMP, IP3 oder Ca²⁺-Ionen (24,25). Aufgrund dieser Fähigkeit spielen Gap Junctions eine wichtige Rolle zur Homöostase in Geweben und erfüllen vielfältige physiologische Aufgaben. In elektrischen Synapsen von Neuronen werden die elektrischen Signale von Gap Junctions übertragen (26), so dass sie die schnelle Weiterleitung elektrischer Signale im Herzmuskel und damit die koordinierte Herzkontraktion ermöglichen (27). Im peripheren Nervensystem wird der Austausch von Nährstoffen zwischen den Myelinscheideschichten einer Schwannschen Zelle ausschließlich durch Gap Junctions vermittelt.

Während Gap Junctions dem Nährstoffaustausch zwischen peripheren Zellen und dem unterversorgten Zentrum in schwach durchbluteten Geweben wie der Linse oder dem Knorpel dienen (28), helfen sie in Drüsen wie dem Pankreas bei der Koordination von Zellen bei der Sekretion (29). Gap Junctions spielen ebenfalls eine wichtige Rolle während der Embryogenese. Schon früh wurden ionische und Farbstoff-Kopplung in Embryos festgestellt. andererseits werden im früheren Maus-Embryo keine ionische Kopplung zwischen den extraembryonalen Geweben und Embryo detektiert (30,31). Die Kopplung ist auf Embryo-Kompartimente begrenzt, um damit die regulierte Entwicklung des Embryos in verschiedenen Phänotypen zu gewährleisten. Außerdem wird den Gap Junctions eine Bedeutung bei der Wachstumskontrolle und damit auch in der Tumorgenese zugeschrieben (32,33).

1.1.1.3 Bildung und Abbau von Gap Junction-Kanälen

Connexine werden nicht als Monomere zur Zellmembran transportiert, sondern vor dem Transport zu Hexameren oligomerisiert (34). Mit Proteintransportinhibitoren wurde untersucht, wo diese Oligomerisierung stattfindet. Es konnte gezeigt werden, dass die Connexine nach der Synthese durch das endoplasmatische Reticulum (ER) und den Golgi-Apparat transportiert werden und im trans-Golgi-Netzwerk zu Halbkanälen oligomerisieren. Andere Untersuchungen haben dagegen gezeigt, dass Connexine schon im ER oligomerisiert werden können (35,36). Es gibt auch Hinweise darauf, dass die Oligomerisierung von Connexinen im ER beginnt und im trans-Golgi-Netzwerk beendet wird (37,38). Im trans-Golgi-Kompartiment werden die Connexone in Vesikel verpackt und anschließend zur Plasmamembran transportiert. Die einzige bekannte Ausnahme ist Connexin26, das mit einem alternativen Weg vom ER über die Mikrotubuli direkt zur Zellmembran geführt wird (39). Die Connexone werden durch Vesikelfusion in die Zellmembran eingebracht und bilden dort einen Pool frei diffundierender Halbkanäle, die in einen Gap Junction-Plaques einwandern und mit einem Halbkanal einer Nachbarzelle zu einem kompletten Gap Junction-Kanal fusionieren können.

Gap Junction-Plaques sind sehr dynamische Strukturen, die einem permanenten Umbau unterliegen, wobei die Kanäle und Connexine über Vesikel aus den Plaques entnommen und dem Abbau zugeführt werden (40). Während die Halbwertszeit von Cx43 in Cardiomyozyten- und Nieren-Zellen der Ratte 1-2,5 Stunden beträgt (41,42), wurde für Cx32 und Cx26 in kultivierten Maus Hepatozyten 1,3 bis 3 Stunden gemessen (43,44). Sowohl proteasomaler wie lysosomaler Abbau wurde beschrieben. Die Beteiligung des Lysosoms bei der Degradation von Connexinen wurde in verschiedenen Zelltypen gezeigt (45-47). Andererseits wurde festgestellt, dass chemische Proteasominhibitoren Connexin43 in der Zelle akkumulieren lassen und die Halbwertszeit von Cx43 in Gewebekulturzellen verlängern (48). Laing und Mitarbeiter konnten weiterhin zeigen, dass die Degradation von Cx43 in CHO-Zellen durch das thermolabile Ubiquitin-aktivierende Enzym beeinträchtigt wird. Eine neuere Studie zeigte, dass die Degradation des Cx43-Proteins in verschiedenen Zelltypen durch Proteasomen-Inhibitoren reduziert werden kann (49). Bei der Degradation von Connexinen scheint zudem Phosphorylierung eine Rolle zu spielen. Es wurde festgestellt, dass Mutanten von Cx45 und Cx31, bei denen gezielt phosphorylierbare Serinreste ausgetauscht worden waren, schneller abgebaut werden als das Wildtyp-Protein (50,51).

1.1.1.4 Posttranslationale Modifikationen der Connexine

Schon früh konnte nachgewiesen werden, dass Connexin32 in primären Maushepatocyten als phosphoryliertes Protein vorliegt (52-55). Nachdem die Connexingene nach und nach kloniert und sequenziert wurden, wurde angenommen, dass Connexine generell Phosphoproteine seien. Aber alle Versuche, phosphoryliertes Connexin26 aus den Hepatozyten zu isolieren, schlugen fehl (56,57). Phosphoryliertes Connexin43 wurde als Protein in verschiedenen Geweben, wie in Fibroblasten der Wühlmaus (58), in der Linse von Hühnern (59,60) und anderen Zellen (61-66) identifiziert, wobei phosphoryliertes Cx43 durch einen Shift des Molekulargewichts auf dem SDS-Polyacrylamidgel deutlich zu erkennen war und im Allgemeinen drei Banden zeigt. Dieses Phänomen wurde für Cx32 (67-69), Cx46 (70), oder Cx45 (71) nicht beobachtet. Der Grund der molekularen Verschiebung ist noch ungeklärt, möglicherweise beruht sich auf einer Konformationsänderung des phosphorylierten Cx43.

An der Phosphorylierung der verschiedenen Connexine sind unterschiedliche Proteinkinasen beteiligt. Cx32 kann von der cAMP-abhängigen Proteinkinase an der Sequenz Lys²³⁰-Arg-Gly-Ser²³³ C-terminal phosphoryliert werden (72). In Rattenhepatozyten stimuliert Norepinephrin, ein indirekter Aktivator der Proteinkinase C die Phosphorylierung von Cx32, während Staurosporin, ein Proteinkinase C-Inhibitor diesen Effekt inhibierte (73). Weiterhin wurde festgestellt, dass das aus Leber isolierte Cx32 von der Ca²⁺/Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II (74) phosphoryliert werden kann. Eine erhöhte Phosphorylierung des Cx43-Proteins wurde nach der Behandlung mit TPA (12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat), einem Aktivator der PKC, in unterschiedlichen Zelltypen beobachtet (78-84). In diesen Zellen war die unphosphorylierte Isoform von Cx43 dominant und es wurde nur durch die Aktivierung der Proteinkinase C phosphoryliert. Die Konsensussequenz der Proteinkinase C wurde auf den Serinresten 368 und 372 lokalisiert (85). Außerdem wurde gezeigt, dass der Epidermale Wachstumsfaktor die Phosphorylierung des Cx43 an den Serinresten erhöht (86). Diese erhöhte Phosphorylierung war unabhängig von der TPA-sensitiven Proteinkinase C, jedoch in diesem Fall wurde Cx43 durch eine Mitogen abhängige Proteinkinase (MAP-Kinase) an den Positionen der Serinreste Ser279 und Ser282 phosphoryliert, wodurch die Kommunikation über Gap Junctions gehemmt wurde (87). Es wurde gezeigt, dass außer der Proteinkinase C und MAP-Kinase Cx43 von p34^{cdc2}-Kinase phosphoryliert wird, die in die Zellzykluskontrolle involviert ist (88,89). Schließlich wurde festgestellt, dass das virale Onkogen-Protein, pp60^{v-src} die Phosphorylierung von Cx43 am Tyrosin-Rest 265 induziert (90-92). Andererseits induzierte pp60^{v-src} keine Phosphorylierung bei Cx32 (93). Die funktionelle Rolle der

Phosphorylierung ist noch weitgehend umstritten. Es wurde gezeigt, dass die Phosphorylierung des Cx32 aus Hepatozyten bzw. Pankreas Acinarzellen der Ratte sowohl erhöhte als auch reduzierte zelluläre Kommunikation verursacht (94,95). Bei Cx43 wurde festgestellt, dass erhöhte Phosphorylierung an Serin-, bzw. Threonin-Resten zur Reduktion der Gap Junction-Kopplung führte (96-100). Zudem scheint Phosphorylierung bei der Degradation der Connexine eine Rolle zu spielen.

Außer der Phosphorylierung sind Acylierung und Disulfidbrückenbildung andere bekannte posttranslationale Modifikationen. Es wurde gezeigt, dass Palmitinsäure bei der Bildung der Gap Junction-Kanäle aus Connexin32 und Connexin43 beteiligt ist (104,105). Es kann spekuliert werden, dass die Acylierung der Connexine die Verankerung der Proteine und damit die Oligomerisierung der Connexine erleichtern könnte. Außerdem wurden intramolekulare Disulfidbindungen des Cx43 (106,107) und des Cx32 (108) nachgewiesen. Die Konservierung der 6 Cysteinreste, davon 3 auf der extrazellulären Schleife, weist darauf hin, dass die Disulfidbrückenbildung in allen Connexinen vorkommt (109). Darüber hinaus sind weitere posttranslationale Modifikationen wie Protein-Protein-Wechselwirkungen beschrieben worden (153-155).

1.1.1.5 Permeabilität und Modell des Öffnung- und Schließ-Mechanismus von Gap Junction-Kanälen

Die Permeabilität für Ionen und größere Moleküle wie Metabolite und Botenstoffe ist eine der wichtigsten Funktionen von Gap Junctions. Es wurde gezeigt, dass die ermittelte Permeabilität relativ unabhängig von der Größe oder rel. Molekülmasse der Tracer abhängt, wie man es von größenlimitierten Poren erwartet hätte (111,112). Mit einer einheitlichen Klasse von Permeaten (z.B. Tetraalkylammoniumionen) wurde festgestellt, dass die limitierenden Porendurchmesser eine Sequenz von Cx43 > Cx32 > Cx26, Cx40, Cx45 > Cx37 zeigen (113). Durch die Bestimmung der Permeabilität für Fluoreszenzfarbstoffe mit gleicher Größe (114) und gleicher Ladung (115) wurde gezeigt, dass sich keine direkte Korrelation der Eigenschaften des Farbstoffes mit Eigenschaften der Gap Junction-Kanäle beim Farbstofftransfer ergab. Dieses führt zu dem Schluss, dass die Porenwand der Gap Junction-Kanäle mit den Permeaten in eine spezifische Wechselwirkung tritt und dass Gap Junctions sehr spezifisch zwischen bestimmten Metaboliten und Botenstoffen differenzieren. Die Einzelkanalleitfähigkeit kann durch Öffnen und Schließen der Kanäle schnell variiert werden,

was eine feine Regulation der interzellulären Kommunikation durch Gap Junctions (ZZK) erlaubt. Des Weiteren sind Gap Junction-Kanäle spannungsabhängig, wobei die Stärke der Spannungsabhängigkeit vom Connexinotyp abhängig ist (120). Als Mechanismus für die Regulation der Gap Junction-Kanäle werden vorwiegend zwei Modelle diskutiert. Beim „Ball-and-chain“-Modell verschließt der C-Terminus nach Ansäuerung oder Phosphorylierung und darauffolgende intramolekulare Umlagerung den Kanal (121,122). Beim „Irisblenden-Modell“ würde eine Drehung der Connexone zu einer Änderung im Neigungswinkel der Connexine und somit zu einem Verschluss der Pore durch die Transmembrandomänen führen (123,124).

1.1.1.6 Vielfältigkeit von Gap Junctions und ihre dominanten Effekte

Durch verschiedene Kombinationen der Connexine kann eine große Vielfalt unterschiedlicher Gap Junction-Kanälen gebildet werden (s. Abb. 2). Es ist allerdings nicht in allen Fällen möglich, dass Halbkanäle unterschiedlicher Connexinzusammensetzung einen funktionsfähigen heterotypischen Gap Junction-Kanal bilden. In Oocytenpaaren von *Xenopus laevis* konnte durch Injektion der Cx26- und Cx32-cRNA oder Cx37- und Cx40-cRNA die Bildung heterotypischer Kanäle nachgewiesen werden (125,126). Eine besondere Stellung nimmt dabei Cx31 ein, da es als einziges bisher bekanntes Connexin nur homotypische Kanäle ausbilden kann. Bei der Untersuchung von Cx45 und seiner Deletionsmutante wurde festgestellt, dass die defekte Funktion der mutierten Connexone durch Bildung der heterotypischen Kanäle mit Cx45-Wildtyp aufgehoben wurde (130).

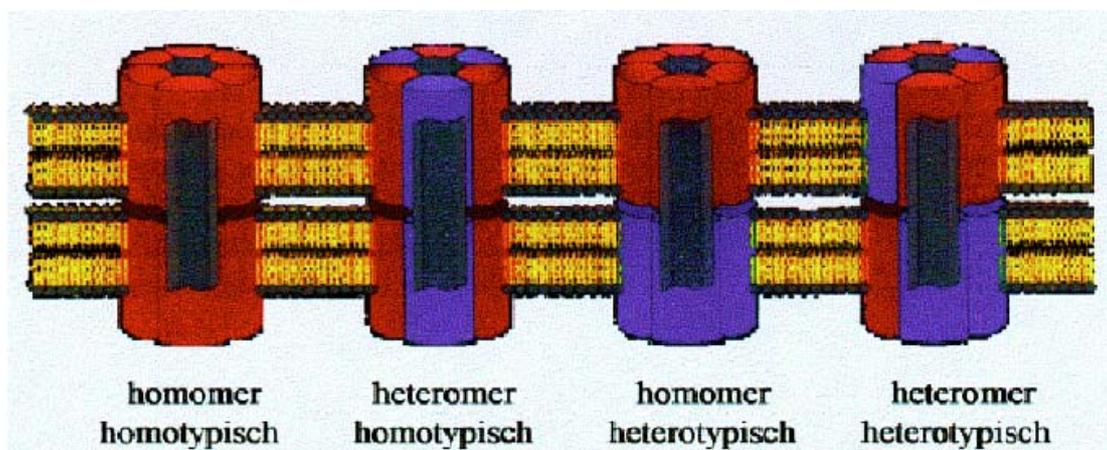


Abb.2 Strukturelle Vielfalt von Gap Junction-Kanälen

Die verschiedenen Möglichkeiten der Connexon-Zusammensetzung und die unterschiedliche Kombination der Connexone untereinander bedeuten theoretisch vielfältige Kombinationsmöglichkeiten für den Aufbau von Gap Junctions (131). Neben der heterotypischen Interaktion kann auch sogenannte heteromere Interaktionen zwischen Connexinen stattfinden. Heteromere Connexone sind solche, die aus zwei oder mehr verschiedenen Connexinisoformen bestehen. Es ist allerdings wenig bekannt, welche Connexintypen zur Bildung heteromerer Connexone erforderlich sind. Die verschiedenen Möglichkeiten der Connexon- und Gap Junction-Zusammensetzung ist in Abbildung 2.2 schematisch dargestellt. Die Connexininkompatibilität kann bei der funktionellen Kompartimentierung der Gewebe eine Rolle spielen, zumal verschiedene Connexinisoformen in benachbarten Bereichen eines Gewebes gleichzeitig exprimiert werden. Zudem muss noch zwischen homologer und heterologer Zell-Zell-Kommunikation (ZZK) unterschieden werden. In diesem Fall bedeutet homolog, dass die Kommunikation zwischen zwei gleichen Zellen stattfindet, wogegen heterologe Kommunikation die funktionelle Kopplung zweier unterschiedlicher Zelltypen beschreibt.

1.1.1.7 Connexinexpression in der Haut

Die Connexinexpression in der Haut ist nicht nur abhängig vom Zelltyp sondern auch entwicklungsabhängig. Das Expressionsmuster der Connexine unterscheidet sich auch zwischen Maus und Menschen (s.Tab.1).

Durch immunhistochemische Analysen von Maus- und Rattenhaut wurde gezeigt, dass mit der Differenzierung der Epidermis eine Veränderung der Connexinexpression einhergeht. In embryonalen Basalzellen werden Cx43 und Cx45 exprimiert. In differenzierenden Zellen der Granulosa- und Spinosaschichten wurden hauptsächlich Cx26 und Cx31 nachgewiesen, während Cx37 in allen Schichten gefunden wird. Bei adulten Tieren werden Cx43 und Cx40 in der Basalschicht exprimiert, während differenzierende Keratinozyten des *Stratum granulosum* und *spinosum* Cx31, Cx31.1, Cx30.3 und Cx37 exprimieren.

	NAGETIERE		Human
	Embryo	Adult	
Epidermis : <i>Str. basale</i>	Cx43>Cx31,Cx45	Cx43>Cx40	Cx26,(Cx43)
Epidermis: <i>Str. spinosum</i>	Cx31>Cx26>Cx43	Cx31>Cx43	Cx43>Cx31>Cx37
Epidermis: <i>Str. granulosum</i>	Cx31>Cx26	Cx31	Cx43>Cx31>Cx37
Haarfollikel: IRS	Cx31>Cx43	Cx31,(Cx26)	Cx26>Cx43
Haarfollikel: ORS	Cx43,Cx45	Cx43,Cx40	Cx43>Cx26
Talgdrüsen	Cx31>Cx40, Cx43		Cx43
Ekkrine Schweißdrüsen	Cx31,Cx26		Cx31,Cx26,(Cx43)
Dermale Fibroblasten	Cx43		Cx43,Cx40

Tab. 1 Connexinexpression in der Haut

Str.:Stratum, IRS :Zellen der inneren Wurzelschicht, ORS: Zellen der äußeren Wurzelschicht (139-151)

In menschlicher Haut sind Cx43 und Cx31 häufigst exprimierten Connexine (s. Tab. 1) mit starker Expression im *Stratum spinosum* und *granulosum*. In geringen Mengen werden auch Cx37 und Cx31.1 im *Stratum spinosum* und *granulosum* kolokalisiert mit Cx43 und Cx31 gefunden. Cx26 wird nur gering im *Stratum basale* exprimiert, wobei die Cx32 und Cx40 in der menschlichen Haut keine Rolle zu spielen scheinen (152).

1.1.2 Aufbau und Funktion der menschlichen Haut

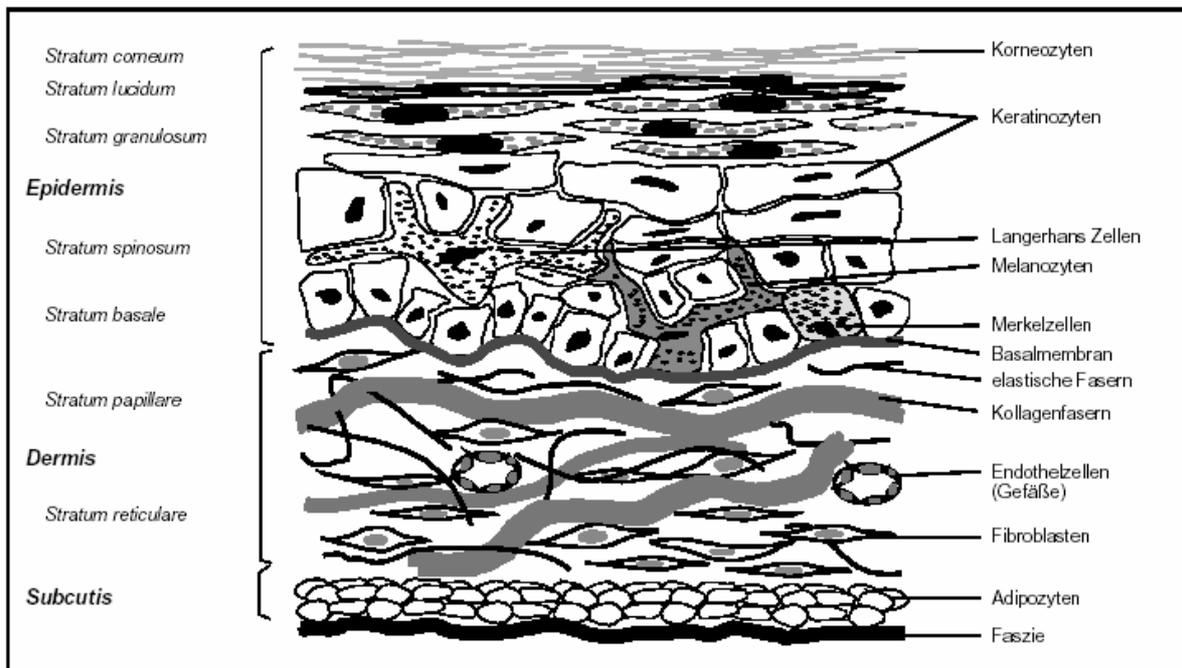


Abb.3

Aufbau der menschlichen Haut

Die Haut stellt mit bis zu 2 m² Oberfläche das größte Organ des Menschen dar. Sie dient als schützende Barriere gegenüber physikalischen, chemischen oder mikrobiellen Einwirkungen und übernimmt vielfältige Stoffwechselfunktionen. Um diesen Funktionen nachzukommen, verfügt die menschliche Haut über eine komplexe Struktur. von außen nach innen gliedert sie sich grob in Oberhaut (Epidermis), Lederhaut (Corium oder Dermis) und Unterhaut (Subcutis) (Abb. 2.3). Epidermis und Dermis stellen die Haut im eigentlichen Sinne dar und werden als Cutis bezeichnet. Die Epidermis setzt sich aus fünf Schichten Hornschicht (*Stratum corneum*), Glanzschicht (*Stratum lucidum*), Körnerzellschicht (*Stratum granulosum*), Stachelzellschicht (*Stratum spinosum*) und Basalschicht (*Stratum basale*) zusammen. *Stratum spinosum* und *Stratum basale* werden auch als *Stratum germinativum* (Regenerationsschicht) zusammengefasst, da hier durch mitotische Teilungen neue Zellen entstehen. Diese Zellen wandern in die oberen drei Zellschichten (Verhornungsschicht) ein, wo sie eine Umstrukturierung der in ihnen enthaltenen Keratinfilamente erfahren und zu kernlosen Korneozyten (Hornzellen) ausdifferenzieren, um schließlich ein mehrschichtiges, verhornendes Plattenepithel zu bilden. Die äußeren Bereiche des *Stratum corneum* schilfern regelmäßig ab (Desquamatio insensibilis), wodurch sich die Epidermis innerhalb von etwa 27

Tagen vollständig erneuert. Zusätzlich enthält die Epidermis die melaninbildenden Zellen des Pigmentsystems (Melanozyten), dendritische Zellen des Immunsystems (Langerhans-Zellen) und Sinneszellen, die möglicherweise als Mechanorezeptoren fungieren können (Merkel-Zellen).

Die Epidermis wird durch die Basalmembran, die aus *Lamina lucida externa*, *Lamina densa* und *Lamina lucida interna* besteht, von der Dermis getrennt. Die Basalmembran bildet durch ihren speziellen Aufbau aus verschiedenen Glykoproteinen wie beispielsweise Laminin, Kollagen Typ IV oder Entactin einen selektiven molekularen Filter, den verschiedene Tumor- oder Entzündungszellen passieren können. Auch in der Dermis lassen sich verschiedene Schichten differenzieren, dies sind Papillarschicht (*Stratum papillare*) und Geflechschicht (*Stratum reticulare*). Über die bindegewebigen Papillen des *Stratum papillare* ist die Dermis fest mit der Epidermis verzahnt. In diesem Bereich liegen auch Kapillarschlingen, die die Versorgung der Epidermis sicherstellen, initiale Lymphgefäße, freie, bis in die Epidermis verzweigende Nervenendigungen, Wärme- und Kälterezeptoren sowie Tastsinnesorgane.

Als freie Bindegewebszellen werden, neben Fibroblasten und Mastzellen, die Zellen der Immunabwehr (Makrophagen, Lymphozyten, Granulozyten und Monozyten) gefunden. Den Raum zwischen zellulären und faserigen Elementen (Interstitium) füllt eine gallertige Flüssigkeit aus, die sogenannte Interzellulärschicht. Faserige Elemente und Interzellulärschicht bilden gemeinsam die extrazelluläre Matrix (EZM) in der sich die Zellen bewegen und miteinander interagieren. Das *Stratum reticulare* enthält weniger Zellen, ihre Kollagenfasern bilden jedoch ein dichtes Netzwerk, das überwiegend parallel zur Körperoberfläche ausgerichtet ist und in dessen Maschen sich Fasern des elastischen Bindegewebes verzweigen. Als eigenständige Strukturen der Haut sind Haarfollikel, Talg-, Schweiß- und Duftdrüsen in die Dermis eingebettet. Das Bindegewebe der Haut ist in komplexer Weise aus Strukturproteinen und Bindegewebszellen (Fibroblasten) aufgebaut, wobei die Fibroblasten für die Synthese und den Abbau dieser Strukturproteine verantwortlich sind. Zu ihnen werden verschiedene multifunktionale Glykoproteine, Proteoglykane und Faserproteine wie Elastin und unterschiedliche Kollagene gezählt (156-158). Gerade den Kollagenen kommt in der Haut eine besondere, strukturelle und funktionelle Bedeutung zu. Beispielsweise verbindet ein sehr langes, stäbchenförmiges Kollagen vom Typ VII die Epidermis mit der Dermis und ist selber mit anderen Strukturproteinen der Basalmembranzzone wie Kollagen Typ IV, Laminin, Nidogen und Kalinin in molekular noch nicht bekannter Weise vernetzt. Kollagen Typ I ist mit einem Anteil von über 80 % mengenmäßig das häufigste Strukturprotein der Dermis und ist insbesondere für deren

Reißfestigkeit und Stabilität verantwortlich (159,160). Der Abbau einzelner Bindegewebsproteine wird in kontrollierter Weise durch Enzyme, die zur Familie der Matrix-Metalloproteinasen gehören, reguliert. Die Aktivität dieser Matrix-Metalloproteinasen wird wiederum durch von Fibroblasten synthetisierte Inhibitoren (TIMP, tissue inhibitor of metalloproteinases) kontrolliert (160-164). Letztendlich garantiert ein ausgeglichenes Verhältnis der Synthese von Strukturproteinen auf der einen Seite und der Matrix-Metalloproteinasen und ihrer Inhibitoren auf der anderen Seite die Funktion des Bindegewebes der Haut. Dieses sensible Gleichgewicht wird jedoch durch Kanzerogene wie UV-Strahlung entscheidend gestört (165-176). UVB-Exposition führt vermutlich über eine gestörte Zell-Matrix-Interaktion und durch ein Ungleichgewicht zwischen Matrix-Synthese und Matrix-Abbau zu erheblichen Störungen in Prozessen wie der Wundheilung und zur Begünstigung von Tumorinvasion und Metastasierung in der Tumorprogression (235).

1.1.3 Mechanismen der malignen Progression

Ein Tumor ist definiert als die abnorme Vergrößerung eines Gewebes, ausgelöst durch unkontrollierte Proliferation der entsprechenden Zellen. Maligne Tumoren unterscheiden sich von benignen durch infiltratives und destruktives Wachstum in fremdem Gewebe (Invasion) sowie durch die Fähigkeit zur Metastasenbildung. Im Verlauf der malignen Transformation kommt es durch zunehmende Entdifferenzierung des Epithels von der Hyperplasie zum Carcinoma in situ. Wenn Tumorzellen die Basalmembran überschreiten, erfüllen sie damit ein wesentliches Definitionskriterium der Malignität, das invasive Wachstum.

Nach der **Drei-Schritt-Hypothese** (s. Abb. 5) besteht die Invasion aus folgenden Schritten: Adhäsion der Tumorzellen an die Matrix, Degradation der Matrix und Migration der Tumorzellen durch die degradierte Matrix (177). Das heißt die Tumorzellen wandern in das subepitheliale Bindegewebe und können aktiv Bestandteile des Bindegewebes abbauen um Anschluss an das Blutgefäß zu bekommen. Nach Verlust der Zell-Zell-Adhäsion kommt es zum Einbruch von Tumorzellen in die Lymph- oder Blutgefäße, was als erster Schritt der Fernmetastasierung angesehen werden kann. Die Tumorzellen dringen in die Lymphabflusswege ein, bilden Absiedlungen in den regionalen Lymphknoten und gelangen dann weiter über die Lymphabflusswege in die Blutbahn. In den Tumorzellen, die sich in der Blutbahn befinden, muss ein Mechanismus zum Schutz gegen Apoptose aktiv sein. In etwa 90% aller Tumoren bilden sich die Metastasen in denjenigen Kapillarbetten, in die

Tumorzellen entsprechend der anatomischen Lokalisation des Tumors zuerst gelangen. Dies kann über die Embolisierung der Endstrombahn oder durch Adhärenz der Tumorzellen an das Epithel geschehen. Die Tumorzellen durchdringen die endotheliale Basalmembran, invadieren das subendotheliale bindegewebige Stroma und im weiteren Verlauf das Parenchym des betreffenden Organs. Hier bilden sich schließlich die Metastasen.

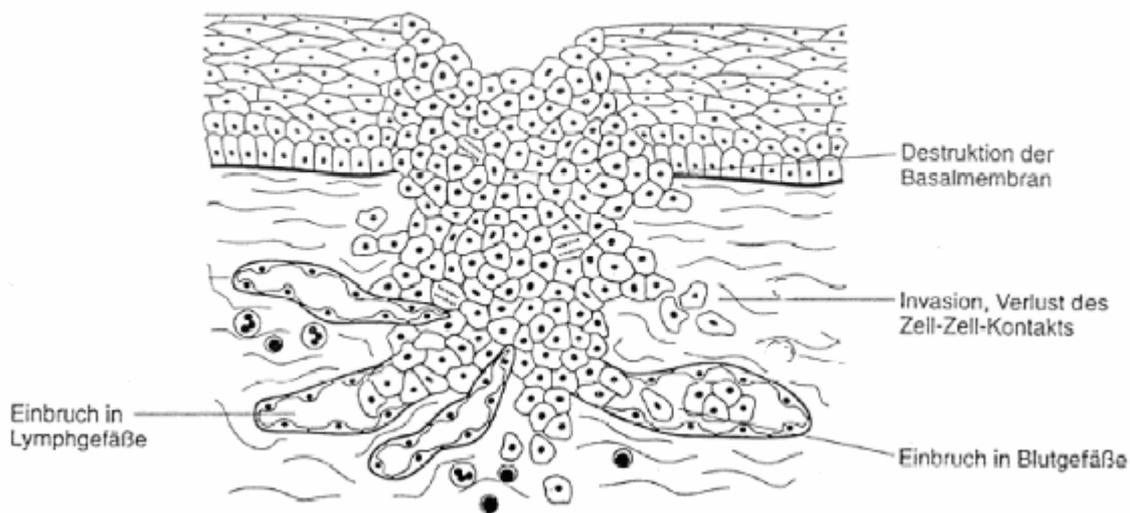
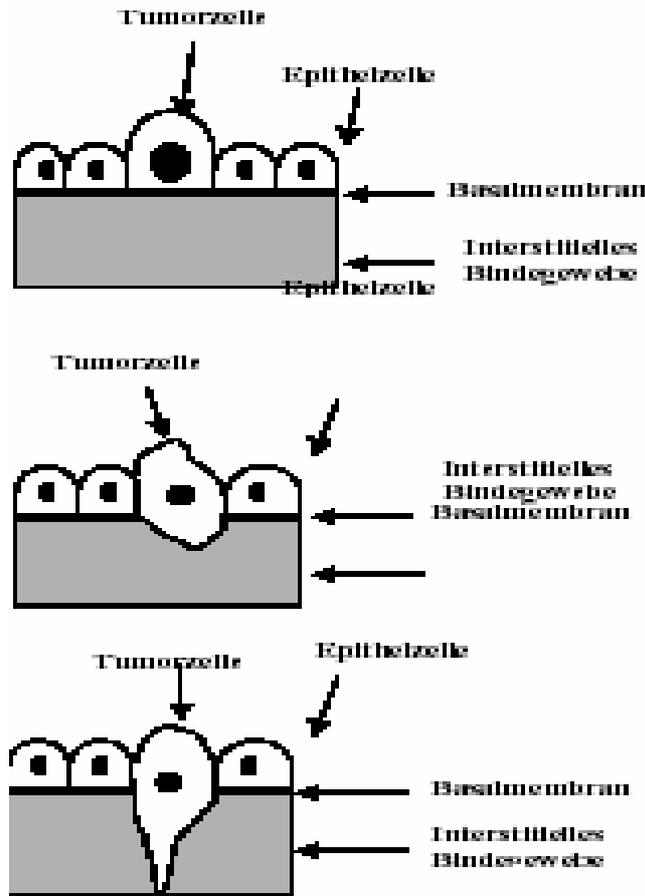


Abb. 4

Eigenschaften eines invasiv wachsenden Karzinoms (234, verändert)

Die Durchwanderung der Basalmembran durch die Tumorzellen, auch Invasion genannt, ist Voraussetzung für die Metastasierung. Die Basalmembran ist ein spezialisierter Teil der extrazellulären Matrix. Sie erfüllt vielfältige Funktionen: Indem sie Zellen eine Haftfläche bietet, beeinflusst sie einerseits das Wachstums-, Regenerations- und Differenzierungsverhalten und wirkt andererseits aufgrund ihrer selektiven Permeabilität als Filtrationsschranke.



1. Adhäsion der Tumorzellen an die Basalmembran
Die Tumorzellen binden sich mittels eigener Adhäsionsmoleküle an Laminin. Damit stellt Laminin ein Haftprotein für die Zellen zum Kollagen IV dar. Kollagen IV stellt die wesentliche strukturelle Komponente der Basalmembran.

2. Degradation der Basalmembran mittels lokaler Proteolyse

Die zur Proteolyse benötigte Enzyme werden von den Tumorzellen selbst oder vom gesunden Bindegewebe nach der Stimulation durch die Tumorzellen produziert.

3. Migration der Tumorzellen

Durch die degradierte EZM bewegen sich die Tumorzellen durch Chemotaxis oder mittels eigener Motilitätsfähigkeiten in das gesunde Bindegewebe.

Abb.5
Schematische Darstellung der „Drei-Schritt-Invasionstheorie“ (177)

Ein wichtiger Anteil der Basalmembran besteht aus nichtkollagenen Glykoproteinen wie Laminin. Diese regulieren als Adhäsionsmoleküle die Adhäsion von Zellen, die auf der Basalmembran aufsitzen. Die steuern deren biologische Aktivität und regulieren damit selbst die Bildung der Matrix (236).

Die Tumorzellen heften sich bei der Adhäsion mittels Oberflächenrezeptoren wie den Integrinen an bestimmte Glykoproteine der EZM. Da Zelladhäsionsmoleküle die Struktur eines Gewebes wesentlich bestimmen, kann der Verlust adhäsiver Eigenschaften ursächlich für eine verminderte Differenzierung und demzufolge für invasive Wachstumseigenschaften des Tumors verantwortlich sein.

Zelloberflächenrezeptoren, die durch Funktionsverlust die maligne Progression fördern, sind funktionell als Tumorsuppressoren zu betrachten. Sie können in folgende Gruppen unterteilt werden: Integrine, E-Cadherin, E-Selektin und Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie.

Integrine sind an der Zelloberfläche lokalisierte heterodimerische Glykoproteine (α - und β -Subeinheiten). Sie beeinflussen wichtige Aspekte des Verhaltens der Tumorzellen wie Motilität, Invasion, Zellwachstum und Zellmorphologie. Die Integrine verbinden die EZM mittels ihrer zytoplasmatischen Domänen mit den Komponenten des Zytoskeletts. Auf diese Weise erfüllen die Integrine eine wichtige Rolle in der zellulären Signaltransduktion (178,179). Der Kontakt der Integrine mit den Proteinen der EZM aktiviert die Gruppe der Rho-Proteine der kleinen GTP-ase; umgekehrt beeinflussen die Proteine aus der Rho- und Ras-Gruppe die Fähigkeit der Bindung von Integrinen an ihre Liganden.

Neben den Integrinen begünstigen auch Veränderungen der Expression oder Struktur der E-Cadherine oder Catenine die maligne Progression. Die E-Cadherine sind transmembrane Glykoproteine, die epitheliale Zell-Zell-Adhäsion vermitteln. Ein Verlust von E-Cadherin kann zu Verlust des Zusammenhaltes zellulärer Verbände führen. Die E-Cadherin-Mutationen finden sich in mehr als der Hälfte der infiltrativen globulären Mammakarzinome (182,183). Da in Tumoren mit mutierten E-Cadherin-Genen das zweite Allel häufig deletiert ist, ist hier das invasive Wachstum mit dem Verlust der E-Cadherin-Funktion zu erklären. E-Cadherin wurde als Tumorsuppressor bezeichnet, vor allem weil Zellen E-Cadherin-negativer Epithelialtumoren zur Invasion neigen, während die Mehrzahl der Zellen E-Cadherin-positiver Mammakarzinome keine Neigung zur Invasion zeigen (184-186). In einer Studie von Nieman scheint die Expression eines nicht epithelialen Cadherins (N-Cadherin) in einem Zusammenhang mit der gestörten Motilität und Invasion von Mammakarzinomzellen zu stehen (187).

Die Degradation des Bindegewebes wird als wichtiger Schritt angesehen, um den malignen Zellen die lokale Invasion zu erlauben, weiter in die Lymph- und Blutzirkulation zu gelangen und schließlich Fernmetastasen zu bilden. Mittels lokaler Proteolyse wird ein Zugang durch die Basalmembran und weiter in das Bindegewebe geschaffen. Die dazu benötigten Enzyme werden von den Tumorzellen selbst oder von Zellen des Stromas nach Stimulation durch die Tumorzellen produziert. Die 4 bisher bekannten Klassen der Proteinase, die sich an der Proteolyse beteiligen, sind: Serin-Proteinase, Cystein-Proteinase, Asparagin-Proteinase und Metalloproteinase. Viele Studien über die Degradation beschäftigten sich mit der Expression von MMP bei malignen Zellen. Sie untersuchten die direkte Korrelation zwischen der Anzahl der von Tumorzellen produzierten MMP und den Invasivitätseigenschaften der Zellen *in vitro* sowie dem Metastasierungspotenzial *in vivo*. Die Studien zeigten, dass die Invasivitätskapazität direkt mit der Produktion der MMP korreliert (188-190).

1.1.4 Das Plattenepithelkarzinom

Neben dem Begriff Plattenepithelkarzinom werden einige Begriffe synonym verwendet: Spinalium, Spinoläres Karzinom, Stachelzellkarzinom oder Epithelioma spinocellulare. Die Begriffe beschreiben einen Hauttumor dessen Morbidität in Mitteleuropa bei 25-30 Neuerkrankungen pro 100000 Einwohner. Somit ist das Plattenepithelkarzinom (nach dem Basaliom) der zweithäufigste Hauttumor; in sonnenreichen Regionen ist die Inzidenz höher.

Männer erkranken zwei-bis fünf Mal häufiger als Frauen; dies kann man nur zum Teil auf die erhöhte Exposition gegenüber kanzerogenen Noxen in bevorzugt „männlichen“ Berufen erklären. Spinaliome treten bevorzugt im höheren Alter mit einem Gipfel zwischen 70 – 80 Jahren auf. Dies ist die Folge sich über die Gesamtlebensdauer summierender kanzerogener Noxen, wie UV-Licht, Röntgenbestrahlung, industrieller Schadstoffe (Teer, Mineralöle, Arsen) oder chronischer Virusinfektion (237).

Ein Plattenepithelkarzinom entsteht durch einen mehrstufigen Prozess, zu dem prädisponierende Faktoren und karzinogene Noxen beitragen. Der erste Schritt findet auf molekularer Ebene statt. Durch bekannte Karzinogene werden Schäden an der DNA gesetzt, die durch eine Reihe von Reparaturmechanismen (Exzisionsreparatur) bis zu einem gewissen Grad reparabel sind. Quantitative und/oder qualitative Überschreitung der Reparatursfähigkeit führt durch somatische Mutation zum Entstehen einer malignen Zelle. Um aus einer Zelle einen malignen Klonus und ein Karzinom entstehen zu lassen, sind jedoch weitere Schritte des Wachstums und der Wachstumsförderung notwendig, die bisher nicht vollständig verstanden sind. Sicher ist, dass nicht alle malignen Klone zu malignen Tumoren werden. Ca 80-90% der Klone können von der Epidermis eliminiert werden. In 10-20% persistieren die malignen Klone, überwuchern und führen zu einem Karzinom.

Das Spinaliom ist ein solider epithelialer Tumor mit Verhornungstendenz. Die Spinaliomzellen sind groß und Plasma-reich und ähneln den Keratinozyten des *stratum spinosum*. Je differenzierter das Spinaliom, desto stärker die Neigung zur Verhornung. Zum Teil finden sich sogenannte Hornperlen, die aus konzentrisch aufgebauten Schichten aus Spinaliomzellen mit zentraler Verhornung entstehen. Je undifferenzierter das Spinaliom, desto häufiger finden sich Atypien, Hyperplasie und Hyperchromasie der Zellen sowie atypische Mitosen. Der Differenzierungsgrad ist von prognostischer Bedeutung.



*Abb.6
fortgeschrittenes Plattenepithelkarzinom im Kopfbereich eines älteren Mannes*

Die Prognose der Spinaliome liegt bei Tumoren von 5-10mm Tumordicke und Lokalisation an Schleimhaut, bzw. an Haut-Schleimhautgrenzen bei einer 68%igen; bei niedrigem Tumorrisiko bei einer 80%igen 5-Jahres-Überlebensrate.

1.1.5 ZZK und Karzinogenese

In einem vielzelligen Organismus ist eine fein aufeinander abgestimmte Regulation von molekulare und physiologischen Prozessen Voraussetzung für die Funktionalität des Organismus. Diese Homöostase wird von drei Kommunikationsprozessen beherrscht. Neben der extrazellulären Kommunikation über Wachstumsfaktoren/Zytokine und intrazellulären Kommunikation über sekundäre Botenstoffe und intrazelluläre Signal- Kaskaden, spielt die interzellulare Kommunikation über Gap Junctions eine wesentliche Rolle (201,202).

Gap Junction Größe und Anzahl, Connexin-Expression und zelluläre Kopplung wurde in zahlreichen neoplastischen Zelltypen *in vitro* und *in vivo* untersucht. Die Mehrheit der neoplastischen Zellen exprimieren entweder deutlich weniger Connexin oder sind zumindest weniger gekoppelt als ihre nichtneoplastischen Ursprungszellen. Die Erniedrigung der ZZK von Zellen kann auf verschiedensten Wegen realisiert sein. Einerseits könnten die geformten Gap Junction nicht permeabel sein, zweitens könnten die Junction nur zu homologer ZZK, nicht aber zu heterologer ZZK mit den stromalen Zellen der Umgebung fähig sein, drittens könnten die Junction unempfindlich für Gap Junction vermittelte Signale zur Wachstumskontrolle sein. Entscheidend ist die Entkopplung gegenüber dem Stroma die

allgemein als beitragend oder sogar ursächlich für fehlende Proliferationskontrolle interpretiert wird (204-206).

Eine Vielzahl chemischer Karzinogene sind bereits identifiziert worden die eine neoplastische Transformation unabhängig von direkter DNA-Schädigung fördern. Viele dieser Stoffe wirken wachstumsfördernd oder hemmen apoptotische Signale. ZSK ist ein wesentliches Element in der Regulation von Wachstumsprozessen. Viele der über 100 untersuchten Tumor-Promotoren inhibieren die normale ZSK. Diese Fähigkeit ist eine der hervorstechendsten Gemeinsamkeiten nahezu aller Tumor-Promotoren. Dies scheint besonders interessant wenn man die chemische Unterschiedlichkeit der Tumor-Promotoren bedenkt. Zudem erreichen die Tumor-Promotoren die Herabregulation der ZSK auf unterschiedlichsten Wegen. Interessanterweise führen die meisten Karzinogene, die eine DNA-Schädigung hervorrufen nicht zum Schließen der Gap Junctions.

Onkogene sind zelluläre Gene, die durch Mutation entweder aktiviert oder vermehrt gebildet werden und somit eine neoplastische Transformation einer Zelle zur Folge haben. Die aus Onkogenen resultierenden Proteine spielen eine Rolle bei der zellulären Signaltransduktion, der Wachstumskontrolle, der Genregulation und viele blockieren die ZSK. Zu diesen gehören ras, neu und auch src. Auch kooperieren Onkogene in ihren Fähigkeiten die ZSK zu blockieren. Rattenleberepithelzellen, die nur raf oder myc-Onkogene exprimieren zeigen normale ZSK und sind nicht transformiert. Koexpression resultiert aber in totalem Block der ZSK und erzeugt eine hochaggressive Zelllinie (207) dasselbe gilt für die Koexpression von c-Ha-ras und v-myc (208).

Eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren inhibieren die ZSK. Darunter sind EGF, PDGF, bFGF, hGF und TGF α . Der Effekt tritt manchmal innerhalb von Minuten, manchmal aber auch erst nach Stunden auf. Der Mechanismus der ZSK-Inhibition durch EGF ist die Aktivierung von Erk1,2 und nachfolgende Connexinphosphorylierung. PDGF stimuliert ebenfalls eine Phosphorylierung des Cx-Proteins. bFGF inhibiert die ZSK erst nach ca. acht Stunden durch erniedrigte Expression des Connexins. Einige Faktoren, wie TGF β führen zu unterschiedlichen Effekten, je nach Zelltyp und Stoffwechsellage oder Zellzyklus.

Viele Onkogene codieren für Wachstumsfaktoren oder deren Rezeptoren und viele Tumorpromotoren agieren als Wachstumsfaktoren, da sie Wachstum fördern. Wie bereits gesagt wurden Onkogene und Tumorpromotoren mit dysfunktionaler ZSK in Verbindung gebracht. Somit zeigen Wachstumsfaktoren, Tumorpromotoren und Onkogene einen negativen Einfluss auf die ZSK.

Für Basaliome und Plattenepithelkarzinome der Haut geht der Verlust der ZZK entweder einher mit einer fehlenden Expression von Cx26 und Cx43 oder mit dem Verlust der Translokation der Connexine an die Membranoberfläche, wie am Modell der Hautkarzinogenese der Maus gezeigt wurde (209) .

1.2 Fragestellung

Bisherige Untersuchungen zur interzellulären Kommunikation zwischen Tumorzellen und ihren benachbarten normalen Zellen hatten das Ziel, die Mechanismen der Tumorbildung im Rahmen der Tumorinitiation bzw. -promotion besser erklären zu können. Dabei standen die molekularen Mechanismen, die in der Tumorzelle *per se* ablaufen im Vordergrund. In eleganten Ansätzen wurde bisher gezeigt, dass die Kommunikation zwischen den Tumorzellen selbst und auch zwischen den Tumorzellen und benachbarten normalen Zellen gleichen Ursprungs unterbunden ist.

Untersuchungen zu epigenetischen Ereignissen während der Tumor-Stroma-Interaktion stellen in der Tumorprogression, die zur Invasion und Metastasierung führt, eine große Herausforderung dar. Die möglichen molekularen Mechanismen, die zu einer Modulation der durch Gap Junctions vermittelten interzellulären Kommunikation (Zell-Zell-Kommunikation, ZZK) zwischen malignen Hautzellen mit den sie umgebenden stromalen Zellen (heterologe ZZK) oder zwischen den einzelnen Zelltypen untereinander (homologe ZZK) führen, sind das Ziel der hier vorliegenden Arbeit. Des Weiteren sollen Interventionsmöglichkeiten erarbeitet werden, die die homologe und/oder heterologe ZZK, als eine wichtige Voraussetzung der Proliferations- und Invasionskontrolle, erhalten.

Hierbei liegt der Fokus der Untersuchungen nicht auf den Krebszellen, da diese genotypisch instabil sind und somit eine heterogene und daher schwerer zu untersuchende Population bilden, sondern hauptsächlich auf den stromalen Zellen (hier: dermale Fibroblasten), die genomische Stabilität aufweisen. Diese Stabilität, die in diesem neuen Forschungskonzept von großem Nutzen ist, ist eine unterschätzte Grundvoraussetzung für die Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze, die zu einer von Mikronährstoffen abhängigen Aufrechterhaltung der ZZK von stromalen Zellen und damit zur Verminderung der metastatischen Aktivität der Tumorzellen führen könnten.

2 Material und Methoden

2.1 Charakteristika der verwendeten Zelllinien

- HDF - humane dermale Fibroblasten

HDF Zellen sind humane sekundäre Hautfibroblasten, die von Praeputien 5-12jähriger Knaben des kaukasischen Menschentypes stammen und bei Zirkumzisionen gewonnen wurden. Die zur Isolation der Zellen verwendeten Biopsien erhielten wir freundlicherweise von Dr. Meyer aus der Praxis-Klinik Grevenbroich.

- HDEK – humane dermale epitheliale Keratinozyten

HDEK Zellen sind humane sekundäre Hautkeratinozyten, die von Praeputien 5-12jähriger Knaben des kaukasischen Menschentypes stammen und bei Zirkumzisionen gewonnen wurden. Die zur Isolation der Zellen verwendeten Biopsien erhielten wir freundlicherweise von Dr. Meyer aus der Praxis-Klinik Grevenbroich.

- HaCaT

Diese Zelllinie ist aus spontan transformierten Keratinozyten hervorgegangen (210-212). HaCaT-Zellen sind immortal formen jedoch keinen Tumor.

- SCL1

Die SCL1 Zellen sind wenig differenzierte menschliche Haut-Plattenepithelkarzinomzellen [213].

2.2 Isolation von Keratinozyten aus Biopsien

Zuerst werden die Zirkumzisionsbiopsien in kaltem PBS einmal gewaschen. Anschließend folgt erneutes Waschen für eine Minute in PBS mit 20µg/ml Gentamycin. Nach diesem Schritt wird mit einem Skalpell das Fettgewebe großzügig entfernt wobei darauf zu achten ist, dass die Biopsie nicht austrocknet. Nun wird die Biopsie in kleine Stücke zerteilt, die möglichst kleiner als 5mm sein sollten. Die Stücke werden in 10ml vorgewärmte (37° C) Trypsin/EDTA-Lösung (0,05%) überführt in der sie für 15min mit einem Magnetrührer gerührt werden. Man erhält eine trübe Suspension. Dieser entnimmt man 8ml Überstand die in eiskaltes Keratinozytenmedium überführt werden. Zu der ursprünglichen Suspension gibt man erneut Trypsin/EDTA-Lösung und inkubiert erneut unter Rühren. Diese Extraktion wiederholt man insgesamt viermal. Die gesammelten Überstände werden nun bei 4° C und 1000rpm für 10min sedimentiert. Der entstandene Überstand wird verworfen und das Pellet wird mit frischem FCS-freiem Keratinozytenmedium resuspendiert. Die entstandene Zellsuspension wird mittels eines „Cell-Strainers“ mit 70µm Maschengröße von Verunreinigungen befreit und die Zellzahl mit einer Zählkammer bestimmt. Im Folgenden werden die Zellen mit einer Zelldichte von $0,5 \cdot 10^6$ Zellen pro 10cm-Petrischale ausgesät und im Inkubator bei Standardbedingungen kultiviert. Es ist darauf zu achten, dass die Zellen in den ersten 48 Stunden nicht bewegt werden und alle zwei Tage frisches Medium erhalten.

2.3 Isolation von Fibroblasten aus Biopsien

Zuerst werden die Biopsien in kaltem PBS einmal gewaschen. Anschließend folgt erneutes Waschen für eine Minute in PBS mit 20µg/ml Gentamycin. Nach diesem Schritt wird mit einem Skalpell das Fettgewebe großzügig entfernt wobei darauf zu achten ist, dass die Biopsie nicht austrocknet. Nun wird die Biopsie in kleine Stücke zerteilt, die möglichst kleiner als 5mm sein sollten. Diese Stücke werden auf eine Petrischale gelegt und sollen mit der Dermisseite nach unten 10min antrocknen. Anschließend wird DMEM mit 20% FCS dazugegeben. Die Schalen sollten möglichst wenig bewegt werden. Nach einigen Tagen wachsen zuerst epitheliale Zellen aus der Biopsie nach außen. Unter diesen kommen dann später die Fibroblasten hervor. Nun kann trypsiniert und im folgenden unter Aufrechterhaltung des hohen Serumanteils weiterkultiviert werden. Nur die Fibroblasten überleben das stark Serum-haltige Medium.

2.4 Stammhaltung und Anzucht der Zellen

Mit Ausnahme der Keratinozyten und ihrer Kokulturen wurden die oben genannten Zellen in Duplecco's modified Eagle's Medium (DMEM-Medium), das mit 10 % FCS, 2 mM L-Glutamin und Penicillin/Streptomycin (Komplettmedium) supplementiert wurde, in einer wasserdampfgesättigten, auf 37°C temperierten Atmosphäre mit 5 % Kohlendioxid kultiviert. Die Keratinozyten wurden in speziellem Keratinozytenmedium mit speziellem Supplement kultiviert. Nach Erreichen einer 80-90% Konfluenz wurden alle Zellen zuerst mit PBS gewaschen und anschließend mit einer Trypsin-EDTA:PBS Lösung (0,5g/L Trypsin; 0,2g/L Na-EDTA) abgelöst. Die Trypsinaktivität wurde nach 2-5 min. durch Zugabe von FCS-haltigem Medium abgestoppt, die Zellen resuspendiert, in einer Neubauer-Zählkammer gezählt und auf die entsprechende Anzahl Kulturflaschen oder -schalen überführt. Bei den Keratinozyten wurde ein zusätzlicher PBS-Waschschritt eingefügt, der das Trypsin vollständig entfernte.

Zur Kontrolle des Zellwachstums wurde die kummulative Populationsdichte bestimmt. Diese errechnet sich wie folgt:

$$\frac{\log(\text{Zellzahl nach Passage}) - \log(\text{eingesäte Zellzahl})}{\log(2)} = \text{PD}$$

$$\text{CPD} = \sum \text{PD}$$

Dabei wurden die Fibroblasten und die Keratinozyten bis zu einer CPD von 20 verwendet. Die immortalen HaCaT- und SCL1-Zellen wurden unabhängig ihrer CPD verwendet. Alle verwendeten Zellen wurde in regelmäßigen Abständen auf Mycoplasmenkontamination hin untersucht.

2.5 Kryokonservierung und Revitalisierung von Zellen

Nach dem Abstoppen der Trypsinaktivität (s.o.) wurde die Zellsuspension zentrifugiert und das Zellpellet in Einfriermedium (DMEM-Medium mit 20% FCS und 10% DMSO) wieder aufgenommen und mit einer Dichte von ca. 10^6 Zellen/ml in speziellen Kryotubes bei -80°C eingefroren.

Eingefrorene Zellen wurden schnell aufgetaut und in eine 75 cm² Kulturflasche mit Komplettmedium überführt. Um den DMSO-Gehalt in dem Medium auf unter 1% zu reduzieren und dadurch einer Membranschädigung vorzubeugen, wurde sowohl nach 4-5h als auch nach 24h ein Mediumwechsel vorgenommen.

2.6 Gewinnen der Überstände

Um die von den jeweiligen Zellen sezernierten Bestandteile zu gewinnen wurden die Zellen in 750ml-Zellkulturflaschen bis zur Konfluenz in Serum-haltigem Medium kultiviert. Nach zweimaligem Waschen wurde das Medium gegen 20ml Serum-freies Medium ausgetauscht und die Zellen zwei Tage weiterkultiviert. Dieses Medium wurde dann gewonnen. Nach Abzentrifugieren von Zelltrümmern wurde der Überstand entweder direkt weiterverwendet oder bei -80°C bis zu vier Wochen aufbewahrt.

Nomenklatur der Überstände:

(SN(#d)X) - SN=Überstand; #d = Anzahl akkumulierter Tage; X = Zelltyp

2.7 Mykoplasmentest

In regelmäßigen Abständen wurden die Zellen auf Kontaminationen mit Mykoplasmen untersucht. Bei Mykoplasmen handelt es sich um zellwandlose, von einer Zytoplasmamembran umgebene Bakterien, welche parasitär Zellen befallen können. Mykoplasmen können das geregelte Zellwachstum beeinflussen bzw. die Reaktionen von Zellen auf bestimmte Stimuli verändern. Da sie lichtmikroskopisch nicht zu sehen sind, bleiben sie ohne eine geeignete Detektionsmethode unerkannt. Durch den Einsatz des fluoreszierenden Farbstoffes Bisbenzimid erfolgte die Kontrolle der Zellkulturen (180). Zellen wurden in einer Dichte von etwa 1000 Zellen/cm² auf einem Deckgläschen kultiviert. Nach 2 Tagen Inkubation wurden die nicht konfluenten Zellen auf dem Deckgläschen mit 2 ml PBS gewaschen und für 10 min in 1 ml Carnoy's Fixativ (Methanol/Eisessig, 3:1) fixiert. Danach erfolgte ein zweimaliges Waschen der Zellen mit McIlvaine-Puffer (50mM Zitronensäure, 100mM Na₂HPO₄) und eine 15minütige Inkubation in 1 ml Bisbenzimid-Lösung (0,05 µg/ml). Nach zweimaligem Waschen mit dH₂O konnte das Deckgläschen mit den Zellen auf einen Objektträger mit 20 µl Einbettmedium fixiert werden. Innerhalb der

nächsten 20 min wurden die angefärbten Zellen unter dem Fluoreszenz-Mikroskop bei einer Anregungswellenlänge von 350 nm und einer Emissionswellenlänge von 460 nm auf Mykoplasmen kontrolliert. Durch den Farbstoff Bisbenzimid wird selektiv DNA angefärbt. Nicht kontaminierte Kulturen zeigten eine deutliche hellblaue Fluoreszenz, welche ausschließlich auf den Zellkern beschränkt ist. Zellkulturen mit Mykoplasmen zeigten neben dem fluoreszierenden Zellkern eine deutliche Fluoreszenz im Bereich der äußeren Zellmembran und zwischen den Zellen. Die Mykoplasmen erschienen entweder als gleichmäßig über die Zytoplasmamembran verteilte Partikel oder sie bildeten Aggregate auf der Zelloberfläche und/oder zwischen den Zellen. Kontaminierte Zellen wurden autoklaviert und entsorgt.

2.8 Vitalitätsbestimmung von Zellen

Der nachfolgend beschriebene MTT-Test dient dazu, die Vitalität von Zellen in der Zellkultur insbesondere nach der Applikation bestimmter Stressoren wie Inkubation mit chemischen Agenzien zu bestimmen (258,259). Grundlage dieser Analyse ist, dass das wasserlösliche Tetrazoliumsalz 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) von lebenden, metabolisch aktiven Zellen durch eine mitochondriale Dehydrogenase in ein blaues, unlösliches Formazansalz umgewandelt wird, dessen Absorption als Maß für die Vitalität der Zellen photometrisch bestimmt werden kann.

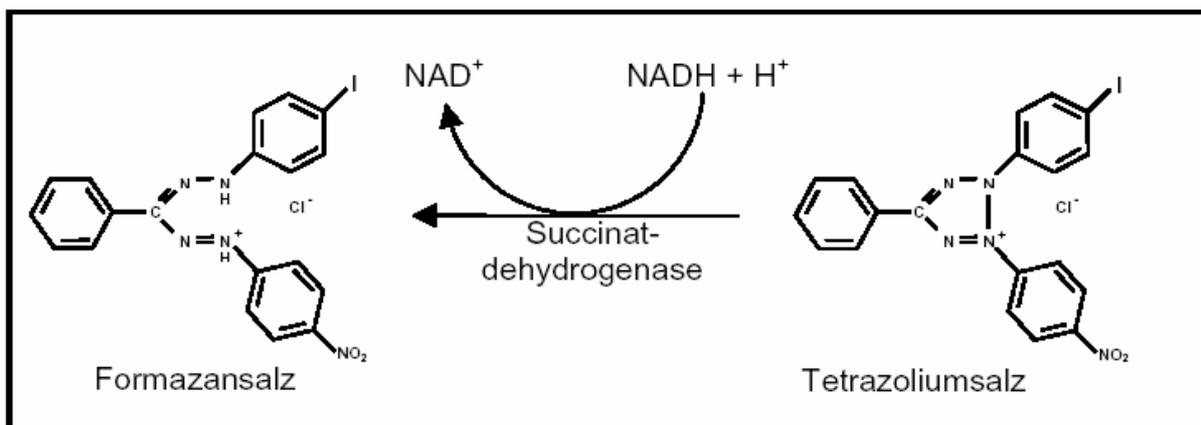


Abb.7 Prinzip des MTT-Tests: Bildung von Formazansalz als Parameter für die Vitalität von Zellen.

Zur Aufnahme des Tetrazoliumsalzes werden die Zellen mit einer 10%igen MTT-Lösung in DMEM für 1-2h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nach der Aufnahme wird das Tetrazoliumsalz von einer mitochondrialen Succinatdehydrogenase chemisch modifiziert. Es werden von dem Enzym Wasserstoffionen auf das Tetrazoliumsalz übertragen, wodurch der Tetrazoliumring gespalten wird und ein blaues, unlösliches Formazansalz entsteht (s. Abb. 7). Nach Beendigung der Inkubationszeit wurde das MTT-haltige DMEM abgesaugt und die Zellen mit DMSO solubilisiert. Das in DMSO gelöste Formazan wurde spektrophotometrisch bei einer Wellenlänge von 560 nm mit einer Referenzwellenlänge von 690 nm quantifiziert. Der Nullabgleich erfolgte dabei durch Messung von reinem DMSO. Die Vitalität der Zellen bzw. die Zytotoxizität einer Behandlung wurde als Prozent der Formazan-Bildung der behandelten Zellen, verglichen mit der Formazan-Bildung unbehandelter Zellen bestimmt:

$$\begin{array}{l} \% \text{ Vitalität} = \frac{\text{OD (behandelte Zellen)}}{\text{OD (Kontroll-Zellen)}} \times 100 \\ \% \text{ Zytotoxizität} = \left[1 - \frac{\text{OD (behandelte Zellen)}}{\text{OD (Kontroll-Zellen)}} \right] \times 100 \end{array}$$

Abb. 8 Berechnung der Toxizität

2.9 Allgemeine Versuchsbedingungen

Die verwendeten Substanzen wurden, falls nicht anders angegeben, von Sigma (Deisenhofen) oder Merck (Darmstadt) bezogen. Die verwendeten Lösungen wurden mit Reinstwasser aus einer Milli-Q Anlage (Millipore, Eschborn) hergestellt. Die benutzten Primärantikörper wurden wie an jeweiliger Stelle nachfolgend angegeben bezogen. Sekundärantikörper stammten von Sigma (Deisenhofen), Molecular Probes (Göttingen) und ICN (Costa Mesa, CA, USA).

Alle im Ergebnisteil gezeigten Experimente wurden dreimal unabhängig durchgeführt. Signifikanz wurde nach Student's T-Test ermittelt. Alle verwendeten Substanzen wurden vor Verwendung mittels MTT-Test auf Toxizität hin überprüft. Es wurden ausschließlich Konzentrationen verwendet, die 24 nach Experiment eine Überlebensrate größer als 80% erzielten (Ausnahme: TPA-Positiv-Kontrolle beim Western Blot). Bis zum Zeitpunkt des Experiments waren alle Zellen in Vollmedium.

2.10 Kommunikationsassay (Mikroinjektion)

Die Bestimmung der relativen Zell-Zell-Kommunikation erfolgte durch die intrazelluläre Mikroinjektion einer 10%igen (w/v) Lösung des Fluoreszenz-Tracer-Farbstoffes Lucifer Yellow CH. Dieser nichttoxische Tracer liegt, aufgrund des niedrigen pKa-Wertes zweier Sulfonsäuregruppen, bei physiologischem pH-Wert als Kation vor, wodurch intakte Membranen für diesen wasserlöslichen Farbstoff impermeabel sind und so eine unspezifische Membrandiffusion ausgeschlossen ist.

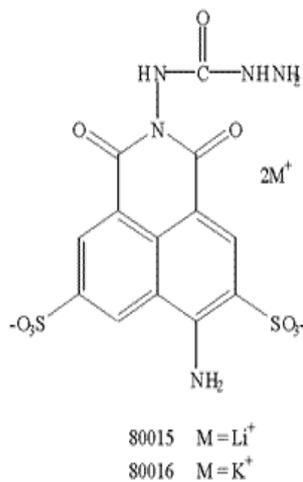


Abb. 9: Struktur des Fluoreszenzfarbstoffes Lucifer Yellow

Das Prinzip der Farbstoff-Transfer-Tests beruht auf der Diffusion des injizierten Farbstoffes von der injizierten Zielzelle über die Gap Junctions in die benachbarten Zellen. Nach genau einer Minute werden die fluoreszierenden Zellen, mit Ausnahme der injizierten Zelle, ausgezählt. Es lässt sich somit eine Aussage über den relativen Kopplungsgrad des Zellverbandes und den relativen Öffnungsgrad der Gap Junctions treffen.

Die Mikromanipulation erfolgte mittels einer Gerätekombination aus einem inversen Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 100, Zeiss, Köln) einem Mikromanipulator (FemtoJet, Eppendorf, Hamburg) und einem semiautomatischen Mikroinjektor (InjectMan, Eppendorf, Hamburg). 50 bis 200 Femtoliter der Lucifer Yellow CH-Lösung wurden mittels Femtotip-I-Kapillaren (Eppendorf, Hamburg) bei einem Injektionsdruck von 150 hPa, einer Injektionsdauer von 0,5 Sekunden und einem Kompensationsdruck von 50 hPa zytoplasmatisch in eine Zielzelle injiziert.

Zur Messung der ZZK wurde pro Kulturschale jeweils in 10 zufällig ausgewählte Zellen injiziert. Die Anregungswellenlänge von Lucifer Yellow liegt bei 426 nm und das Emissionswellenlängenmaximum bei 540 nm. Die zu messenden Zellen wurden in 35mm-Zellkulturschalen bis zur Konfluenz herangezogen und das jeweilige Experiment durchgeführt.

Zur quantitativen Darstellung der gemessenen Kommunikationswerte werden „Box & Whiskers Plots“ verwendet. Diese zeigen den Medianwert (Linie in der Mitte), die 25% Quartile (unterer Teil der Box), die 75% Quartile (oberer Teil der Box) sowie Minimum- und Maximalwerte (untere und obere vertikale Linie). Die Verteilung der Werte ist nicht parametrisch nach Gauss. Die Analyse der Signifikanz erfolgte durch Mann-Whitney-Test, Wilcoxon-Test und Kruskal-Wallis-Test. *P < 0,05; **P < 0.01 und ***P < 0.001 wurden vor der Studie als Signifikanzgrenzen festgelegt.

2.11 Kommunikationsassay („scrape loading“)

Zur Bestimmung der relativen Zell-Zell-Kommunikation im Dermisäquivalent wurde mit einem Skalpell ein gerader Schnitt in das Dermisäquivalent geritzt. Anschließend wurde eine 1%ige (w/v) Lucifer Yellow Lösung (in 0,3M LiCl) für eine Minute zu den Zellen gegeben und nach Waschen die Fluoreszenz aufgenommen (siehe hier: 2.10, Mikroinjektion)

2.12 Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Im SDS-Page wandern Proteine auf Grund eines elektrischen Feldes durch ein dreidimensionales Netzwerk aus Acrylamid und Bis-Acrylamid. Dort werden sie bezüglich ihres Molekulargewichtes aufgetrennt. Durch den Zusatz des amphiphilen Detergenz SDS, das sich stöchiometrisch an die Proteine anlagert, bilden sich Micellen mit konstant negativer Ladung je Masseneinheit. Bei der Probenvorbereitung werden die Proteine mit einem Überschuss an SDS auf 95° C erhitzt und so die Tertiär- und Sekundärstruktur der Proteine zerstört. Zusätzlich werden Schwefelbrücken zwischen Cysteinen durch Zugabe von Dithiothreitol aufgebrochen. Nach dem Lauf ist das Gel für eine Fülle weiterer Bearbeitungen zugänglich: Färbung, immunologische Nachweise (Blotting) oder, bei radioaktiven

Proteinproben, der Autoradiographie. Man kann die Proteine auch im Gel verdauen und wieder herauseluieren. Die chemische Kopolymerisierung der Acrylamidmonomere geschieht durch Zugabe von APS und Temed, wobei Temed die Bildung freier Persulfatradikale katalysiert. Die Porengröße der Gelmatrix ist abhängig von der Konzentration der Acrylamidmoleküle. Es werden Gele im Bereich von 6-15% verwandt. Um eine Verschärfung der Banden zu erreichen, setzt man üblicherweise über das Trenngel (pH 8,8) ein weitporiges Sammelgel mit pH 6,8.

aufzutrennender Bereich [kDa]	Acrylamid-Konzentration [% (w/v)]
12-43	15
16-68	10
36-94	7,5
57-212	5

Tab. 2 Trennbereich verschiedener PAGE-Konzentrationen

Komponenten der Gellösung im Überblick, Angaben gelten für je 10ml

Gesamtvolumen:

Komponente	Trenngel 12%	Trenngel 15%	Sammelgel 6%
50% (w/v) Acrylamid/Bis 100:2,7	2,4ml	3ml	-
50% (w/v) Acrylamid/Bis 100:1	-	-	1,2ml
3M Tris/HCl (pH8,8)	1,85ml	1,85ml	-
0,5M Tris/HCl (pH 6,8)	-	-	2,5ml
60% (w/v) Saccharose	1,15ml	1,15ml	-
20% (w/v) SDS	0,05ml	0,05ml	0,05ml
MQ	4,55ml	3,95ml	6,25ml

Tab. 3 Komponenten des SDS-PAGE

2.13 Immunologischer Nachweis (Western-Blot)

Bei dieser Methode werden Proteine durch ein elektrisches Feld aus einem SDS-Gel auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen und anschließend durch Antikörper nachgewiesen. In dieser Arbeit wurde ein diskontinuierliches Puffersystem und als Nachweis HRP-gekoppelte Sekundärantikörper verwendet.

Zuerst schneidet man je Gel 3 Munktell Filterpapiere und eine Nitrozellulosemembran in Größe des Trenngels zurecht. Je 3 Blatt Filterpapier werden in Anodenpuffer I (0,3M Tris, 10% (v/v) MeOH, pH 10,4), Anodenpuffer II (25mM Tris, 10% (v/v) MeOH, pH 10,4) und Kathodenpuffer (25mM Tris, 10% (v/v) MeOH, 40mM Glycin, pH 9,4) getränkt. Die Blotmembran wird zur Aktivierung kurz in Wasser geschwenkt. Die Graphitelektroden der Blotkammer werden befeuchtet. Auf die Anode legt man dann :

3 Blatt Filterpapier getränkt in Anodenpuffer I, 3 Blatt Filterpapier getränkt in Anodenpuffer II, Nitrozellulose-Membran, Trenngel , 3 Blatt Filterpapier getränkt in Kathodenpuffer. Nach Auflegen der Kathode wird für eine Stunde ein Strom von 100mA angelegt.

Das Gel kann nach dem Blotten zur Kontrolle in PonceauS-Lösung (0.1% PonceauS (w/v) in 5% (v/v) Essigsäure) gefärbt werden. Die Blot-Membran wird über Nacht zur Absättigung in 1% (w/v) fettfreies Milchpulver / TBST (Tris, 50mM ; NaCl,150mM ;0,1%(v/v) Tween 20 ; pH 7,5) gelegt. Am nächsten Tag wird die Membran zwei Stunden mit dem Primärantikörper inkubiert und anschließend viermal für je 15min mit TBST gewaschen. Es folgt eine einstündige Inkubation mit dem HRP-gelabelten Sekundärantikörper (Verdünnung: 1/1000 (v/v))und erneutes Waschen. Zum Nachweis der Bindung werden die beiden Nachweisreagenzien (Luminol-Lösung, Verstärker-Lösung; Pierce Biotechnology, Rockford IL) im Verhältnis 1:1 zusammengegeben und die Membran damit getränkt. Die Membran wird in Frischhaltefolie eingepackt und mit einem Bio-Max-Film in eine Filmkassette gelegt. Der Film wird etwa zwei Minuten exponiert und anschließend in der Dunkelkammer entwickelt und fixiert. Jede Probe hatte einen Gesamtproteingehalt von 15µg. Alle Erstantikörper wurden in einer Verdünnung von 1:1000 (v/v) verwendet.

Verwendete Antikörper:

Rabbit- α -Cx43, Sigma

Maus- α -SMA, Sigma

Rabbit - α - Maus -HRP-gekoppelt, Sigma

Maus- α -Rabbit-HRP-gekoppelt, Sigma

2.14 Immunhistochemischer Nachweis

Die Zellen werden zweimal mit kaltem PBS gewaschen und für 10 min mit kaltem Methanol (-20°C) fixiert. Anschließend wurde das Methanol entfernt und die Zellen weitere zwei Mal mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden mit der Blockierlösung (3% Ziegennormalserum und 0,3% Triton X-100 in TBST) für 45 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde(n) der/die primäre(n) Antikörper (je 1:1000 in TBST mit 1% Ziegennormalserum) über Nacht bei 4°C inkubiert.

Nach viermaligem Waschen für je 15 Minuten mit TBST wurden die fixierten Zellen mit Alexa 488- bzw. Alexa 546 gekoppelten IgG-Sekundäranitkörpern aus Ziege oder Maus (1:1000 in TBST) für 2h bei Raumtemperatur inkubiert. Sie wurden erneut viermal je 15min mit TBST gewaschen und einer anschließenden DAPI-Färbung unterzogen (siehe unten). Abschließend wurden die Glasplättchen mit einem Tropfen Fluoromount (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg) auf einem Objektträger fixiert und mit dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

Verwendet wurden folgende Antikörper:

Rabbit- α -Cx43, Sigma

Maus- α -Zytokeratin, Biomeda

Maus- α -F-Aktin, Sigma

Alexa-488-gekoppeltes α -Maus-IgG

Alexa-546-gekoppeltes α -Maus-IgG

Zum Anfärben von Zellkernen der WB-F344 Zellen wurden die Zellen vor dem Fixieren auf dem Objektträger mit ca. 1 ml DAPI-Lösung (0,5 mg/ml in McIlvaine-Puffer) für 5 min bei RT inkubiert und anschließend dreimal je 5 min mit PBS gewaschen.

2.15 Proteinbestimmung

Proteinbestimmungen erfolgten auf Basis Methode nach Lowry unter Einsatz kommerziell erhältlicher Lösungen (BioRad, DC) gegen Standards aus Rinderserumalbumin nach Angaben des Herstellers.

2.16 Quantifizierung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) mittels Epifluoreszenz

Um die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies in lebenden Zellen zu untersuchen wurden die Zellen auf Glasdeckgläschen ausgesät und bis zur Konfluenz kultiviert. Für das Experiment wurden die Zellen im Dunkeln für 10min mit einer 20 μ M Lösung H₂DCF-DA in vorgewärmtem PSG-Puffer (57 mM NaH₂PO₄, 57 mM Na₂HPO₄, 46 mM NaCl, 56 mM Glucose, 0,1 mM hypoxanthine, pH 8.0) inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PSG-Puffer wurden die Deckgläschen in abgedunkelter Umgebung in die Attofluor-Kammer eingespannt und auf das Mikroskop gelegt. Es folgte die minütliche Aufnahme des Fluoreszenzsignals bei Anregung 488nm und Emission 515-540nm . Die Stimulantien wurden zum angegebenen Zeitpunkt durch vorsichtiges Pipettieren in die Kammer eingebracht. Die gesamte Messung erfolgte im Dunkeln. Die Auswertung der relativen Fluoreszenzen erfolgte mit der Software „Aquacosmos“ der Firma Hamamatsu.

2.17 Quantifizierung von freiem, zellulären Calcium mittels Epifluoreszenz

Zur Messung erhöhter Calciumkonzentrationen in lebenden Zellen wurden die Zellen auf Glasdeckgläschen ausgesät und bis zur Konfluenz kultiviert. Für das Experiment wurden die Zellen 30 Minuten mit dem Calcium-bindenden Fluorochrom Fura2-AM inkubiert. Nach zweimaligem Waschen wurden die Zellen in eine Perfusionskammer eingespannt und unter ein inverses Fluoreszenzmikroskop (QuantiCell 2000 calcium imaging set-up /VisiTech, Sunderland, UK) gebracht. Das Badvolumen der Perfusionskammer wurde durch eine Pumpe bei konstant 200 μ l gehalten. Die Zellen wurden abwechselnd mit Licht der Wellenlängen 340 (gebundenes Calcium) und 380 (ungebundenes Calcium) angeregt. Die Emission wurde bei 480-520nm detektiert. Nach fünf Minuten wurden 100ml einer dreifach konzentrierten Überstandslösung zu den Zellen gegeben. Als Positivkontrolle diente 10ml einer 100mM ATP-Lösung (Endkonzentration: 3,2mM). Die Calciumkonzentration wird dargestellt als Verhältnis 340/380nm.

2.18 RT-PCR

Total-RNA wurde unter Verwendung des Trifast-Reagens (Fa. Peqlab, Erlangen) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Alle Schritte werden bei 4°C durchgeführt. Die Zellen werden nach Waschen mit PBS (140mM NaCl, 10mM Na₂HPO₄) in 300µl Trifast-Reagens lysiert. Nach Zugabe von 60µl Chloroform und kurzer Zentrifugation bilden sich zwei Phasen, von denen man die obere in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Es folgt die Zugabe von 750µl Isopropanol und eine anschließende Zentrifugation bei 14000rpm in einer Tischzentrifuge. Der Überstand wird verworfen und noch zweimal mit je 500µl Ethanol gewaschen. Das Pellet wird in 20µl Rnase-freiem Wasser aufgenommen.

Die Revertasereaktion erfolgte unter Einsatz von 1µg Total-RNA in einem Reaktionsvolumen von 20µl. Die Reaktion lief eine Stunde bei 42°C unter Einsatz von 100 Einheiten (Units) SuperscriptII Rnase H-Reverse Transcriptase (Invitrogen, Karlsruhe) in 50 mM Tris/HCl (pH 8,3), 75 mM KCl, 10 mM dithiothreitol, 3 mM MgCl₂, 1 mM dNTP(je) und oligo(dT) (0.5 mg/20 ml). Nach Ablauf der Reaktion wurde die Revertase bei 70°C für zehn Minuten inaktiviert. 100ng cDNA (2µl) wurden als Einsatz in die PCR-Reaktion gegeben. Der Ansatz enthielt:

20 mM Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP(je), 0,5 mM Sense- sowie Antisense-Primer und 2,5 U HotStarTaq Polymerase in einem Reaktionsvolumen von 20µl.

Stammlösungen:

10X-Puffer (200 mM Tris-HCl (pH 8,3), 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂,)

dNTP-Mix 5 mM dNTP(je),

5 mM Sense- sowie Antisense-Primer

500U/ml HotStarTaq Polymerase

Pipettierschema:

	µl
10X-PCR-Puffer	2
dNTP-Mix	0,4
cx43 Vorwärts-Primer	0,2
cx43Rückwärts-Primer	0,2
Template	2
HotStar-Taq-Polymerase	0,1
H ₂ O	15,1
	20

Primer:

Cx43-sense: 5'-CTATGTGATGCGAAAGGAAGAGAA-3'

Cx43-antisense 5'-ATCGGGGAAATCAAAAGGCTGTG-3'

HPRT-sense 5'-ATTCTTTGCTGACCTGCTGGATT-3'

HPRT-antisense 5'-CTTAGGCTTTGTATTTGCTTTTC-3'

Die PCR für Cx43 wurde mit folgendem Zyklus durchgeführt:

15 Minuten	95°C	}	38 Wiederholungen
30 Sekunden	94°C		
30 Sekunden	56,5°C		
1 Minute	72°C		
10 Minuten	72°C		

Die PCR für HPRT wurde mit folgendem Zyklus durchgeführt:

15 Minuten	95°C	}	34 Wiederholungen
30 Sekunden	94°C		
30 Sekunden	53°C		
1 Minute	72°C		
10 Minuten	72°C		

Die PCR-Produkte hatten Größen von 727bp für Cx43 und 440bp für HPRT. Ihre Auftrennung erfolgte auf eine 1%igen Agarosegel. Die Anfärbung erfolgte mit Ethidiumbromid.

2.19 Agarose-Gelelektrophorese

Durch Agarose-Gelelektrophorese wird DNA nach Größe aufgetrennt und anschließend sichtbar gemacht. Agarose bildet nach dem Erhitzen ein dreidimensionales Polymer aus Polysacchariden. Durch Anlegen einer Spannung wandert die negativ geladene DNA zur Anode und wird durch die Agarose-Gelmatrix nach Größe aufgetrennt. Die Porengröße der Gelmatrix wird durch die Agarosekonzentration bestimmt. Je nach Größe der zu untersuchenden DNA-Fragmente muss also die Agarosekonzentration angepasst werden.

Trennungsbereich von DNA-Fragmenten bei verschiedenen Agarosekonzentrationen:

Agarosekonzentration (% (w/v))	Optimaler Trennbereich [kbp]
0,3	5-60
0,6	1-20
0,7	0,8-10
0,9	0,5-7
1,2	0,4-6
1,5	0,2-3
2,0	0,1-2

Durch Zugabe des Interkalators Ethidiumbromid in die Gelmatrix kann die DNA nach erfolgter Elektrophorese unter ultraviolettem Licht betrachtet werden .

Die benötigte Agarose wird in 1 x TAE-Puffer (40mM Tris, 20mM Essigsäure, 1mM EDTA) gelöst und in der Mikrowelle erhitzt. Nach Abkühlen auf unter 60°C wird das Ethidiumbromid hinzugefügt (0,3µg/ml Endkonzentration). Die Lösung sollte nach dem Kochen schlierenfrei sein. Die noch flüssige Lösung wird in ihr Bett gegossen und der Kamm aufgesetzt. Nach dem Erstarren überführt man das Gel in die Elektrophoresekammer. Nach Auftrag der Proben wird eine Spannung von 100V angelegt. Ein Lauf dauert ca. 15 Minuten.

2.20 Invasionsassay

Die Invasionsfähigkeit der Zellen wurden mit Hilfe des „CELL INVASION ASSAY KIT“ der Firma Chemicon International (Hofheim, TS) nach Angaben des Herstellers gemessen.

Dabei werden die Zellen auf einem Zellkultureinsatz ausplattiert, dessen Boden aus ECMatrix™, einer rekonstituierten Basalmembranmatrix aus Proteinen des Engelbreth Holm-Schwarm-Maustumors, besteht. Die Zellen werden mit den gewählten Attraktantien angeregt, durch das Basalmembranalog zu wandern (Invasion) und anschließend durch einen DNA-bindenden Fluoreszenzmarker quantifiziert.

3 Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von Plattenepithelkarzinomzellen und der von ihnen sezernierte Überstände auf humane Hautfibroblasten untersucht. Kokulturen beider Zelltypen stellen ein einfaches Modell der Tumor-Stroma-Interaktion eines Hauttumors dar. Untersucht wurde der Einfluss der Tumorzellen auf die interzelluläre Zell-Zell-Kommunikation der Fibroblasten, die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen und die daraus resultierenden sekundären Effekte.

3.1 Detektierbarkeit von Connexin43 in sekundären Hautfibroblasten, sekundären Keratinozyten sowie SCL1-Plattenepitheltumorzellen

Um zu zeigen, dass Tumorzellen die Gap Junction-vermittelte Kommunikation von Fibroblasten beeinflussen, wurde zuerst überprüft, ob Connexin43 (Cx43), der in menschlichen Hautzellen am stärksten exprimierte Connexinisotyp, in Fibroblasten vorhanden ist.

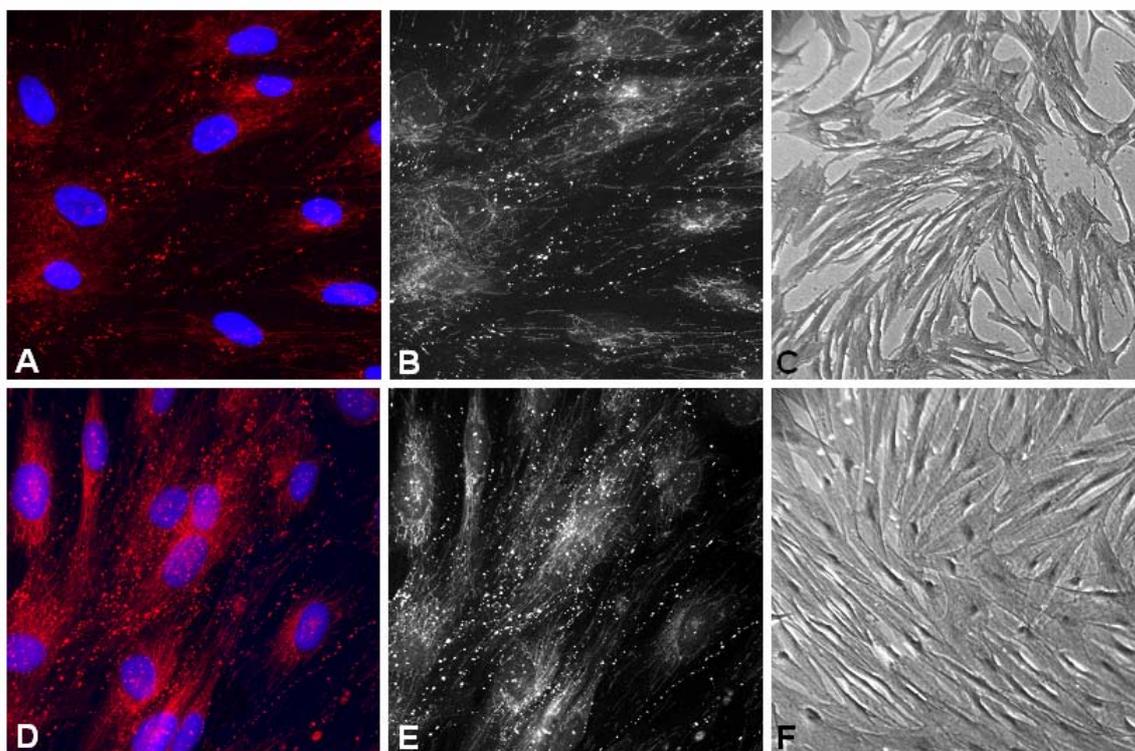


Abb. 10
 Immunocytochemischer Nachweis von Cx43 in subkonfluenten (A,B) und konfluenten (D,E) Fibroblastenmonolayerkulturen. Bild C und F zeigen die Zellmorphologie im Durchlicht. Bild B und E zeigen in der Epifluoreszenzaufnahme die Lokalisation von Connexin43-Plaques. Bild A und D zeigen eine Falschfarbendarstellung der Bilder B und E. Connexin43 ist rot dargestellt. In blau wurden die DAPI gefärbten Zellkerne als Superpositionsbild überlagert.. (A,B,D,E in 400facher; C und F in 250facher Vergrößerung)

Der immunzytochemische Ansatz (Abb. 10) zeigt, dass Connexin43 sowohl in subkonfluenten (A,B), wie in konfluenten Fibroblastenmonolayerkulturen (D,E) vorhanden und in großen Mengen an der Membran lokalisiert ist.

Die gleiche bereits bei Fibroblasten durchgeführte immunzytochemische Untersuchung wurde zur Detektion des Connexin43-Proteins in sekundären humanen Hautkeratinozyten verwendet.

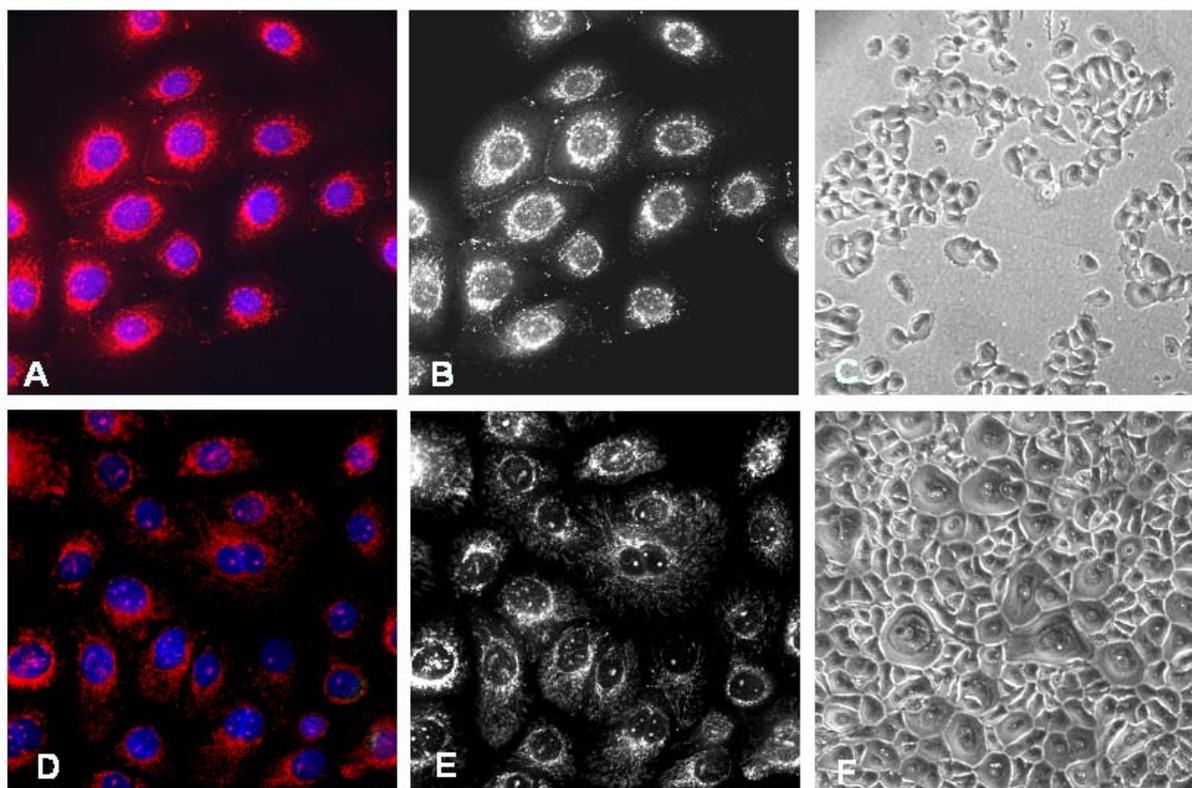


Abb. 11
Immunzytochemischer Nachweis von Cx43 in subkonfluenten (A,B) und konfluenten (D,E) Keratinozytenmonolayerkulturen. Bild C und F zeigen die Zellmorphologie im Durchlicht. Bild B und E zeigen in der Epifluoreszenzaufnahme die Lokalisation von Connexin43-Plaques. Bild A und D zeigen eine Falschfarbendarstellung der Bilder B und E. Connexin43 ist rot dargestellt. In blau wurden die DAPI gefärbten Zellkerne als Superpositionsbild überlagert. (A,B,D,E in 400facher; C und F in 250facher Vergrößerung)

Connexin43 ist erwartungsgemäß in subkonfluenten Keratinozytenmonolayerkulturen vorhanden und in großen Mengen an der Membran lokalisiert (A,B). In konfluenter Kultur zeigen die Keratinozyten nur im kernnahen Bereich ein Cx43-Signal (D,E). Die im Durchlicht sichtbaren, morphologisch veränderten Zellen sind Keratinozyten (E), die in konfluenter Kultur bereits ausdifferenziert und somit nicht mehr teilungsfähig sind. Diese Differenzierung tritt in subkonfluenter Kultur nicht auf (C).

Im Gegensatz zu den normalen subkonfluenten Keratinozyten zeigen subkonfluente wie konfluente Monolayerkulturen der Tumorzelllinie SCL1 nur eine Lokalisation von Cx43 um den Zellkern. SCL1-Zellen zeigen zudem eine verstärkte Expression von Zytokeratin, einem Markerprotein für primäre Keratinozyten und aus diesen entstehenden Tumorzellen.

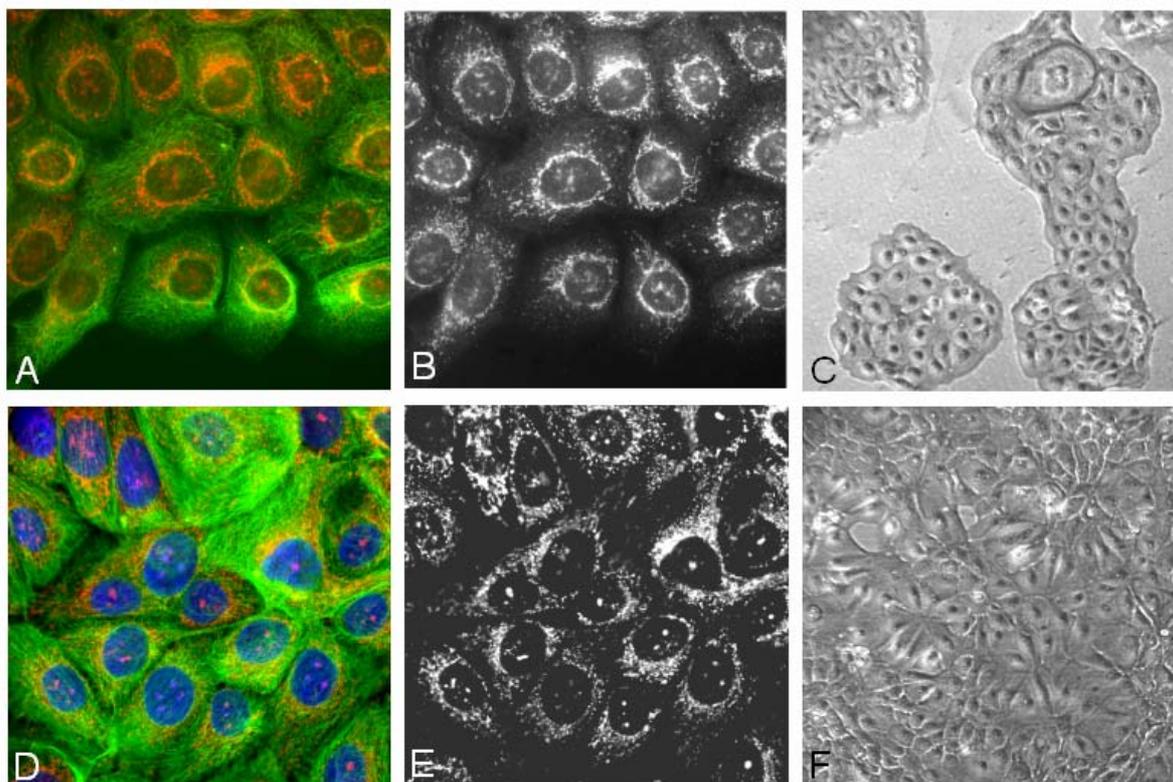


Abb. 12
 Immunzytostaining von subkonfluenten (A,B) und konfluenten (D,E) SCL1-Monolayerkulturen. Bild C und F zeigen die Zellmorphologie im Durchlicht. Bild B und E zeigen in der Epifluoreszenzaufnahme die Lokalisation von Connexin43-Plaques. Bild A und D zeigen eine Falschfarbendarstellung der Bilder B und E. Connexin43 ist rot dargestellt. Zytokeratin ist grün dargestellt. In blau wurden die DAPI gefärbten Zellkerne als Superpositionsbild überlagert. (A,B,D,E in 400facher; C und F in 250facher Vergrößerung)

3.2 Immunzytochemische Darstellung von kokultivierten Fibroblasten und SCL1-Zellen

Um eine mögliche Wirkung der Tumorzellen auf das Connexinmuster der Fibroblasten zu untersuchen, wurden Kokulturen in unterschiedlichen Zellverhältnissen angelegt. Das Verteilungsmuster der Connexin43-Plaques der Fibroblasten wurde erneut immunzytochemisch untersucht. Als Unterscheidungsmerkmal zwischen den Zelltypen diente neben den morphologischen Unterschieden das Markerprotein Zytokeratin .

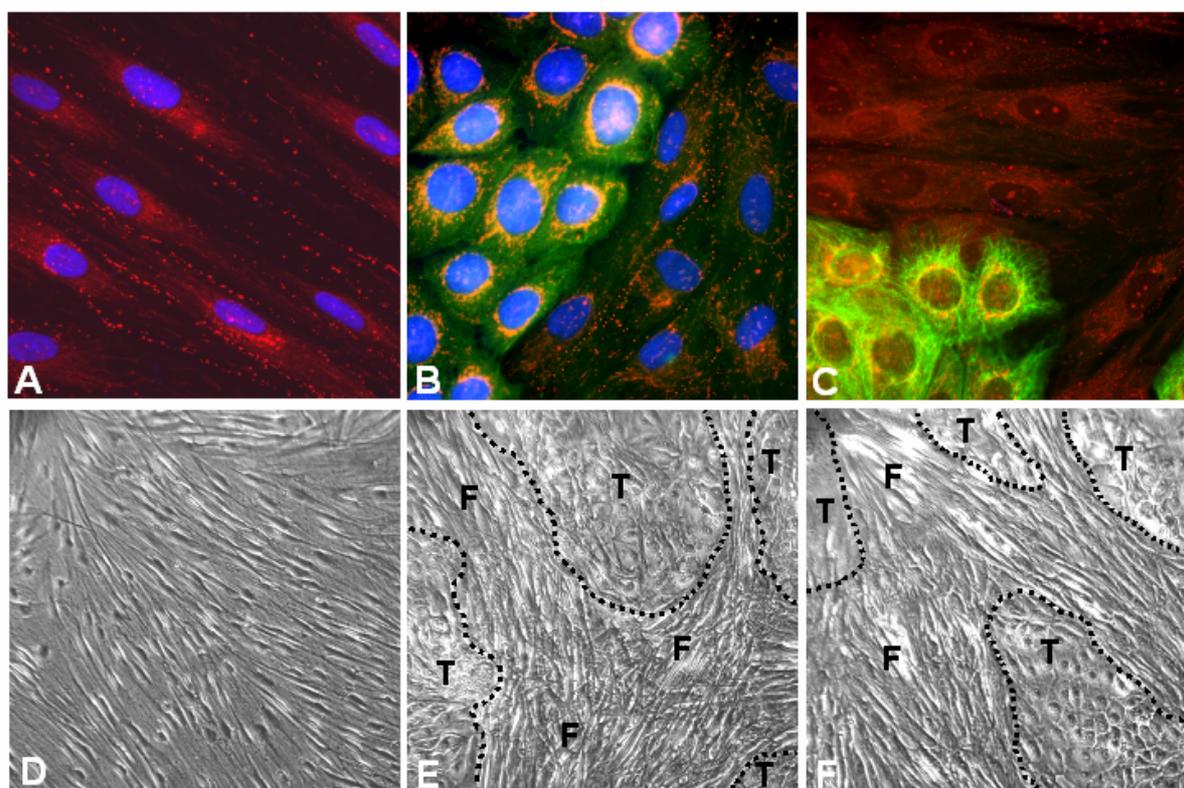


Abb. 13

Immunocytochemische Darstellung einer Fibroblastenmonolayerkultur (A), einer HDF-SCL1-Kokultur im Verhältnis 1:1 (B) und einer HDF-SCL1-Kokultur im Verhältnis 2:1 (C). Die Darstellungen D-F zeigen die Morphologie der Zellen im Durchlicht. (F = Fibroblasten, T = Tumorzellen). A-C zeigen in rot Connexin43, in blau Nukleinsäuren (nicht C) und in grün Zytokeratin. (A-C in 400facher; D-F in 100facher Vergrößerung)

Deutlich zu sehen ist, dass im Gegensatz zu den SCL1-Zellen Hautfibroblasten kein Zytokeratin exprimieren. Die Kokultorexperimente belegen, dass sich das Expressionsmuster des Connexin43-Proteins unter den gewählten Bedingungen weder in den Tumorzellen noch in den Fibroblasten ändert. Das morphologische Bild der Kokultur zeigt zudem, dass sich die Tumorzellen zu Zell-Aggregaten zusammenschließen, die von Fibroblasten umwachsen werden. Dies entspricht im Wesentlichen dem morphologischen *in vivo* Bild eines Tumors, der in stromales Bindegewebe eingebettet ist (s. Abb. 14) (214).

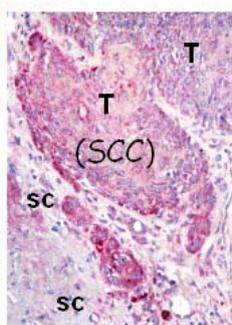


Abb. 14

Histologisches Bild eines Plattenepithelkarzinoms (SCC, T) umgeben von stromalen Fibroblasten(SC) (214)

3.3 Tumorzell-abhängige Verminderung der ZZK von Fibroblasten in der Kokultur

Aus den bisherigen immunzytochemischen Untersuchungen ergab sich die Frage nach einer Tumorzell-abhängigen Veränderung der interzellulären Kommunikation sowohl zwischen isolierten Monolayerkulturen (homologe Kommunikation) als auch in der Kokultur (heterologe Kommunikation). Es wurden Mikroinjektionsexperimente mit einem Fluoreszenz-Tracer-Farbstoff durchgeführt. Die Verteilung des Tracer-Farbstoffes aus der injizierten Zelle in die Nachbarzellen ist ein Maß für den Kopplungsgrad der Zellen.

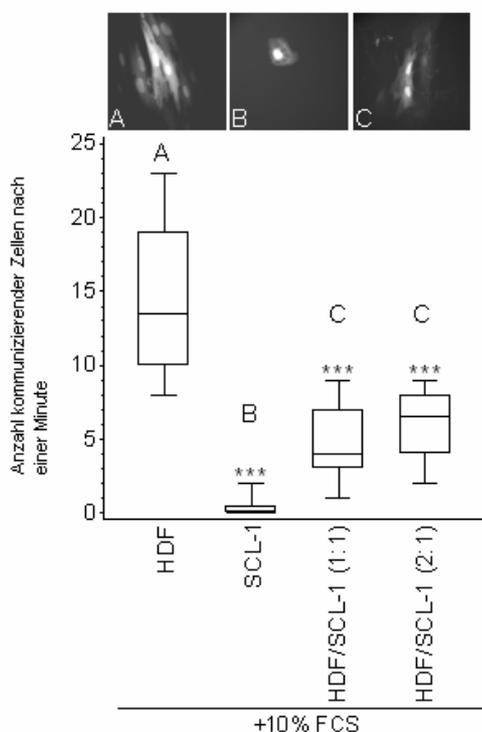


Abb. 15

Einfluss von Kokulturbedingungen und SCL1-Überstand auf die homologe ZZK von Fibroblasten

*Das Diagramm zeigt das relative Maß der Kommunikation von Fibroblasten (A), SCL1-Zellen (B) und zweier Kokulturen im Verhältnis 1:1 und 1:2 (C). Darüber sind exemplarisch repräsentative Epifluoreszenzaufnahmen der Tracerfarbstoffverteilung abgebildet. Die Bilder entstanden eine Minute nach der Injektion.. *** $P < 0,001$ gegenüber HDF.*

Humane dermale Fibroblasten (HDF) sind über Gap Junctions gekoppelt, während SCL1-Zellen keine homologe ZZK zeigen. Dies wird deutlich durch den Vergleich der Medianwerte von HDF (Median = 13,5) und SCL1-Zellen (Median = 0,5). In Serum-haltiger Kokultur mit SCL1-Zellen zeigen die Fibroblasten eine deutlich verminderte homologe Kopplungsrate. Dabei wurden nur Zellen injiziert, die möglichst weit von den Tumorzellen entfernt waren. Die Injektion von Tumor-benachbarten Fibroblasten zeigte keine heterologe Kommunikation mit den Tumorzellen (Daten nicht gezeigt).

3.4 Die homologe ZZK von Hautfibroblasten wird durch einen parakrin wirkenden, von SCL1-Zellen sezernierten Faktor erniedrigt

Die verminderte Kommunikation zwischen den Fibroblasten in den Kokulturen legte nahe, dass ein oder mehrere lösliche Faktoren, die von Tumorzellen sezerniert werden, die homologe Zell-Zell-Kommunikation der Fibroblasten beeinflussen. Aus diesem Grund wurden zwei Tage alte Überstände einer SCL1-Kultur (SN(2d)SCL1) entnommen und auf eine Fibroblastenkultur übertragen. Als Kontrolle dienten Überstände einer Fibroblastenmonolayerkultur (SN(2d)HDF), die als „konditioniertes Medium“ bezeichnet werden.

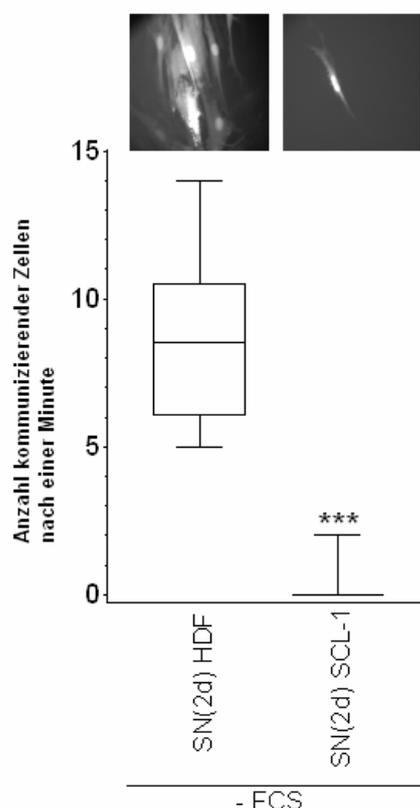


Abb. 16

Einfluss von SCL1-Überstand auf die homologe ZZK von Fibroblasten

Das Diagramm zeigt das relative Maß der Kommunikation von Fibroblasten nach Zugabe von Kontrollüberständen und SCL1-Überständen. Die Überstände wurden je zwei Tage in Serum-freiem Medium akkumuliert. Die Messung erfolgte 24h nach Zugabe der Überstände. Darüber sind exemplarisch repräsentative Epifluoreszenzaufnahmen der Tracerfarbstoffverteilung nach einer Minute nach Injektion abgebildet. *** $P < 0,001$ gegenüber HDF

Die behandelten Fibroblasten zeigten nach 24stündiger Inkubation mit dem SCL1-Überstand eine deutlich verminderte ZZK, die auf mindestens einen parakrin wirkenden Faktor zurückzuführen ist.

3.5 Tumorzell-abhängige Verminderung der homologen ZZK von Fibroblasten im 3D-Dermisäquivalent

Es wurde nun die Frage gestellt, ob es sich bei dem beschriebenen Effekt lediglich um ein artifizielles Phänomen der Monolayerkultur handelt. Um dies auszuschließen, wurde ein dreidimensionales Dermisäquivalent (214) hergestellt. Das System beruht auf der Stimulation von Fibroblasten durch Ascorbylphosphat. Das Ascorbylphosphat stimuliert in Fibroblasten eine überwiegend erhöhte Kollagensynthese. Die Zellen bilden eine Dermis-artige Matrix und sind darin in der Lage, auch übereinander zu wachsen. Da dieses Dermisäquivalent eine sehr feste Konsistenz zeigt, war eine Mikroinjektion nicht möglich. Zur Kommunikationsmessung wurde daher auf das sogenannte „Scrape Loading“ zurückgegriffen. Die Technik ist weniger sensitiv als die Mikroinjektion, eignet sich aber dennoch zur Detektion starker Effekte.

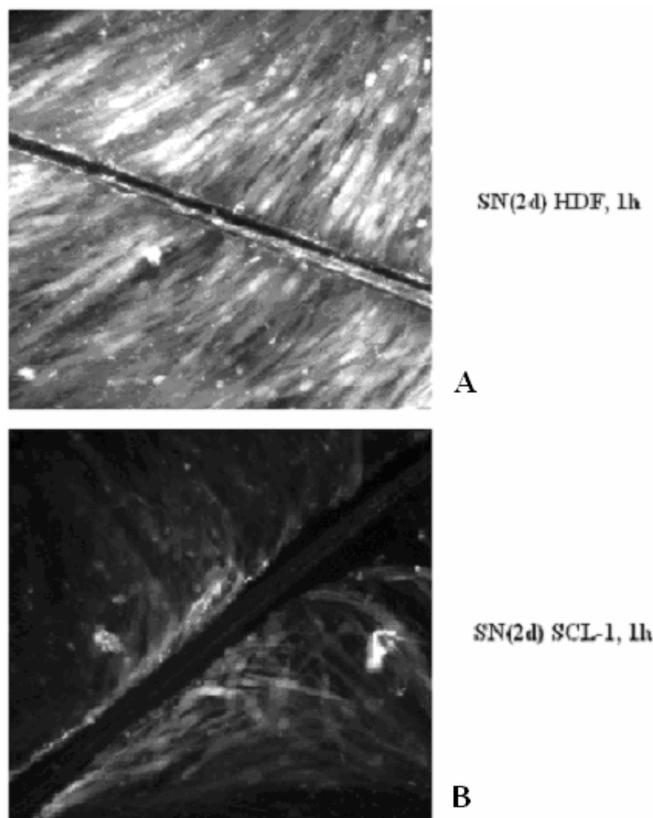


Abb. 17

Einfluss von Tumorzellüberständen auf ein Dermisäquivalent

Scrape Loading eines Dermisäquivalentes unter basalen Bedingungen (A). Die untere Abbildung zeigt das Scrape Loading eines Dermisäquivalentes nach einstündiger Stimulation mit SCL1-Überstand (B).

Die einstündige Inkubation des 3D-Modells mit zwei Tage akkumulierten Tumorüberständen (SN(2d)SCL1) führte zu einer dramatischen Abnahme der Zell-Zell-Kommunikation zwischen den Fibroblasten (B), während die Kopplungsrate der Fibroblasten nach Inkubation

mit konditioniertem Fibroblastenmedium (SN(2d)HDF) für ebenfalls eine Stunde die Zell-Zell-Kommunikation nicht beeinträchtigte. Die Monolayerkultur erscheint somit ein vernünftiges Modellsystem zu sein, um den Effekt der Tumorzell-abhängigen Verminderung der homologen ZZK der Fibroblasten weiter zu untersuchen (SN(2d)HDF).

3.6 Zeitabhängige Wirkung der Tumorzellüberstände auf die homologe ZZK der Fibroblasten

Wir stellten uns die Frage, ob die beobachtete Verminderung der homologen ZZK der Fibroblasten eine Zeitabhängigkeit zeigt. Darum wurden Fibroblasten mit zwei Tage akkumulierten Überständen von SCL1-Zellen (SN(2d)SCL1) behandelt und nach unterschiedlichen Zeiten mikroinjiziert. Als Kontrolle diente konditioniertes Fibroblastenmedium (SN(2d)HDF).

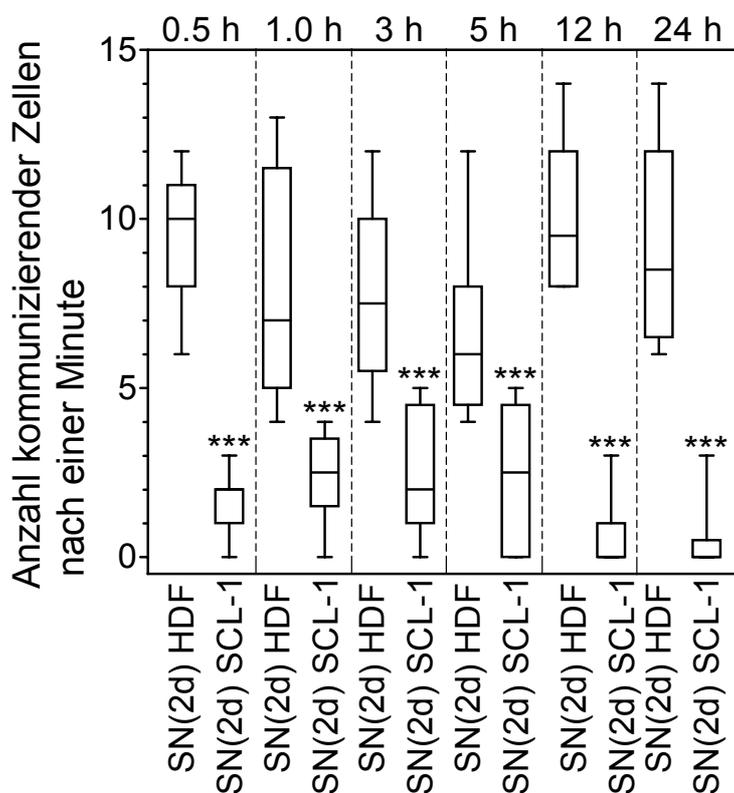


Abb. 18

Zeitabhängigkeit der Herabregulation der homologen ZZK von Fibroblasten durch Tumorzellüberstände

Das Diagramm zeigt das relative Maß der Kommunikation von Fibroblasten nach Zugabe von Kontrollüberständen und SCL1-Überständen. Die Überstände wurden je zwei Tage in Serum-freiem Medium akkumuliert. Die Messung erfolgte zu den angegebenen Zeitpunkten nach Zugabe der SCL1-Überstände. *** $P < 0,001$ gegenüber HDF

Das Experiment zeigt (s. Abb. 18), dass der ZZK-verniedende Effekt der SCL1-Überstände bereits nach 30min auftritt. Eine Messung zu einem früheren Zeitpunkt ist aus technischen Gründen schwierig zu realisieren. Hier nicht dargestellte Versuche deuten aber an, dass 30 Minuten ein sehr früher Zeitpunkt für das Auftreten des Effektes ist, der nicht immer reproduzierbar scheint. Die ZZK der Fibroblasten ist aber immer nach einer Stunde herunterreguliert. Über den gesamten untersuchten Zeitraum blieb die Kommunikation zwischen den Fibroblasten unter Tumorzelleinfluss signifikant erniedrigt, was sich in den niedrigen Medianwerten ausdrückt.

3.7 Die Wirkung der SCL1-Überstände ist reversibel

Da für die Untersuchungen zur Zeitabhängigkeit die Fibroblasten während des gesamten Untersuchungszeitraums mit den Tumorzellüberständen behandelt wurden, blieb die Frage zu klären, ob es sich um einen permanenten oder einen reversiblen Effekt handelte. Dazu wurden Fibroblasten zunächst mit Überstand von Tumorzellen behandelt, wodurch die ZZK herabgeregelt wurde. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und mit Serum-haltigem Kulturmedium (DMEM⁺) (SN(2d)SCL1(1,5h)+SN(2d)DMEM(1,5h)) bzw. HDF-Überstand (SN(2d)SCL1(1,5h)+SN(2d)HDF(1,5h)) behandelt. Nach 90 Minuten wurde die ZZK gemessen.

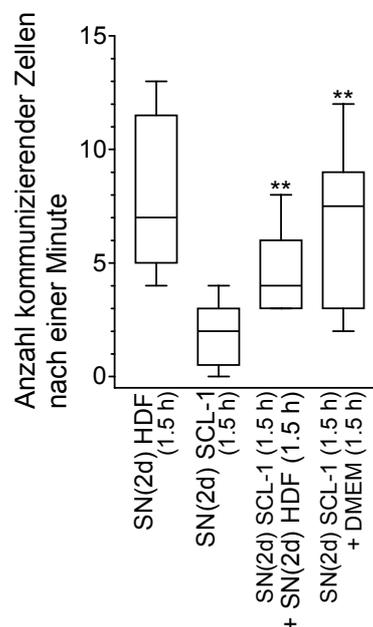


Abb. 19

Reversibilität der Herabregulation der homologen ZZK von Fibroblasten nach Behandlung mit Tumorzellüberstand

Das Diagramm zeigt Kontrollzellen (SN(2d)HDF(1,5h)) und mit SCL1-Überständen behandelte Zellen (SN(2d)SCL1(1,5h)) nach 90 Minuten. Zudem zeigt es SCL1-behandelte Zellen, die nach Entfernen der SCL1-Überstände weitere 90 Minuten mit DMEM⁺ (SN(2d)SCL1(1,5h)+SN(2d)DMEM(1,5h)) bzw. mit HDF-Überständen (SN(2d)SCL1(1,5h)+SN(2d)HDF(1,5h)) behandelt wurden.. *** $P < 0,01$ gegenüber SN(2d)SCL1(1,5h)

Der Medianwert der Zahl kommunizierender Zellen wurde durch Tumorzellüberstand (SN(2d)SCL1) von 7 (SN(2d)HDF(1,5h)) auf 2 reduziert und konnte mittels konditioniertem Medium (SN(2d)SCL1(1,5h)+SN(2d)HDF(1,5h)) bzw. Zellkulturmedium (SN(2d)SCL1(1,5h)+SN(2d)DMEM(1,5h)) angehoben werden. Das Experiment zeigt deutlich, dass der Effekt auf die Fibroblastenkommunikation nach Entfernen des SCL1-Überstandes reversibel ist. Die Kommunikationsfähigkeit der Fibroblasten ist nach 90 Minuten zumindest in Zellkulturmedium nahezu vollständig wiederhergestellt, was durch einen Medianwert von 7,5 reflektiert wird. Die Geschwindigkeit der Reversion lässt allerdings

keinen Schluss auf den zugrunde liegenden Mechanismus zu. Hier könnten translationale wie posttranslationale Effekte ebenso wie Proteinbiosynthese oder Degradation eine Rolle spielen.

3.8 Maligne Hautzellen vermindern die homologe ZZK von Fibroblasten

Neben den SCL1-Überständen wurden weitere Überstände von Plattenepithelkarzinomzelllinien und Melanomzelllinien getestet und mit dem Überstand der immortalen aber nicht malignen Zelllinie HaCaT verglichen. Bei A431 handelt es sich wie bei SCL1 um eine Plattenepithelkarzinomzelllinie. A375-Zellen repräsentieren eine maligne Melanomzelllinie. HaCaT-Zellen sind immortale Zellen, die sich spontan aus primären Keratinozyten entwickelten (215). Sie formen nach Transplantation keinen Tumor und dienen als Modell einer neoplastischen Transformation, sozusagen einer Krebsvorstufe.

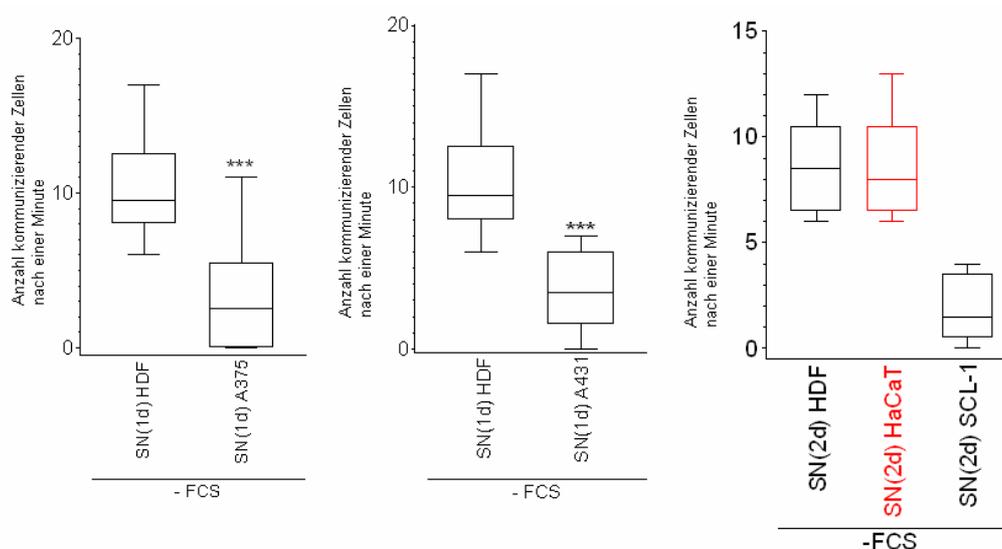


Abb. 20

Einfluss von Überständen verschiedener Zellentypen auf die homologe ZZK von Fibroblasten
 Die Fibroblasten wurden mit konditioniertem Medium (SN(1d)HDF), verschiedenen Tumorzellüberständen (SN(1d)A375), (SN(1d)A431) oder Überständen von immortalen Zellen (SN(2d)HaCaT) behandelt. *** $P < 0,001$ gegenüber SN(1d)HDF

Die ZZK der Fibroblasten wird durch die Überstände von A431-Zellen, A375-Zellen und der SCL1-Zellen heruntergeregelt. Der Effekt tritt nicht mit HaCaT-Überständen auf. Dies deutet darauf hin, dass die wirksamen löslichen Faktoren speziell in Überständen von Tumorbildenden Zellen enthalten sind. In weiteren hier nicht explizit dargestellten Versuchen konnte diese Annahme untermauert werden. Es zeigte sich, dass dieser Effekt sogar Speziesübergreifend ist.

3.9 Transkriptionell, translational und posttranslational unabhängige Verminderung der homologen ZZK von Fibroblasten

Das Schließen der Gap Junctions und damit verbunden die Verminderung der homologen ZZK der Fibroblasten mittels parakriner Effekte impliziert die Frage nach dem zugrunde liegenden Mechanismus. Möglich ist eine verminderte Proteinmenge, eine Internalisierung des Cx43-Proteins, ein Calcium-Effekt oder eine posttranslationale Modifikation des Connexins. Diese waren Ausgangspunkt der Untersuchungen. Ein immunzytochemischer Ansatz sollte Klarheit über Veränderungen der subzellularen Verteilung der Connexin-Plaques geben.

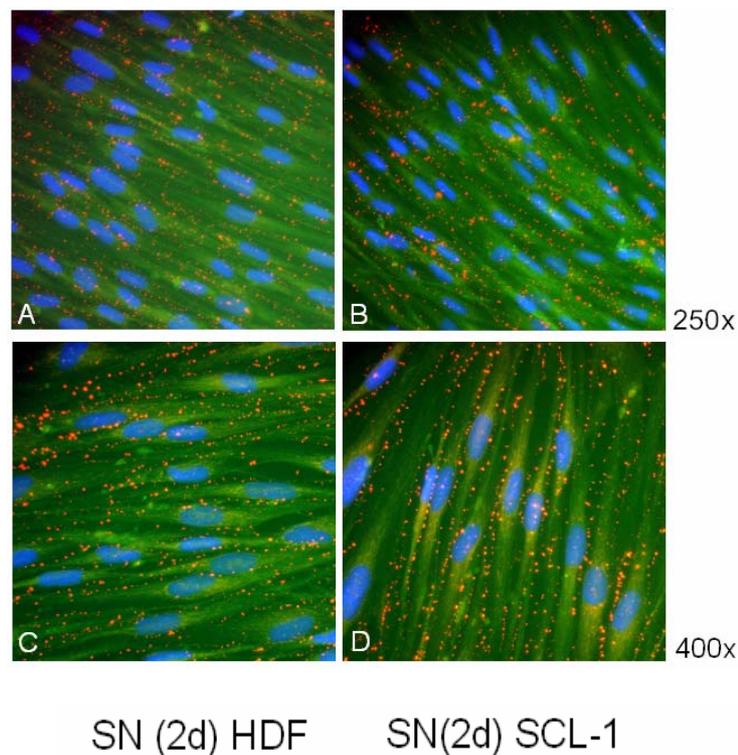


Abb. 21

Subzelluläre Verteilung von Cx43-Plaques in Fibroblasten nach Stimulation mit Tumorzellüberstand

Bild A & B zeigen eine Fibroblastenmonolayerkultur in 250facher, Bild C & D in 400facher Vergrößerung. Die Zellen in A,C wurden mit HDF-Überständen behandelt (SN(2d)HDF). Die Zellen in B,D wurden mit SCL1-Überständen behandelt (SN(2d)SCL1). Angefärbt ist Cx43 in rot, F-Actin in grün und Nukleinsäure in blau.

Das Experiment zeigt, dass die Zugabe der SCL1-Überstände keinen Einfluss auf die subzelluläre Verteilung der Cx43-Proteine in Fibroblasten hat. Das Protein bleibt nach Stimulation mit Tumorüberständen (SN(2d)SCL1) wie auch unter Kontrollbedingungen mit konditioniertem Medium (SN(2d)HDF) Membran-lokalisiert. Die verminderte ZZK nach Zugabe des Tumorüberstandes ist nicht durch Internalisierung der Connexine zu erklären.

Zur Untersuchung einer möglichen Cx43-Induktion auf transskriptioneller Ebene wurde eine RT-PCR durchgeführt. Als Haushaltsgen zur Ladekontrolle diente HPRT (Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase). Als Positivkontrolle wurde das Cx43-Gen durch eine 72stündige Zugabe von 10 μ M Calcitriol, einem Vitamin D-Derivat, welches für seinen stimulatorischen Effekt auf das Connexin bekannt ist (216), stimuliert.

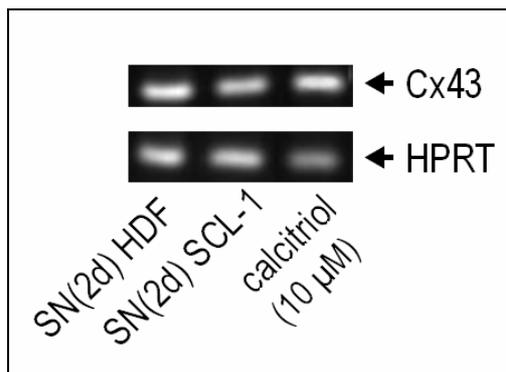


Abb. 22

Modulation des Cx43-mRNA-Gehaltes der Fibroblasten nach Stimulation mit Tumorzellüberstand und Calcitriol

Die Abbildung zeigt das Ethidiumbromid-gefärbte Agarosegel einer RT-PCR-Reaktion. Die oberen Banden zeigen die Cx43-mRNA, die unteren Banden zeigen die HPRT-mRNA als Haushaltsgen. Abgebildet sind Kontrollzellen (SN(2d)HDF), mit SCL1-Überstand stimulierte (SN(2d)SCL1) und mit 10 μ M Calcitriol-stimulierte Zellen (Calcitriol 10 μ M).

Im Gegensatz zu Calcitriol-stimulierten Zellen, die einen 1,8fach erhöhten steady-state-mRNA-Gehalt gegenüber Kontrollzellen (SN(2d)HDF) aufweisen, zeigen mit SCL1-Überstand behandelte Fibroblasten (SN(2d)SCL1) keinen signifikant erhöhten mRNA-Gehalt. Dies deutet an, dass die durch Tumorzellüberstände vermittelte Verminderung der homologen ZZZ von Fibroblasten unabhängig von einem Gen-regulatorischen Effekt der Tumorüberstände ist.

Die häufigste posttranslationale Modifikation von Connexin43 ist die Phosphorylierung. Cx43 ist in mannigfaltigerweise phosphorylierbar. Um eine Phosphorylierung zu messen, wurde ein Western-Blot durchgeführt. Als Positivkontrolle wurden die Fibroblasten mit TPA (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate) stimuliert, einer Substanz, die durch Aktivierung der Proteinkinase C zu einer Hyperphosphorylierung des Cx43-Proteins führt (217).

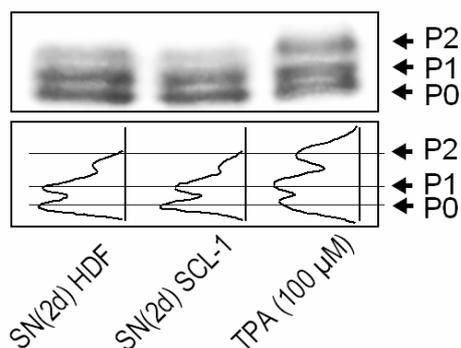


Abb. 23

Translationale und posttranslationale Modifikation von Connexin43

Immundetektion von Cx43 nach 24stündiger Behandlung mit konditioniertem Medium (SN(2d)HDF), Tumorüberstand (SN(2d)SCL1) und 15minütiger Behandlung mit 100µM TPA (als Positivkontrolle). P0 ist unphosphoryliert, P1 und P2 sind phosphoryliert. 15µg/Probe

Der Western-Blot zeigt im basalen und stimulierten Zustand je drei Banden, die mit P0 bis P2 bezeichnet sind. Diese Banden repräsentieren unterschiedliche Phosphorylierungsformen des Proteins. Der Blot zeigt keine Veränderung des Phosphorylierungsmusters nach Stimulation mit SCL1-Überstand, allerdings einen starken Shift zur P2-Bande bei der TPA-Kontrolle. Die deutet daraufhin, dass sich die Netto-Phosphorylierung des Proteins durch Tumorüberstandzugabe nicht ändert und somit die homologe ZZK der Fibroblasten unabhängig von der Cx43-Phosphorylierung scheint.

Um diese Hypothese zu stützen, wurden Versuche mit Inhibitoren unternommen. Es wurde untersucht, ob die Tumorzell-abhängige Verminderung der ZZK der Fibroblasten durch den MEK1,2-Inhibitor U0126 verhindert werden kann. MEK1 und MEK2 (MAPK/Erk-Kinase1/2) sind Kinasen innerhalb der EGFR (epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor)-Signalkaskade. Diese werden nach Stimulation von Zellen mit EGF aktiviert und aktivieren ihrerseits ERK1 und ERK2 (extrazellulär regulierte Kinase-1 und -2). Von ERK1 und ERK2 ist bekannt, dass diese Kinasen Connexin43 phosphorylieren können und damit die ZZK erniedrigen (218).

Zudem wurde in einem weiteren Ansatz Natriumvanadat (Na_3VO_4), ein allgemeiner Phosphotyrosinphosphatase-Hemmer, benutzt (s. Abb.24), um die Reversibilität der durch Tumorüberstände verminderten ZZK der Fibroblasten zu untersuchen.

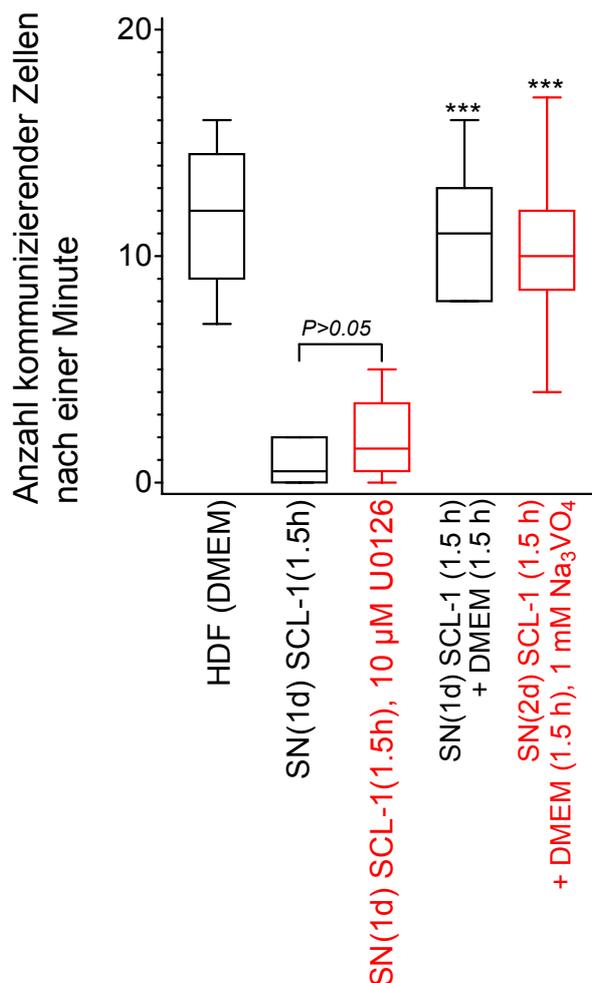


Abb. 24

Effekt des Mek1,2-Inhibitors U0126 und des Tyrosinphosphatase-Inhibitors Na₃VO₄ auf die ZZK von Fibroblasten.

Die ZZK der Fibroblasten wurden unter Kontrollbedingungen (DMEM), nach Behandlung mit Tumorzellüberstand (SN(1d)SCL1(1,5h)) und nach Behandlung mit Tumorzellüberstand und gleichzeitiger Gabe des Mek1,2-Inhibitors U0126 (SN(1d)SCL1(1,5h), 10µMU0126) gemessen. Zudem wurde die ZZK der Fibroblasten nach Behandlung mit SCL1-Überständen und nachfolgender Behandlung mit Kulturmedium mit (SN(1d)SCL1(1,5h)+DMEM(1,5h),10µM Na₃VO₄) und ohne SN(1d)SCL1(1,5h)+DMEM(1,5h) Natriumvanadat gemessen. ***P < 0,001 gegenüber (SN(1d)SCL1(1,5h))

Das Experiment mit den inhibierend wirkenden Substanzen zeigt, dass die signifikant erniedrigte ZZK der Fibroblasten nicht von MEK1,2 abhängig ist. Die Medianwerte mit (SN(1d)SCL1(1,5h)10µM U0126) und ohne (SN(1d)SCL1(1,5h)) den MEK1,2-Inhibitor sind nicht signifikant unterschiedlich. Der Inhibitorversuch mit U0126 zeigt, dass im untersuchten System dieser Weg nicht zur Regulation verwendet wird. Der zweite Versuchsteil mit dem Tyrosinphosphataseinhibitor Natriumvanadat zeigt, dass zur Reversion des Effektes keine Tyrosinphosphatase benötigt wird. Dies deutet darauf hin, dass bei der Verminderung der ZZK von Fibroblasten durch Tumorzellüberstände keine Tyrosinkinase involviert ist und der beobachtete Effekt somit tatsächlich unabhängig von Phosphorylierungszuständen zu sein scheint.

3.10 Calcium-abhängige Verminderung der homologen ZZK von Fibroblasten

Da die Verminderung der homologen Kommunikation von Fibroblasten weder durch Phosphorylierung noch durch Verminderung der Proteinmenge oder Veränderung der subzellularen Lokalisation zu erklären war, wurde untersucht, ob eine Erhöhung des zytoplasmatischen Calciumspiegels an dem Effekt beteiligt ist. In einem ersten Ansatz wurde das im Medium vorhandene Calcium mittels EGTA (Ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid) komplexiert.

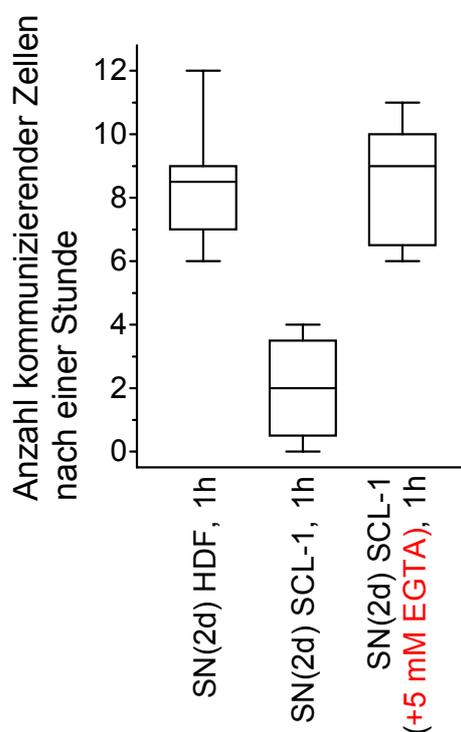


Abb. 25

Wirkung des Calciumchelators EGTA auf die ZZK von Fibroblasten.

Konfluenten Fibroblasten wurden mit konditioniertem Fibroblastenmedium (SN(2d)HDF,1h), mit Tumorzellüberstand (SN(2d)SCL1,1h) und mit Calcium-freiem Tumorzellüberstand (SN(2d)SCL1(+5mM EGTA),1h) behandelt und ihre ZZK mittels Mikroinjektion gemessen.

Das Experiment zeigt, dass die Verminderung der ZZK von Fibroblasten durch Tumorzellüberstände bei Abwesenheit von extrazellulärem Calcium nicht auftritt. Dies ist ein starker Hinweis auf die Beteiligung von Calcium an der Signaltransduktion des Effektes.

Um den Einfluss von Calcium direkt zu messen, wurden Zellen mit dem Calcium-bindenden Fluorochrom Fura2-AM inkubiert. Diese Substanz ist ein Acetomethylester des Fluorochroms Fura2. Der Ester wird von den Zellen aufgenommen und hydrolytisch gespalten. Die hydrolysierte Substanz kann die Zellmembran nicht mehr passieren und verbleibt so in der

Zelle. Bei Bindung von Fura2 mit Calcium kommt es zu einer Verschiebung des Fluoreszenzspektrums von 380nm nach 340nm. Diese Verschiebung kann mittels Ratioimaging vermessen werden.

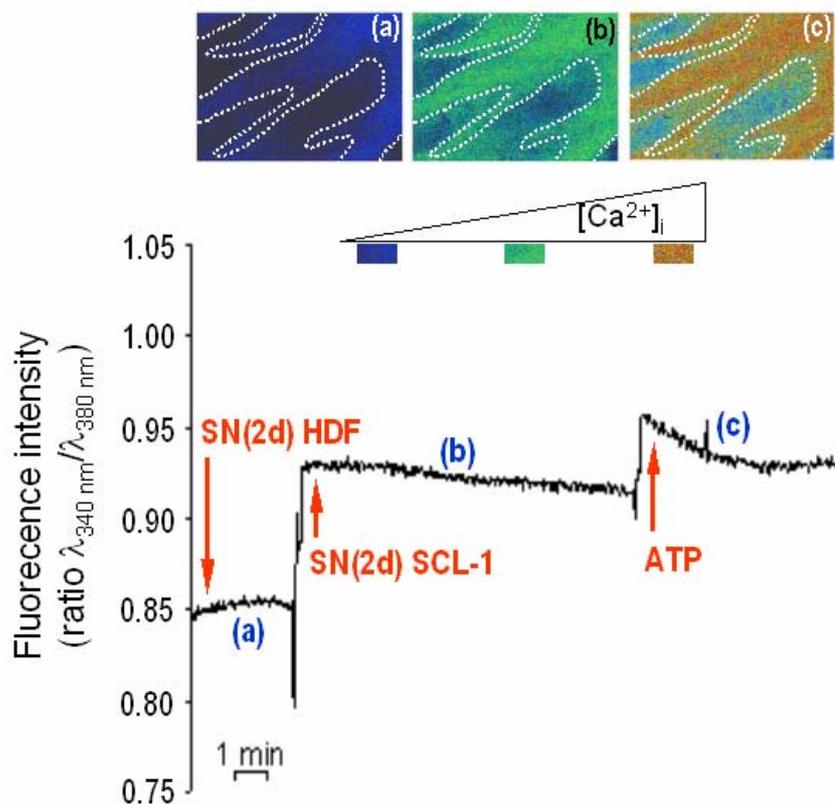


Abb. 26

Modulation der intrazellulären Calciumkonzentration von Fibroblasten nach Stimulation mit Tumorzellüberstand und ATP
Verhältnis 340nm/380nm-Fluoreszenzmessung Fura2-AM beladener Fibroblasten unter Kontrollbedingungen (SN(2d)HDF), nach
Stimulation mit Tumorzellüberständen (SN(2d)SCL1) und ATP als Positivkontrolle.

Die Tumorzellüberstände (SN(2d)SCL1) induzieren einen schnellen Anstieg der zytoplasmatischen Calciumkonzentration, die während der Messung nicht auf Kontrollniveau (SN(2d)HDF) zurückgeht. Das Verhältnis der gemessenen Fluoreszenzintensitäten (340/380nm), ein grober Indikator der Calciumkonzentration, ist kleiner als 1,0. Dies weist auf eine zytoplasmatische Calciumkonzentration hin, die kleiner als 60nM ist und somit nicht ausreichend groß ist für einen direkten Verschluss der Gap Junctions durch Calcium. Die ATP-Positivkontrolle zeigt, dass die Detektionsgrenze der Messung nicht erreicht wurde (243,244).

Eine mögliche Folge des Calciumeinstroms könnte die Aktivierung von Calmodulin sein. Calmodulin ist ein ubiquitär exprimiertes saures Protein, das Calciumionen binden kann und als aktivierender Interaktionspartner vieler Proteine bekannt ist. Calmodulin konnte bereits als negativ regulierender Interaktionspartner für eine Connexin-Isoform bestätigt werden (246).

Um eine mögliche Kolo­kalisierung von Calmodulin mit Connexin43 zu untersuchen, wurde erneut die Methode der Immunzytochemie gewählt.

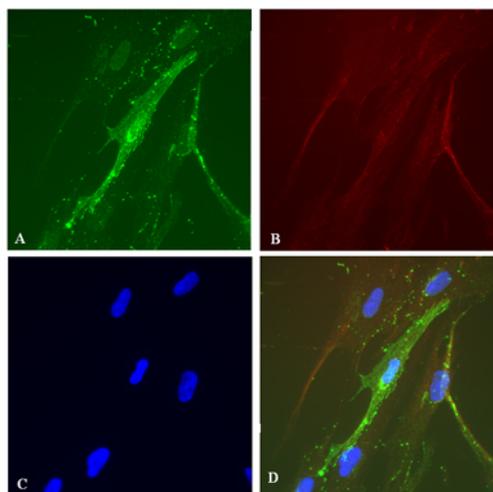


Abb. 27

Immunzytochemischer Nachweis von Cx43 und Calmodulin in subkonfluenten Fibroblasten.

Die Zellen wurden mit konditioniertem Medium behandelt und nach 24 Stunden wurde Cx43 (A), Calmodulin (B) und Nukleinsäuren (C) nachgewiesen. D ist ein Superimpositionsbild von A, B und C. Die Farben sind Falschfarben. Die Vergrößerung aller Abbildung ist 400fach.

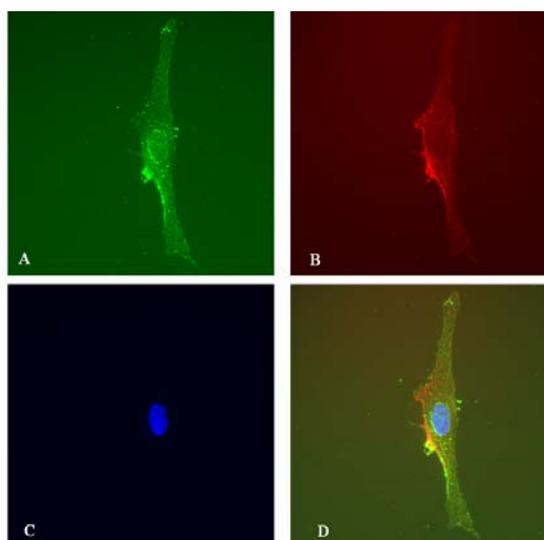


Abb. 28

Immunzytochemischer Nachweis von Cx43 und Calmodulin in subkonfluenten Fibroblasten. Die Zellen wurden mit Tumorzellüberständen behandelt und nach 24 Stunden wurde Cx43 (A), Calmodulin (B) und Nukleinsäuren (C) nachgewiesen. D ist ein Superimpositionsbild von A, B und C. Die Farben sind Falschfarben.

Der immunzytochemische Nachweis zeigt exemplarisch eine mögliche Kolo­kalisierung von Cx43 mit Calmodulin. Die erhöhte Intensität der Calmodulinfärbung in Abb.28 im Gegensatz zu Abb.27 nach Behandlung mit Tumorzellüberständen gibt erste Hinweise auf eine durch parakrine Effekte zurückzuführende Expression von Calmodulin. Dies dient als Hinweis für zukünftige Arbeiten.

3.11 Reaktive Sauerstoffspezies (ROS)-abhängige Verminderung der homologen ZZK von Fibroblasten

Da der Calciumeinstrom nicht ausreichend hoch ist, um die Reduzierung der ZZK zu erklären, wurde getestet, ob die Reaktion ROS-abhängig ist. ROS dienen in verschiedensten Signaltransduktionswegen als „second messenger“, können aber bei einem oxidativen Stress pathophysiologische Prozesse in Gang setzen (218-220). Zuerst wurde daher getestet, ob die Herabregulation mit dem allgemeinen ROS-Scavenger NAC (N-Acetyl-L-Cystein) verhindert werden kann. NAC ist eine Thiolverbindung und ein Vorläufermolekül von L-Cystein und Glutathion. Als Quelle von Sulfhydrylgruppen kann NAC direkt reaktive Sauerstoffspezies wie Wasserstoffperoxid, Hydroxylradikale oder Superoxid detoxifizieren. NAC hat nachgewiesenermaßen positive Effekte bei pathologischen Prozessen wie Krebs oder Herzerkrankungen (221).

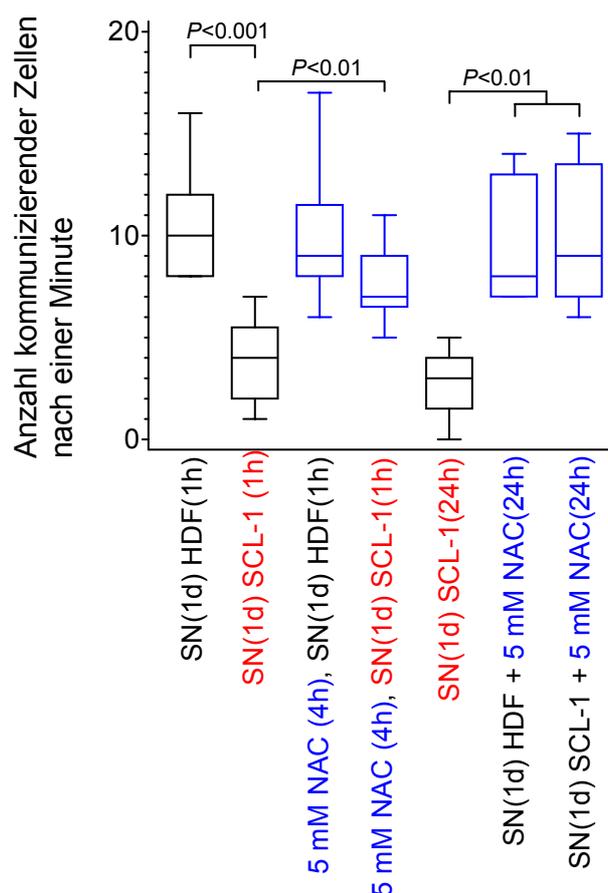


Abb. 29

Einfluss von antioxidativ wirkendem N-Acetyl-Cystein (NAC) auf die ZZK der Fibroblasten.

Fibroblasten wurden wie folgt inkubiert: in konditioniertem Medium für eine Stunde (SN(1d)HDF(1h)), mit Tumorzellüberständen für eine (SN(1d)SCL1(1h)) und 24 Stunde, (SN(1d)SCL1(24h)), vorinkubiert mit 5mM NAC für vier Stunden und anschließender Zugabe von konditioniertem Medium (5mM NAC(4h),SN(1d)HDF(1h)) und Tumorzellüberständen (5mM NAC(4h),SN(1d)SCL1(1h)), oder 24 Stunden in NAC-haltigem konditioniertem Medium (SN(1d)HDF+5mM NAC(24h)) bzw. mit Tumorzellüberstand (SN(1d)SCL1+5mM NAC(24h))

Das Experiment (s. Abb. 29) zeigt, dass der allgemeine Radikal-Scavenger NAC die basale ZZK der Fibroblasten (SN(1d)HDF(1h)) weder nach vier (5mM NAC(4h),SN(1d)HDF(1h)) noch nach 24 Stunden (SN(1d)HDF+5mMNAC(24h)) signifikant verändert. Nach vierstündiger Vorinkubation mit 5mM NAC und anschließender Inkubation mit Tumorzellüberständen für eine Stunde (5mM NAC(4h),SN(1d)SCL1(1h)) kann NAC die Verminderung der ZZK der Fibroblasten durch Tumorüberstände (SN(1d)SCL1(1h)) noch nicht vollständig verhindern. Dies ist erst nach 24 Stunden der Fall (SN(1d)SCL1+5mM NAC(24)) wobei nicht mit NAC vorinkubiert wurde.

Die Wirkung von NAC deutet auf einen Einfluss von ROS im Zusammenhang mit der Verminderung der ZZK von Fibroblasten hin. Um dies detaillierter zu untersuchen, wurden konfluente Fibroblasten mit antioxidativ wirkendem Selen in Form des Salzes Natriumselenit (Na_2SeO_3) inkubiert und danach verschiedenen Behandlungsregimen unterworfen.

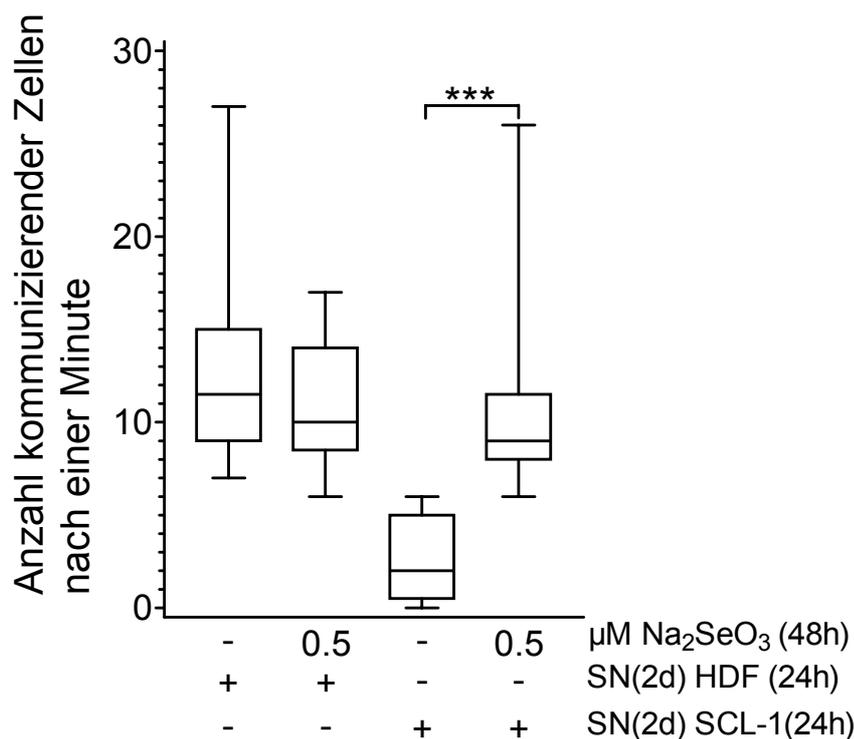


Abb. 30

Einfluss des Mikronährstoffs Natriumselenit auf die ZZK von Fibroblasten nach 72stündiger Vorinkubation.

*Konfluente Fibroblasten wurden in Serum-haltigem Medium für 48 Stunden mit Selenit vorinkubiert (0,5μM) , danach für weitere 24 Stunden mit Selen-haltigem oder unbehandeltem konditioniertem Medium (SN(2d)HDF(24h)) oder Tumorzellüberstand (SN(2d)SCL1(24h)) behandelt. (-) : unbehandelt. ***P< 0,001 gegenüber (SN(2d)HDF(24h))*

Das Experiment zeigt (S. Abb. 30), dass eine 72stündige Inkubation mit Natriumselenit die Basalkommunikation der Fibroblasten (linke Box) nicht beeinflusst (zweite Box von links). Der die ZZK der Fibroblasten vermindern Effekt der Tumorüberstände (zweite Box von rechts) tritt jedoch bei Vorinkubation mit Selenit und anschließender Gabe der Tumorzellüberstände nicht mehr auf (rechte Box). Wie schon zuvor die Wirkung von NAC, deutet auch die Selenitwirkung auf einen Einfluss reaktiver Sauerstoffspezies bei der Verminderung der ZZK hin.

In einem weiteren experimentellen Ansatz wurde die Frage nach der wirksamsten, nicht toxischen Konzentration von Selen im Zusammenhang mit der Aufrechterhaltung der homologen ZZK der Fibroblasten untersucht. Die Zellen wurden für 48 Stunden mit Natriumselenit in Konzentrationen von 1-500nM vorinkubiert. Anschließend wurde das selenhaltige Medium durch Überstände von SCL1-Zellen ersetzt, die ebenfalls mit Selen gleicher Konzentration versetzt waren und einen weiteren Tag inkubiert. Nach dieser Behandlung wurde die homologe ZZK der Fibroblasten gemessen.

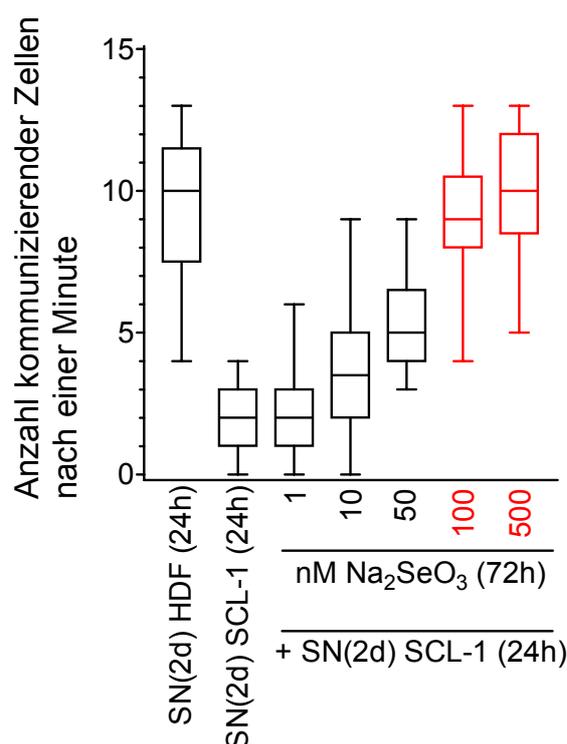


Abb. 31

Dosisabhängige Wirkung von Natriumselenit auf die homologe Kommunikation von Fibroblasten
 Konfluente Fibroblasten wurden in Serum-haltigem Medium für 48 Stunden mit Selenit unterschiedlicher Konzentration vorinkubiert, danach für weitere 24 Stunden mit selenhaltigem Tumorzellüberstand (SN(2d)SCL1 (24h)) behandelt

Das Experiment zeigt eine klare Dosis-abhängige Wirkung von Selenit auf die Wiederherstellung der homologen Kommunikation der Fibroblasten nach vorheriger Herunterregulation mit Tumorzellüberständen (SN(2d)SCL1(24h)). Natriumselenit ist nach

72stündiger Seleninkubation mit mindesten 100nM in der Lage, die homologe ZZK der Fibroblasten trotz Behandlung mit Überständen von SCL1-Tumorzellen zu erhalten.

Nach den bisherigen indirekten Hinweisen zum Einfluss von durch Tumorzellüberständen generierten erhöhten Konzentration reaktiver Sauerstoffspezies auf die ZZK zwischen konfluenten Fibroblasten wurde im Folgenden die intrazelluläre ROS-Konzentration mittels eines Fluoreszenzfarbstoffes ($H_2DCF-DA$) qualitativ bestimmt. $H_2DCF-DA$ ist ein Fluorochrom, welches nach Bindung mit Peroxiden und anderen ROS einen Fluoreszenzpeak entwickelt. Dieser kann mittels Fluoreszenzmikroskopie gemessen werden.

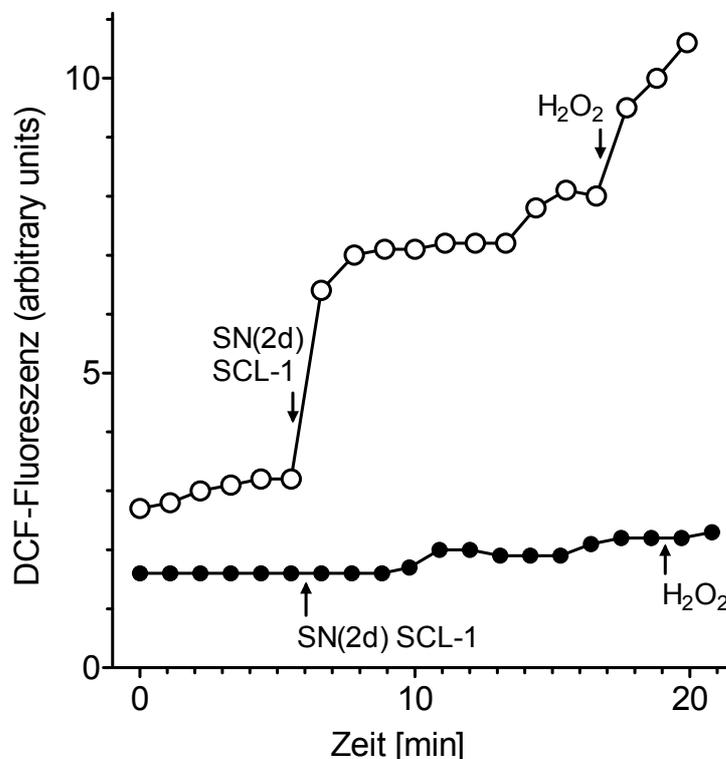


Abb. 32

Modulation der intrazellulären ROS-Menge von Fibroblasten nach Stimulation mit Tumorzellüberstand und H_2O_2

Die Abbildung zeigt die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies in zeitlichem Verlauf. Die schwarzen Kreise repräsentieren die DCF-Fluoreszenz von Fibroblasten, die mit 5mM NAC beladen waren. Die weißen Symbole repräsentieren unbehandelte Zellen. Zu den mit Pfeilen markierten Zeitpunkten wurde SCL1-Überstand (SN(2d)SCL1) oder später als Kontrolle H_2O_2 hinzugegeben.

Die Zugabe von SCL1-Überstand zu den unbehandelten Fibroblasten (SN(2d)SCL1/weiße Kreise) erzeugt ein deutliches, ca. dreifach verstärktes Signal in der DCF-Fluoreszenz. Dies deutet auf die intrazelluläre Erzeugung von reaktiven Sauerstoffspezies hin. Die Erzeugung der ROS geschieht innerhalb einer Minute nach Zugabe des SCL1-Überstandes. Wie zu erwarten, kann eine Vorinkubation der Fibroblasten mit dem Radikalfänger NAC (schwarze

Kreise) die Erhöhung der DCF-Fluoreszenz verhindern. Die H₂O₂-Positivkontrolle zeigt, dass die Detektionsgrenze der Messung nicht erreicht wurde.

3.12 Identifikation von Tumorzellen sezernierten TGFβ1 als Verursacher der Verminderung der homologen ZZK von Fibroblasten

Die bisher durchgeführten Studien wurden mit einem Gemisch an von Tumorzellen sezernierten Wachstumsfaktoren und Zytokinen durchgeführt. Welcher oder welche dieser Faktor(en) für die tumorzellabhängige Verminderung der homologen ZZK von Fibroblasten verantwortlich ist (sind), sollte im Weiteren untersucht werden. In einem ersten Ansatz wurden Mikrozentrifugationsfilter bekannter Porengrößen benutzt. Die SCL1-Überstände wurden durch Größenausschlusszentrifugation in verschiedene Größen fraktioniert und die einzelnen Fraktionen durch Mikroinjektion auf ihre Wirksamkeit hin überprüft (Abb. 4.24).

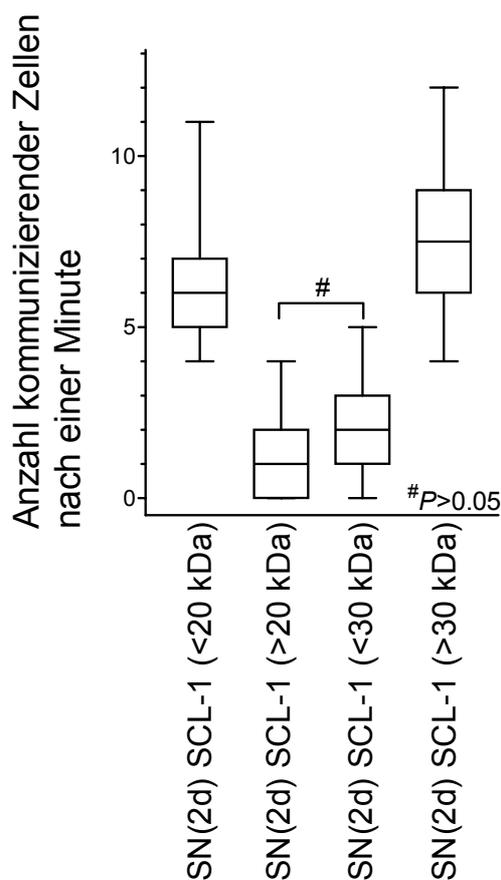


Abb. 33

Einfluss von Größenfraktionen der Tumorzellüberstände auf die ZZK von Fibroblasten
Konfluente Fibroblasten wurden für 24 Stunden mit unterschiedlichen Größenfraktionen der Tumorzellüberstände inkubiert.

Die Überstände der SCL1-Zellen wurden durch Größenausschlusszentrifugation in Fraktionen kleiner (SN(2d)SCL1(<20kDa)) und größer (SN(2d)SCL1(>20kDa)) ~20kDa bzw. kleiner (SN(2d)SCL1(<30kDa)) und größer (SN(2d)SCL1(>30kDa)) ~30kDa fraktioniert (s. Abb. 33). Diese wurden auf konfluente Fibroblasten übertragen und die ZZK mittels Mikroinjektion gemessen.

Das Experiment zeigt, dass die wirksame Überstandskomponente größer als 20kDa und kleiner als 30kDa sein muss, da die Zahl der kommunizierenden Zellen dieser beiden Fraktionen signifikant niedriger als die der Fraktionen kleiner 20kDa und größer 30kDa ist.

Aus der Literatur ergab sich der Hinweis, dass der „Transformierende Wachstumsfaktor $\beta 1$ “, ein 25kDa großes Protein, der gesuchte lösliche Faktor sein könnte. Junn *et al.* (286) beschrieben sowohl Calcium-Einstrom als auch die ROS-Produktion in Fibroblasten nach Zugabe von TGF $\beta 1$. Es lag also nahe zu überprüfen, ob TGF $\beta 1$ für die Verminderung der ZZK zwischen Fibroblasten verantwortlich ist.

Zuerst wurde rekombinantes TGF $\beta 1$ in der Mikroinjektion getestet. Zuzüglich wurde überprüft, ob der Effekt ausbleibt, wenn TGF $\beta 1$ mittels Immunpräzipitation aus dem Überstand entfernt oder durch einen entsprechenden Antikörper neutralisiert wird.

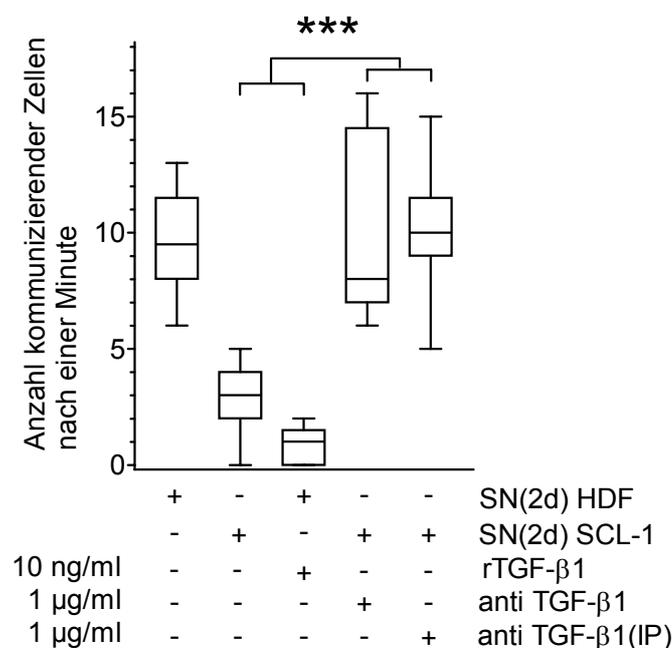


Abb. 34

Einfluss von TGF $\beta 1$ auf die homologe ZZK von Fibroblasten

Konfluente Fibroblasten wurden wie folgt behandelt: 24 Stunden in konditioniertem Medium (SN(2d)HDF) oder mit Tumorzellüberstand (SN(2d)SCL1). Es wurde entweder rekombinantes TGF $\beta 1$ (rTGF- $\beta 1$) oder TGF $\beta 1$ -neutralisierender Antikörper (anti TGF- $\beta 1$) zugesetzt
 *** $p < 0,001$

Um den Einfluss von TGF β 1 auf die ZZK von Fibroblasten zu untersuchen, wurden die Zellen mit 10 μ g/ml rekombinant hergestelltem TGF β 1 inkubiert. Zum Vergleich wurden die Zellen ebenfalls mit Tumorüberstand inkubiert. Auf diese Weise wurde die direkte Wirkung von TGF β 1 auf die ZZK der Fibroblasten untersucht. In einem zweiten Versuchsteil wurde eine entgegengesetzte Strategie gewählt. Hier wurde zum einen durch einen neutralisierenden Antikörper das vorhandene TGF β 1 im Tumorüberstand abgefangen und zum anderen dieser Komplex durch Immunpräzipitation (IP) aus der Lösung entfernt (s. Abb. 34).

Diese Versuche zeigen deutlich, dass **TGF β 1** der für die Herabregulation der Fibroblasten-ZZK verantwortliche Faktor ist. Rekombinantes menschliches TGF β 1 kann den Effekt des SCL1-Überstandes auf die Fibroblasten imitieren. Sowohl das Komplexieren des TGF β 1 mittels eines neutralisierenden Antikörpers als auch die Immunpräzipitation des Faktors verhindern die Verminderung der interzellulären Kopplung.

Da Fibroblasten selbst in der Lage sind TGF β 1 zu exprimieren und zu sezernieren, stellte sich die Frage, ob Tumorzellen eine weitaus größere Menge TGF β 1 produzieren, die für die beobachtete Veränderung der ZZK von Fibroblasten verantwortlich ist. Um zwischen der aktiven und der inaktiven TGF β 1-Menge unterscheiden zu können, nutzten wir einen kommerziell erhältlichen ELISA. TGF β 1 aus dem Überstand wird dabei von einem Maus- α -TGF β 1-Antikörper gebunden, der an eine Mikroplatte gekoppelt ist. Dieser Komplex wird nach Waschen von einem biotinylierten Huhn- α -TGF β 1-Antikörper gebunden. Dieser ternäre Komplex wird im Anschluss durch Peroxidase-gekoppeltes Streptavidin erkannt und nach Umsetzung eines Substrates spektralphotometrisch quantifiziert. Die Unterscheidung von aktivem und latentem TGF β 1 wird dadurch ermöglicht, dass die latente Form durch Azidifizierung und anschließende Neutralisierung in die aktive Form überführt wird.

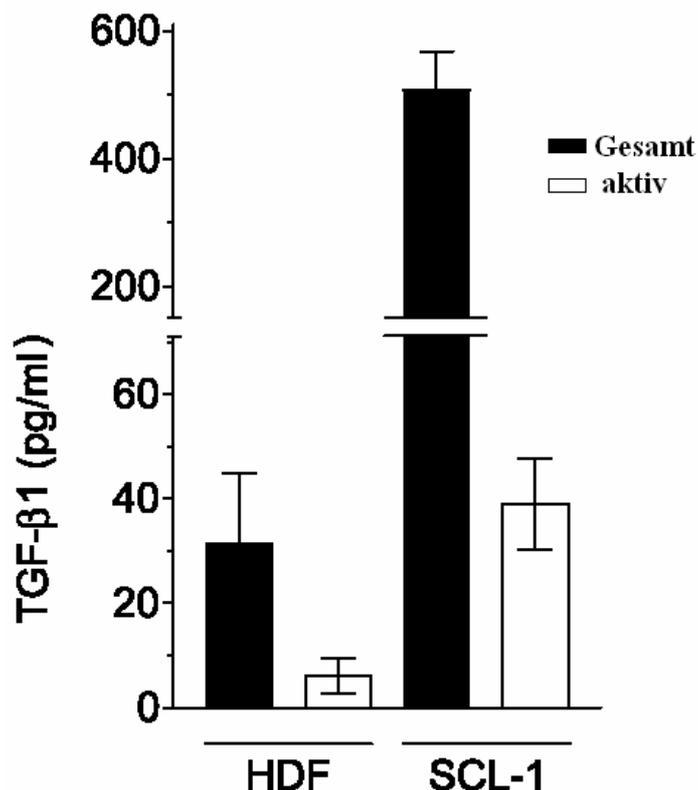


Abb. 35

Quantifizierung der sezernierten TGF β 1-Mengen von dermalen Fibroblasten und Tumorzellen

Messung der inaktiven (schwarze Balken) und aktiven (weiße Balken) Menge an TGF β 1, das binnen 48 Stunden von HDF und SCL1-Zellen sezerniert wird

Das Experiment zeigt klar, dass die Tumorzellen erheblich mehr TGF β 1 sezernieren als die Fibroblasten. Zudem ist auch die Menge an aktivem TGF β 1 gegenüber den Fibroblasten deutlich erhöht.

Ob nun die erhöhte Menge an aktivem TGF β 1 der Tumorzellen tatsächlich auch für die erhöhte Konzentration reaktiver Sauerstoffspezies verantwortlich ist, wird im Folgenden gezeigt.

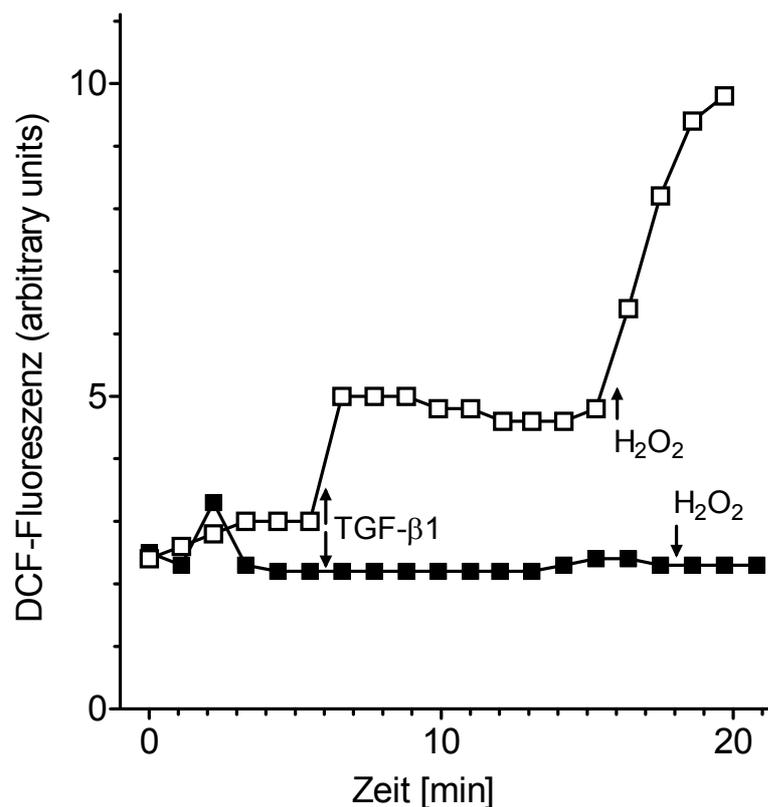


Abb. 36

Modulation der intrazellulären ROS-Menge von Fibroblasten nach Stimulation mit rhTGF β 1 und H $_2$ O $_2$

Die Abbildung zeigt die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies in zeitlichem Verlauf. Die schwarzen Quadrate repräsentieren die DCF-Fluoreszenz von Fibroblasten, die mit 5mM NAC beladen waren. Die weißen Symbole repräsentieren unbeladene Zellen. Zu den mit Pfeilen markierten Zeitpunkten wurde SCL1-Überstand (SN(2d)SCL1) oder später als Kontrolle H $_2$ O $_2$ hinzugegeben.

Die Zugabe von rhTGF β 1 zu den unbeladenen Fibroblasten (TGF β 1/weiße Quadrate) erzeugt ebenso wie die SCL1-Überstände ein deutliches Signal in der DCF-Fluoreszenz. Dies deutet auf die intrazelluläre Erzeugung von reaktiven Sauerstoffspezies hin. Die Erzeugung der ROS geschieht auch hier innerhalb einer Minute. Die Vorinkubation der Fibroblasten mit dem Radikalfänger NAC (schwarze Quadrate) kann die Erhöhung der DCF-Fluoreszenz erneut verhindern. Das Experiment macht deutlich, dass rekombinantes TGF β 1 die ROS-Konzentration in den Fibroblasten um den Faktor zwei erhöht. Die H $_2$ O $_2$ -Positivkontrolle zeigt, dass die Detektionsgrenze der Messung nicht erreicht wurde.

3.14 TGF β 1 abhängige Transdifferenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten und deren positiver Einfluss auf die Invasionskapazität von Tumorzellen

Der Wachstumsfaktor TGF β 1 zeigt eine pleiotrope Wirkung. Er ist sowohl involviert in die zelluläre Wachstumskontrolle, Angiogenese, Neurogenese, Synthese der extrazellulären Matrix wie auch in die humorale Immunantwort (222) und die Progression von Tumoren.

Weiterhin ist bekannt, dass TGF β 1 zu einer Transdifferenzierung von Epithelzellen zu Myofibroblasten führen kann (223), die eine zelluläre Komponente des Stromas in der Tumorprogression darstellen (224).

Es war fraglich, ob der Überstand der Plattenepithelkarzinomlinie SCL1 ebenfalls zu dieser Transdifferenzierung führt. Ein charakteristischer Biomarker für Myofibroblasten ist die Expression von „ α -smooth muscle actin“ (α -SMA) (225). Zur Untersuchung der Transdifferenzierung wurde ein immunzytochemischer Ansatz gewählt. α -SMA wurde in unbehandelten und durch Zugabe von Tumorzellüberständen stimulierten konfluenten Fibroblasten immunzytochemisch nachgewiesen.

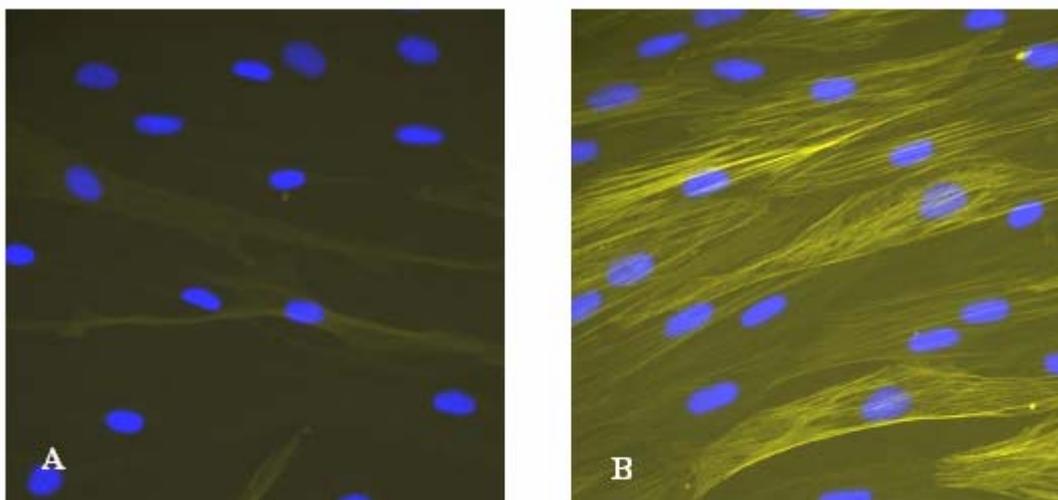


Abb. 37

Effekt von Tumorzellüberständen auf die α -SMA-Expression von Fibroblasten

Konfluente Fibroblasten wurden für 72 Stunden mit konditioniertem Medium (SN(2d)HDF) (A) oder Tumorzellüberständen (SN(2d)SCL1) (B) behandelt und α -SMA immunzytochemisch detektiert.

Das Experiment zeigt Fibroblasten nach 72stündiger Inkubation mit konditioniertem Medium (A) und mit Tumorzellüberständen (B). Die Steigerung der α -SMA-Expression ist deutlich sichtbar. Das Experiment belegt eine durch rhTGF β 1 hervorgerufene Transdifferenzierung von dermalen Fibroblasten zu Myofibroblasten.

Im Folgenden sollte überprüft werden, ob auch die durch TGF β 1 hervorgerufene Transdifferenzierung der Fibroblasten zu Myofibroblasten ebenso wie die Herabregulation der ZZK durch Bildung endogener reaktiver Sauerstoffspezies beeinflusst wird. Dazu wurde ein Western-Blot durchgeführt, der den α -SMA-Gehalt von unbehandelten Kontrollfibroblasten, mit 5mM NAC oder mit rhTGF β 1 inkubierten Zellen sowie mit Zellen, die sowohl mit TGF β 1 als auch mit NAC inkubiert wurden, zeigte.

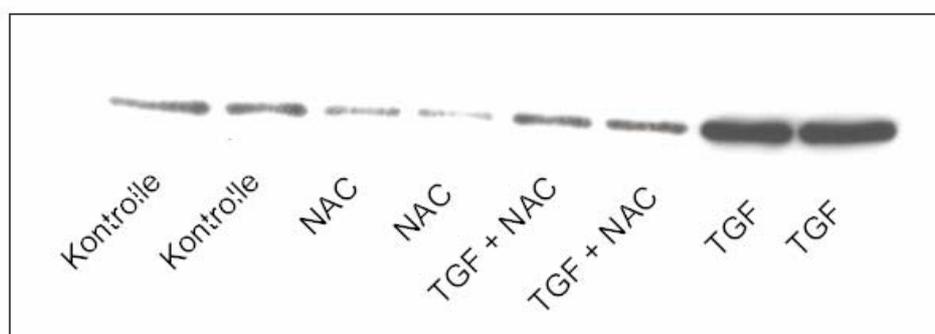


Abb. 38

Modulation des α -SMA-Gehaltes von Fibroblasten

Immunoblot von α -SMA nach 24stündiger Behandlung mit konditioniertem Medium (Kontrolle), 5mM NAC, Koinkubation von 10ng/ml rhTGF β 1 und 5mM NAC sowie 10ng/ml rhTGF β 1. Jeweils als Doppelbestimmung mit 15 μ g/Probe aufgetragen

Die unbehandelten Kontrollzellen zeigen das Vorhandensein einer α -SMA-Basisexpression, welche durch das Antioxidans NAC erniedrigt wird. rhTGF β 1-Exposition führt, wie nach dem immunzytochemischen Nachweis zu erwarten war, zu einer starken Zunahme des α -SMA-Signals. Diese Zunahme kann durch Koinkubation der Fibroblasten mit NAC auf das ursprüngliche Basalniveau reduziert werden. Die ROS-Abhängigkeit der Myofibroblasten-Transdifferenzierung konnte zuvor noch nicht gezeigt werden.

Um einen Einfluss von Myofibroblasten auf die Invasionskapazität von SCL1-Zellen zu untersuchen, wurde ein *in-vitro*-Invasionsassay durchgeführt. Dieser Test ermittelt die Anzahl an Zellen, die auf eine Stimulation hin durch eine Matrix wandern, deren Zusammensetzung der Basalmembran und einzelner Bindegewebskomponenten nachempfunden ist. Untersucht

wurde, wie viele der je 30000 eingesetzten SCL1-Zellen nach Attraktion mit konditioniertem Fibroblastenmedium (SN(2d)HDF), Kulturmedium mit 20%(v/v) FCS (DMEM+20%FCS) , dreitägig akkumuliertem Myofibroblastenüberstand (SN(3d)MF) und zweitägig akkumuliertem Myofibroblastenüberstand (SN(2d)MF) durch die Matrix wanderten.

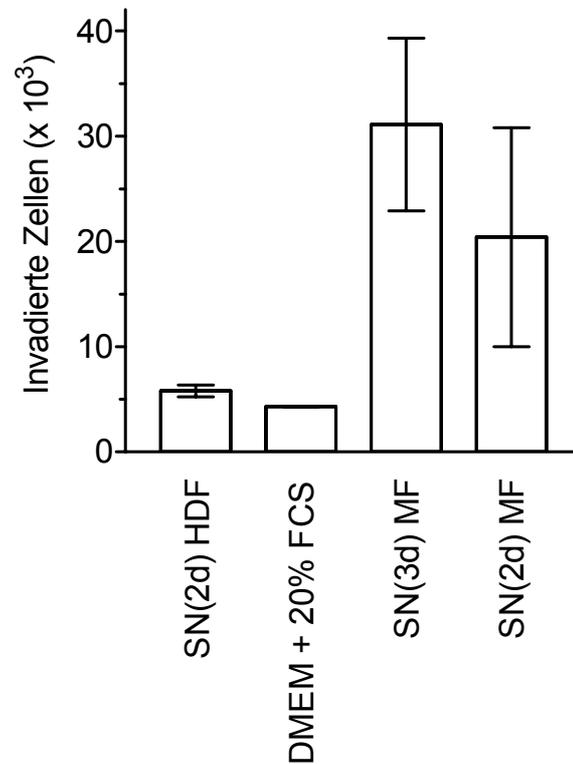


Abb. 39

Modulation der Invasionskapazität von SCL1-Zellen nach Attraktion mit verschiedenen Überständen bzw. Kulturmedium

Mittels folgender Überstände wurde die Invasionskapazität von SCL1-Zellen stimuliert:

Konditioniertes Medium (SN(2d)HDF), Serum-haltiges Medium (DMEM+20%FCS), dreitägig akkumulierter Myofibroblastenüberstand (SN(3d)MF) und zweitägig akkumulierter Myofibroblastenüberstand (SN(2d)MF)

Das Invasionsexperiment zeigt, dass es keinen signifikanten Unterschied zwischen konditioniertem Fibroblastenmedium und Kulturmedium gibt. Dagegen zeigen die Myofibroblastenüberstände eine erheblich stärkere Attraktionswirkung auf die Tumorzellen, wobei die dreitägig akkumulierten Überstände stärker wirken als die zweitägig akkumulierten.

4 Diskussion

Der Mehrstufenprozess der Karzinogenese wird generell als Resultat einer gestörten zellulären Homöostase als Folge zahlreicher genetischer und epigenetischer Veränderungen gesehen. Dies führt nachfolgend zu Hyperproliferation und dem Verlust der terminalen Differenzierung als Folge einer fehlenden Wachstumskontrolle (260).

Der Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase gesunder Zellen dienen drei Kommunikationsprozesse. Zum Ersten die extrazelluläre Kommunikation. Hierbei handelt es sich um Kommunikation mittels löslicher Botenstoffe, wie Hormone oder Wachstumsfaktoren. Diese werden von Zellen sezerniert und wirken regulatorisch auf die Zielzellen. Dabei kommt es in aller Regel zur Aktivierung eines Rezeptors der Zielzellen, der eine intrazelluläre Weiterleitung des Signals in Gang setzt. Die Weiterleitung des extrazellulären Signals wird als intrazelluläre Kommunikation verstanden und stellt somit den zweiten zellulären Kommunikationsprozess dar. Die dritte Möglichkeit zur Kommunikation von Zellen ist die direkte Zell-Zell-Kommunikation benachbarter Zellen über Gap Junctions. Dies sind Kanäle, durch die die Zytoplasmen benachbarter Zellen miteinander gekoppelt werden und somit passiver Zell-Zell-Transport von kleinen Molekülen gewährleistet wird (261). Die Tatsache, dass fast alle Zellen innerhalb fester Gewebe Gap Junctions bilden und in Folge dessen metabolisch gekoppelt sind (ZZK) wird als Argument für die außerordentliche Wichtigkeit dieser Strukturen bei der Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase angeführt.

Das Hauptargument für die Bedeutung der ZZK bei der Krebsentstehung ist die Beobachtung, dass beinahe alle Tumorzellen nicht zur homologen ZZK fähig sind, das heißt, sie kommunizieren nicht untereinander und auch nicht mit den sie umgebenden Zellen gleichen Ursprungs (262). Dies zeigen nicht zuletzt *in-vivo*- und *in-vitro*-Studien an Basalzell- und Plattenepithelzellkarzinomen (263, 264). Bei den bisherigen Untersuchungen lag der Fokus der Arbeiten thematisch klar auf den Bereichen der Tumorinitiation und der –promotion.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dem letzten Schritt der Tumorentstehung: der Progression des Tumors.

Der Connexinstatus bei der Tumor-Stroma-Interaktion und die heterologe Zell-Zell-Kommunikation zwischen (stromalen) Fibroblasten und Tumorzellen oder zwischen Fibroblasten (homologe Kommunikation) wurde bisher nicht eingehend untersucht. Das Verständnis der molekularen Mechanismen während der Tumorprogression ist entscheidend für das Design und den effektiven Nutzen neuer therapeutischer Strategien zur Bekämpfung

von Tumorinvasion und Metastasierung. In unseren Studien zur Tumor-Stroma-Interaktion etablierten wir ein *in-vitro* Tumor-Stroma-Modell unter Verwendung einer Kokultur aus der Plattenepithelkarzinomzelllinie SCL1 und dermalen Fibroblasten. Dieses Modell repräsentiert etwas vereinfacht die *in-vivo* Situation der Invasion eines Plattenepithelkarzinoms (226, 227) und erleichtert die Untersuchung des Einflusses von Tumorzellen epithelialen Ursprungs auf kokultivierte, dermale Fibroblasten, während zusätzliche Einflüsse, wie sie in intakter Haut oder dem gesamten Organismus vorkommen, vermieden werden.

Die vorliegende Arbeit basierte auf der Hypothese, dass die gestörte ZZK der Fibroblasten eine Schwächung des Stromas gegenüber dem Tumor darstellt, der in Folge dessen leichter migrieren oder invadieren kann. Zudem ist nicht auszuschliessen, dass tumorstämmige Faktoren nicht nur die ZZK, sondern auch andere stromale Eigenschaften modifiziert.

Als zelluläres Modell wurden Hautzellen gewählt. Zum einen, da Hauttumore aufgrund des sich vergrößernden atmosphärischen Ozonlochs und der damit einhergehenden erhöhten UV-Exposition ein Krankheitsbild darstellen (265, 266), mit dem sich die Medizin in zunehmendem Maße widmen muss. Zum anderen, weil es vergleichsweise einfach ist, primäre Hautzellen aus Biopsiematerial zu erhalten.

Die ersten durchgeführten Experimente dienten dann zur Untersuchung der Frage, ob die zu verwendenden Hautzellen interzelluläre Kommunikation über Gap Junctions zeigen. Diese Frage wurde mit Hilfe der Mikroinjektion gelöst. Die Methode beruht auf der direkten Injektion von fluoreszierenden Tracerfarbstoffen in Einzelzellen eines Zellverbandes und anschließender Beobachtung der Ausbreitung des Tracers in die Nachbarzellen. Wie laut *in-vivo* Daten aus der Literatur zu erwarten war (228), zeigte sich, dass sowohl sekundäre Keratinozyten als auch dermale Fibroblasten mittels ZZK gekoppelt sind.

Im Gegensatz dazu zeigen Zellen der Plattenepithelkarzinomlinie SCL1 keine interzelluläre Kommunikation. Dieses Resultat stimmt mit der Hypothese überein, dass Connexine als Tumorsuppressor agieren und dass der von ihnen ausgehende tumorinhibitorische Effekt über ihre Hauptfunktion, die Zell-Zell-Kopplung, vermittelt wird (229).

In der Arbeit nicht dargestellte Ergebnisse mit SV40-transformierten 1306-Fibroblasten, einem weitgehend akzeptierten Fibroblastenmodell, zeigten ebenfalls keine ZZK. Dies unterstreicht die großen Vorteile primärer oder sekundärer Zellen gegenüber immortalisierten Zelllinien, da primäre Zellen fast immer ein Verhalten zeigen, welches die *in vivo*-Situation eher widerspiegelt als Zelllinien.

Um die *in-vivo* Situation *in-vitro* zu simulieren wurden Kokulturrexperimente durchgeführt. Die Tumorzellen lagerten sich zu Clustern zusammen, die von den Fibroblasten umwachsen wurden.

Es stellte sich heraus, dass die Tumorzellen auch hier keine homologe ZZK zeigen. Im Gegensatz zur Monolayerkultur zeigten auch die Fibroblasten untereinander nur noch eine schwache Kopplung.

Eine homologe ZZK der SCL1-Zellen untereinander war auch in der Kokultur nicht zu detektieren. Dies deutet an, dass die umliegenden Fibroblasten keinen Einfluss auf die Kopplung der Tumorzellen nehmen. Im Gegensatz zu unseren Daten gibt es Hinweise darauf, dass die Inhibition neoplastischen Zellwachstums in Kokultur mit den jeweiligen untransformierten Zellen durch ZZK vermittelt wird. So resultiert die erniedrigte Proliferation der Onkogen-transformierten Mausfibroblastenlinie CH3 10T1/2 (267) oder der Onkogen-transformierter WB-F344 Rattenleberepithelzellen (268) aus der erhöhten ZZK mit ihren untransformierten Vorläuferzellen. Außerdem konnte gezeigt werden, dass Cx43-exprimierende Klone der Cervixkarzinomlinie Hela in Gegenwart von Fibroblasten erheblich schwächer proliferierten (269). Diese Ergebnisse lassen fragen, ob hochaggressive und stark metastasierende Plattenepithelkarzinome und Melanome sich selbst durch Verminderung von Zell-Zell-Kopplung vor dem beschriebenen Wachstumsarrest schützen.

Da die Überstände der Tumorzellen den gleichen Einfluss auf die Fibroblasten in einer Monolayerkultur zeigten, wurde klar, dass es sich um einen löslichen Faktor handeln muss, der die homologe ZZK der Fibroblasten herabreguliert. Dieser Effekt konnte im Folgenden an einem dreidimensionalen Hautmodell durch „scrape loading“ verifiziert werden. Außerdem konnten Untersuchungen mit einigen anderen Tumorzellen zeigen, dass die Verminderung der Fibroblasten-ZZK wohl ausschließlich von invasiven Tumorzellen ausgeht. Dies passt zu den Befunden, dass das Zytokin- und Wachstumsfaktormuster von invasiven, nicht-invasiven und immortalen Zellen erheblich differiert (270, 271). Ein Einfluss von Tumorzellen auf die umgebenden Zellen wurde bereits für die Expression von Zelladhäsionsmolekülen und proteolytischen Enzymen als Voraussetzung für die Malignität von Tumoren beschrieben (230, 231). Es wurden auch Hinweise geliefert, dass von Tumorzellen sezernierte lösliche Faktoren eine wichtige Rolle bei der Induktion stromaler Proteasen spielen (232, 233).

Somit wurde von den SCL1-Zellen ein parakrin wirkender Faktor sezerniert, der die homologe ZZK von Fibroblasten deutlich vermindert. Ein Effekt, der nach Zugabe von serumhaltigem Kulturmedium nach ca. zwei Stunden reversibel ist.

Welcher Mechanismus führt zur Verminderung der ZZK bzw. zu einer Modulation der Expression von Cx43, dem am häufigsten exprimierten Connexinotyp, in Fibroblasten?

Als möglicher Mechanismus zur Verminderung homologer Kopplung wurde die Verlagerung der Connexine in das Zytoplasma beschrieben (272). Mittels Immunzytochemie wurde daher die subzelluläre Verteilung der Gap Junction-Plaques untersucht. Es zeigte sich eine klare Membranlokalisation der Plaques bei den Fibroblasten. Diese war unabhängig von der An- oder Abwesenheit von Tumorzellüberständen. Die SCL1-Zellen zeigten lediglich ein schwaches Connexin-Signal in der Umgebung des Nukleus, jedoch kein Connexin43 an der Zellmembran. Dies erklärt die Unfähigkeit der SCL1-Zellen zur ZZK.

Eine transkriptionelle Modulation des Cx43-Gens wurde in der Literatur vielfach beschrieben (269, 273). Zur Untersuchung einer möglichen transkriptionellen Modulation der Cx43-mRNA wurde eine RT-PCR-Analyse durchgeführt. Es war jedoch kein Einfluss der Tumorzellüberstände auf die mRNA-Menge zu finden. Eine transkriptionelle Kontrolle des Cx43-Proteins war somit unwahrscheinlich.

Eine Western-Blot-Analyse des Connexin43-Proteins ergab erwartungsgemäß ein Drei-Banden-Muster. Dabei stellt die P0 genannte unterste der Banden das unphosphorylierte Cx43-Protein dar. Die darüberliegenden Banden P1 und P2 sind phosphorylierte Formen des Proteins. Eine Hyperphosphorylierung des Proteins macht sich in einem Shift bemerkbar. Im Blot nimmt die unterste Bande zugunsten der oberen Banden an Intensität ab. Diese Phosphorylierung ist die am häufigsten auftretende Regulation des Porenstatus. Ein Shift konnte aber nach Exposition der Fibroblasten mit Tumorzellüberstand nicht detektiert werden. Das Fehlen des Shifts deutet zwar an, dass Phosphorylierung hier keine Rolle spielt; diese Aussage kann aber aufgrund der Western-Blot-Analytik nicht mit aller Sicherheit getroffen werden. Da das Connexinprotein laut Sequenzanalyse über 13-18 mögliche Phosphorylierungsstellen verfügt (274), ist es möglich, dass das Bandenmuster der unstimulierten Fibroblasten ein anderes ist als das Bandenmuster nach Stimulation mit SCL1-Überstand. Es könnte also eine Umphosphorylierung stattgefunden haben, die lediglich keinen Einfluss auf die Nettoladung des Proteins hat. In einem in der Arbeit nicht gezeigten Experiment konnte auch nach Fraktionierung der Zelle in Nukleus, Zytoplasma und Zellmembran keine Veränderung des Connexin43-Musters durch Western-Blot detektiert werden.

Phosphorylierung von Aminosäureresten der carboxyterminalen Region durch Proteinkinasen stellt eine verbreitete Möglichkeit der Beeinflussung der Gap Junctions dar. Sowohl Serin-, wie auch Threonin- und Tyrosin-spezifische Kinasen haben Einfluss auf die ZZK. Connexin

ist Substrat für die Proteinkinasen A und C sowie die mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK). In der Sequenz des Connexin43-Proteins gibt es mehrere Positionen, die von PKA, PKC und MAPK phosphoryliert werden können (275). Die Phosphorylierung des Ser368-Restes im Connexin43-Protein der Ratte durch PKC führt *in vivo* zur Abnahme der interzellulären Kommunikation (276). Phorbolster, als Aktivatoren der PKC, sind in der Lage, eine Phosphorylierung des Connexin43 an Serin- oder Threoninresten zu induzieren und dadurch die ZVK zu hemmen. Es wird jedoch angenommen, dass die PKC *in vivo* keinen entscheidenden Einfluss auf die Phosphorylierung von Connexin43 ausübt (277). Die Wirkung der MAP-Kinasen konnte dagegen *in vivo* nachgewiesen werden (278).

Da die Messung von Phosphorylierungszuständen experimentell schwer zugänglich ist oder nur unvollständige Resultate erbringt, konnte zumindest ein Phosphataseeinfluss bei der Wiederherstellung der basalen ZVK ausgeschlossen werden. Die durch Wachstumsfaktoren beeinflusste Balance zwischen Phosphorylierung (279) und Dephosphorylierung (280) der Connexine nimmt Einfluss auf das „Protein-Trafficking“, den Zusammenbau wie den Abbau der Connexine. Die hier untersuchte Verminderung der homologen ZVK der Fibroblasten wird jedoch weder durch veränderte subzelluläre Verteilung der Gap Junction-Plaques noch durch eine Modulation der mRNA-Menge des Cx43 oder des Phosphorylierungsstatus des Cx43 erreicht. Zur Klärung des zugrunde liegenden Mechanismus wurden daher weitere bekannte „Gating“-Mechanismen untersucht.

Zuerst wurde der Einfluss von Calcium nach Exposition mit den Tumorüberständen in den Fibroblasten geprüft. Es ist bekannt, dass Calcium in der Lage ist, bei erhöhter intrazellulärer Konzentration den Gap-Junction-Kanal zu blockieren (238, 239). Calciumionen dienen in zahlreichen Signaltransduktionswegen als „second messenger“ und nehmen Kontrollfunktion bei physiologischen wie pathologischen Prozessen wahr. So ist Calcium der Schlüsselregulator der Keratinozytenfunktion bei der epidermalen Differenzierung (240) und koordiniert die Zell-Zell-Adhäsion von Fibroblasten durch Rekrutierung von Cadherinen und Cateninen an das Actinzytoskelett. Diese Rekrutierung ist ein essentielles Ereignis sowohl beim Bindegewebsumbau, wie auch bei der Wundheilung (241).

Es ist nicht völlig geklärt, wie Calcium die Permeabilität des Gap Junction-Kanals reguliert. Kürzlich wurde die Wichtigkeit von funktionellen Halbkanälen nicht nur für die Signaltransduktion, die zum Überleben der Zelle führt (242), sondern auch bezüglich Calcium-abhängiger Signaltransduktion durch Halbkanal-vermittelte ATP-Freisetzung (243) diskutiert. Die Hemikanäle sind allerdings bei extrazellulären Calciumkonzentrationen im Bereich von 1-2mM, was in etwa der Konzentration des Kulturmediums entspricht,

geschlossen (243, 244). Daraus kann gefolgert werden, dass Halbkanäle wohl keinen oder nur einen marginalen Einfluss auf die beobachtete tumorabhängige Verminderung der homologen ZZK der Fibroblasten haben.

Es gibt jedoch auch Hinweise darauf, dass Calcium direkt auf den Gap Junction-Kanal einwirken kann. Obwohl nach Sequenzanalyse weder der C- noch der N-Terminus aller untersuchten Connexin-Isoformen eine Calcium-Bindestelle besitzt, konnte durch eine Cystein-Mutante (Cx46L35C) des Connexin46 von *Xenopus* die Position 35 direkt für das Calcium-abhängige Verschließen der Pore verantwortlich gemacht werden (254, 255).

Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente zeigen, dass das Auftreten der Herunterregulation der homologen ZZK der Stromalen Zellen von Calcium abhängig ist. Bei fehlendem extrazellulärem Calcium konnte der Effekt nicht beobachtet werden. Auf Fluoreszenz basierende Time-Lapse-Messungen der Fibroblasten bestätigten einen Calciumeinstrom in den Fibroblasten und zwar direkt nach Zugabe des Überstands. Die dabei einströmenden Calciummengen waren jedoch zu gering, um allein für das Schließen der Gap Junctions verantwortlich zu sein. Zudem legt die zeitliche Verzögerung zwischen dem sehr schnellen Calciumeinstrom und dem viel später auftretenden Entkopplungseffekt eher eine „second messenger“-Funktion des Calciums nahe (243,244).

Diese Vermittlerwirkung könnte durch Stimulation einer Protein-Protein-Wechselwirkung zwischen dem Calcium-Bindeprotein Calmodulin und Connexin realisiert werden. Die Rolle von Calmodulin wurde in embryonalen Amphibienzellen durch Injektion von „antisense“-Oligonukleotiden untersucht, die gegen die mRNA des Calmodulin gerichtet waren. Die so behandelten Zellen konnten nach verschiedenen, die ZZK vermindernenden Behandlungen, ihre Kopplung aufrechterhalten (256). Außerdem konnten in Cx32 Aminosäuresequenzen gefunden werden, die auf eine Interaktion mit Calmodulin als Ligand des Connexins hinweisen (257). Eine an Fibroblasten durchgeführte immunzytochemische Untersuchung ergab Hinweise auf eine mögliche Steigerung der Calmodulinproteinmenge und eine potentielle Kollokalisierung von Calmodulin und Cx43 nach Stimulation mit Tumorüberständen.

Ein zweiter untersuchter „Gating“-Mechanismus für die Gap Junctions ist die Wirkung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS). ROS sind second messenger in einer Vielzahl von zellulären Signaltransduktionswegen und die Beteiligung oxidativer Prozesse in der Tumorentwicklung ist hinlänglich bekannt. So konnte gezeigt werden, dass erhöhte ROS-Mengen zu Hyperplasie (281), Hyperproliferation (282) und Apoptoseresistenz führen (283). Reaktive Sauerstoffspezies wurden auch mit der Modulation Gap Junction-vermittelter ZZK

in Verbindung gebracht. So verursacht eine Reoxygenierung von Endothelzellen nach Hypoxie einen Verlust an homologer Kopplung (284) und der Porenstatus scheint Einfluss auf die Abgabe strahlungsgenerierter Signalmoleküle zu haben (285).

Tatsächlich konnte eine Beteiligung reaktiver Sauerstoffspezies an der Signaltransduktion des untersuchten Effektes gefunden werden. Sowohl das antioxidativ wirkende N-Acetyl-L-Cystein als auch eine Präinkubation mit Natriumselenit ist in der Lage, der Verminderung der ZZK von Fibroblasten durch Tumorüberstände entgegenzuwirken. Die DCF-Fluoreszenzanalytik zeigt auch hier, wie beim Calcium, eine zeitlich sehr schnelle Entstehung der ROS. Es ist bis jetzt aus den Kinetiken nicht zu entnehmen, ob der Calciumeinstrom vor, nach oder gleichzeitig mit der intrazellulären ROS-Erzeugung auftritt. Die Bedeutung beider Effekte ist jedoch gleich einzuschätzen, da sowohl bei fehlendem Calcium als auch nach Abfangen der ROS die ZZK der Fibroblasten auf basalem Level verbleibt.

Ausgehend von den bisherigen Ergebnissen der Wirkung von Tumorzellüberständen, sollte untersucht werden, welche(r) Faktor(en) für die Verminderung der ZZK zwischen den Fibroblasten verantwortlich ist und wie die Signalkaskade des Effekts innerhalb der Fibroblasten aussieht. Dazu wurde die Größe des Faktors mittels Größenausschlußzentrifugation auf eine Fraktion zwischen 20-30 kDa eingegrenzt.

Junn *et al.* (286) beschreiben einen durch NAC antagonisierbaren raschen Anstieg reaktiver Sauerstoffspezies in Lungenfibroblasten nach Inkubation mit TGF β 1. Zudem erzeugt die Gabe dieses Wachstumsfaktors einen Einstrom extrazellulären Calciums in die Zellen, der durch EGTA hemmbar ist. Die Wirkung von TGF β 1 wurde daraufhin untersucht.

Der **Transformierende Wachstumsfaktor β 1** (TGF β 1), ein 25 kDa großes homodimeres Protein, nimmt unter den parakrin wirkenden Wachstumsfaktoren, die in den molekularen Prozessen der Tumor-Stroma-Interaktion eine Rolle spielen, eine herausragende Stellung ein. In einer Vielzahl von Untersuchungen zeigt TGF β 1 pleiotrope Effekte, die eine Vielzahl von biologischen Wirkungen in verschiedenen Zelltypen beeinflussen. Dabei ist die TGF β 1-Wirkung biphasisch. So kehrt sich die antiproliferative Wirkung auf Brustkrebszellen in dem Maße um, in dem die Zellen entarten (287). Zudem zeigte sich ein Verlust der antiproliferativen Effekte bei Darm-, Brust- und Pankreaskarzinomen (288-290). Es wurde sogar postuliert, dass dieser Wirkungsverlust einen allgemeinen, kritischen Schritt der malignen Transformation bzw. der Tumorpromotion darstellt (291).

Es konnte gezeigt werden, dass die Zugabe von rekombinantem humanem TGF β 1 zu Fibroblastenmonolayerkulturen die homologe ZZK der Fibroblasten inhibierte. Zudem konnte

nach Immunpräzipitation des TGF β 1 aus den Überständen die Verminderung der ZZK nicht reproduziert werden. Diese Ergebnisse belegen überzeugend, dass TGF β 1 der Faktor ist, der für den untersuchten Effekt ursächlich ist. Diese Erkenntnis steht in Übereinstimmung mit der Messung der von den SCL1-Zellen sezernierten TGF β 1-Mengen. Diese sind gegenüber den Fibroblasten um den Faktor 20 (Gesamtmenge) bzw. um den Faktor 10 (aktives TGF β 1) erhöht. TGF β 1 konnte ebenfalls die Erhöhung der intrazellulären ROS-Menge in den Fibroblasten reproduzieren. Diese hier dargestellte Verbindung zwischen TGF β 1 und reaktiven Sauerstoffspezies konnte auch in anderen Zelltypen gezeigt werden. So aktiviert TGF β 1 die Expression von TIMP1 (tissue inhibitor of matrixmetalloproteinases) in bovinen wie in humanen Chondrozyten (292). Auch die proapoptotische Wirkung von TGF β 1 in Hepatozyten konnte auf die Erzeugung reaktiver Sauerstoffspezies zurückgeführt werden (293).

Zudem wurde eine ROS-abhängige Aktivierung von p38 durch TGF β 1 belegt (294). Neben dem Effekt auf die homologe ZZK von Fibroblasten ist bekannt, dass TGF β 1 für die bei der Tumor-Stroma-Interaktion auftretende Transdifferenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten verantwortlich ist (225). Diese Transdifferenzierung konnte durch die untersuchten SCL1-Überstände ebenfalls erzeugt werden. Zusätzlich konnte auch die Abhängigkeit der Myofibroblastenbildung durch ROS gezeigt werden. Myofibroblasten werden histologisch von „normalen“ Fibroblasten durch deren erhöhte Expression an α -SMA abgegrenzt. Dieser Zelltyp erscheint häufig in unmittelbarer Nähe solider Tumoren, zumeist an der Invasionsfront. Der Transdifferenzierungsprozess geht mit erhöhter Proliferation, erhöhter Kollagensynthese und erniedrigter Motilität einher (296). Zudem werden eine Reihe von Wachstumsfaktoren, Chemokinen, Zytokinen wie auch ECM-Proteinen und Proteasen verstärkt exprimiert (297, 298).

Es konnte gezeigt werden, dass die Überstände der Myofibroblasten die Tumorzellen verstärkt dazu anregen, durch eine der Basalmembran nachempfundene Barriere zu treten, was als verstärkte Invasionskapazität angesehen wird (295).

Aus den dargestellten Ergebnissen und Interpretationen ergibt sich zusammenfassend folgendes Bild (s. Abb. 40):

Zellen der Plattenepithelkarzinomlinie SCL1 sezernieren große Mengen an aktivem TGF β 1. Diese induzieren in dermalen Fibroblasten, als Modell für stromale Zellen, eine erhöhte Bildung reaktiver Sauerstoffspezies und eine erhöhte intrazelluläre Calciumkonzentration in Folge derer die homologe ZZK der Fibroblasten vermindert und die Transdifferenzierung der

Fibroblasten zu Myofibroblasten initiiert wird. Myofibroblasten wiederum erhöhen die Invasionskapazität der Tumorzellen.

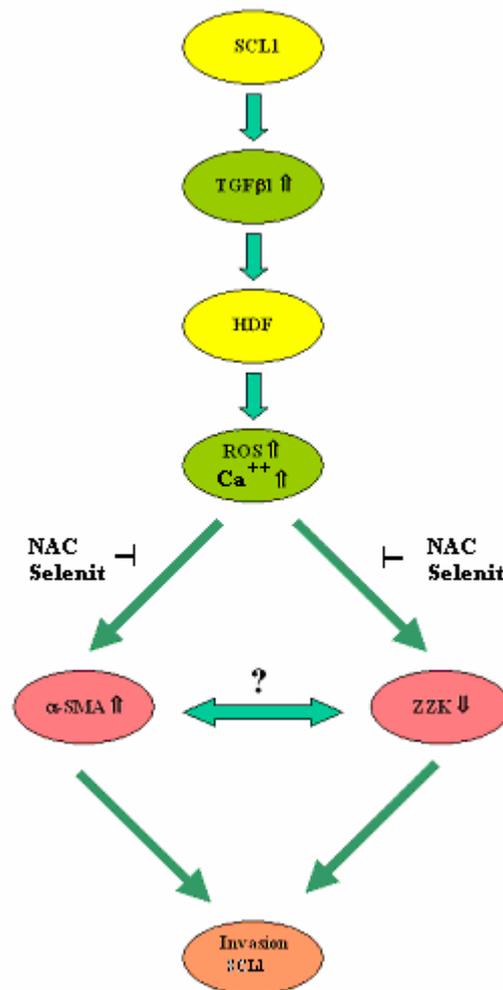


Abb. 40 Zusammenfassendes Schema

Unklar bleibt die Verbindung zwischen der verminderten ZK der Fibroblasten und der Transdifferenzierung zu Myofibroblasten. Die dramatische Verminderung der homologen und heterologen ZK könnte jedoch die Invasion von Tumorzellen dahingehend unterstützen, dass Tumorzellen sich zum einen durch diese Mechanismen gegen wachstumsinhibierende und proapoptische Signale von benachbarten „normalen“ Zellen schützen, und zum anderen stromale Zellen dadurch gezwungen werden, sich der Tumorzelle zu „unterwerfen“ und die Invasion zu unterstützen.

5 Perspektiven

Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass der parakrin wirkende Wachstumsfaktor TGF β 1 zumindest ein Faktor ist, der eine entscheidende Rolle in der Verminderung der Zell-Zell-Kommunikation zwischen stromalen Zellen und der Transdifferenzierung zu -an der Tumorinvasion beteiligten- Myofibroblasten führt.

Unsere Arbeitshypothese ist, dass mittels Mikronährstoffen zum einen die Zell-Zell-Kommunikation der stromalen Zellen aufrechterhalten bleibt, und zum anderen die Transdifferenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten verhindert wird. Diese Maßnahmen sollten eine Verminderung der metastatischen Aktivität der Tumorzellen im Rahmen der Tumor-Stroma-Interaktion mit sich bringen.

Aus den Ergebnissen und der Arbeitshypothese ergeben sich weitere wissenschaftliche Themen:

Thema 1: Es stellt sich die Frage nach dem molekularen Mechanismus, der dem von Tumorzellen ausgelösten Schließen der Gap Junctions bei den stromalen Zellen zugrunde liegt. Es wird spekuliert, dass Protein-Protein-Wechselwirkungen dafür verantwortlich sind. Die Aufklärung dieses molekularen Mechanismus beinhaltet auch die Signalkaskade, die – von parakrin wirkenden Faktoren ausgelöst- zum Schließen der nach dem molekularen Mechanismus, der dem von Tumorzellen ausgelösten Schließen der Gap Junctions führt.

Thema 2 ist fokussiert auf die von parakrinen Faktoren wie TGF β 1 ausgehende(n) Signalkaskade(n), die (a) zu einer gestörten homologen und heterologen ZZK während der Tumor-Stroma-Interaktion führt, und (b) auf die Frage, ob ein Schließen der Gap Junctions Auslöser für eine Kaskade ist, die zur Transdifferenzierung zu Myofibroblasten führt..

Thema 3 befasst sich mit der Frage, wie Mikronährstoffe (z. B. Selenverbindungen) in diese Signalkaskaden eingreifen können.

Aus den gewonnenen Erkenntnissen können therapeutische Strategien entwickelt werden, die zu einer von Mikronährstoffen abhängigen Aufrechterhaltung der ZZK und damit zur Verminderung der metastatischen Aktivität der Tumorzellen führen.

6 Zusammenfassung

Der Prozess der Karzinogenese beinhaltet den Übergang von „normalen“, interzellulärer Zell-Zell-Kommunikation (ZZK) kompetenter Zellen zu ungekoppelten, ZZK-defizienten Zellen. Dies resultiert letztendlich in einem Zusammenbruch interzellulärer Kommunikationsprozesse und fördert die Tumorpromotion. Die ZZK und der Connexinstatus bei Tumor-Stroma-Interaktionsprozessen bzw. die homologe ZZK von Fibroblasten unter Einfluss von Tumorzellen wurde bisher noch nicht detailliert genug untersucht. Dabei ist das Verständnis der hier auftretenden molekularen Mechanismen im Kampf gegen Tumordinvasion und Metastasierung von entscheidender Bedeutung.

In dieser Arbeit wurde ein Kokultursystem aus Tumorzellen und dermalen Fibroblasten als vereinfachtes Abbild der Tumor-Stroma-Interaktion etabliert. Es wurde gezeigt, dass die Plattenepithelzellen der Linie SCL1 große Mengen TGF β 1 sezernieren, welches parakrin auf Fibroblasten wirkt und die homologe ZZK dieser (stromalen) Zellen stark vermindert. Die Signaltransduktion dieses Effektes ist abhängig vom Einstrom extrazellulären Calciums. Calcium dient hier als „second messenger“, der möglicherweise zur Aktivierung von Calmodulin führt, welches dann durch direkte Protein-Protein-Interaktion zum Verschluss der Gap Junctions führt. Zusätzlich wird die TGF β 1-vermittelte Verminderung der homologen ZZK der Fibroblasten durch endogene Produktion reaktiver Sauerstoffspezies vermittelt. Behandlung mit Antioxidantien kann die homologe Kommunikation aufrechterhalten.

Der Einfluss des Wachstumsfaktors erzeugt außerdem einen, ebenfalls ROS-vermittelten, Transdifferenzierungsprozess von Fibroblasten zu Myofibroblasten. Das Muster von Myofibroblasten sezernierter Wachstumsfaktoren hat eine starke chemoattraktive Wirkung auf Tumorzellen und erhöht deren Invasionskapazität.

Da Invasion und Metastasierung nach wie vor das größte Problem der Krebstherapie darstellen, könnte die Aufklärung der zellulären Interaktionen zwischen Tumor und Stroma bei der Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze sehr hilfreich sein.

7 Literaturliste

- 1: WEIDMANN S.
The electrical constants of Purkinje fibres.
J Physiol. 1952 Nov;118(3):348-60.
- 2: WEIDMANN S.
The diffusion of radiopotassium across intercalated disks of mammalian cardiac muscle.
J Physiol. 1966 Nov;187(2):323-42.
- 3: BARR P.
Radiological notes. Case No. 255. Infarction of the sigmoid colon.
J Mt Sinai Hosp N Y. 1965 Nov-Dec;32(6):682-6.
- 4: FURSHPAN EJ, POTTER DD.
Slow post-synaptic potentials recorded from the giant motor fibre of the crayfish.
J Physiol. 1959 Mar 3;145(2):326-35.
- 5: FURSHPAN EJ, POTTER DD.
Low-resistance junctions between cells in embryos and tissue culture.
Curr Top Dev Biol. 1968;3:95-127.
- 6: MAXWELL GM, ROBERTSON E, ELLIOTT RB.
The Effects of a new Beta adrenergic Blocking agent (Nethalide, Alderlin) upon the general and coronary haemodynamics of the intact animal
Aust J Exp Biol Med Sci. 1963 Oct;41:511-5.
- 7: KEIR HM, SUBAK-SHARPE H, SHEDDEN WI, WATSON DH, WILDY P.
Immunological evidence for a specific DNA polymerase produced after infection by herpes simplex virus.
Virology. 1966 Sep;30(1):154-7.
- 8: SUBAK-SHARPE H, BURK RR, PITTS JD.
Metabolic co-operation between biochemically marked mammalian cells in tissue culture.
J Cell Sci. 1969 Mar;4(2):353-67.
- 9: LOEWENSTEIN WR.
Facets of a transducer process.
Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 1965;30:29-43.
- 10: REVEL JP, KARNOVSKY MJ.
Hexagonal array of subunits in intercellular junctions of the mouse heart and liver.
J Cell Biol. 1967 Jun;33(3):C7-C12.
- 11: CHALCROFT JP, BULLIVANT S.
An interpretation of liver cell membrane and junction structure based on observation of freeze-fracture replicas of both sides of the fracture.
J Cell Biol. 1970 Oct;47(1):49-60.
- 12: GOODENOUGH DA, REVEL JP.
A fine structural analysis of intercellular junctions in the mouse liver.
J Cell Biol. 1970 May;45(2):272-90.

-
- 13: SIMPSON I, ROSE B, LOEWENSTEIN WR.
Size limit of molecules permeating the junctional membrane channels.
Science. 1977 Jan 21;195(4275):294-6.
- 14: GOODENOUGH DA.
The structure and permeability of isolated hepatocyte gap junctions.
Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 1976;40:37-43.
- 15: CASPAR DL, GOODENOUGH DA, MAKOWSKI L, PHILLIPS WC.
Gap junction structures. I. Correlated electron microscopy and x-ray diffraction.
J Cell Biol. 1977 Aug;74(2):605-28.
- 16: MAKOWSKI L, CASPAR DL, PHILLIPS WC, GOODENOUGH DA.
Gap junction structures. II. Analysis of the x-ray diffraction data.
J Cell Biol. 1977 Aug;74(2):629-45.
- 17: LOEWENSTEIN WR.
Junctional intercellular communication: the cell-to-cell membrane channel.
Physiol Rev. 1981 Oct;61(4):829-913. Review.
- 18: UNGER VM, KUMAR NM, GILULA NB, YEAGER M.
Expression, two-dimensional crystallization, and electron cryo-crystallography
of recombinant gap junction membrane channels.
J Struct Biol. 1999 Dec 1;128(1):98-105.
- 19: PERKINS G, GOODENOUGH D, SOSINSKY G.
Three-dimensional structure of the gap junction connexon.
Biophys J. 1997 Feb;72(2 Pt 1):533-44.
- 20: YEAGER M, NICHOLSON BJ.
Structure of gap junction intercellular channels.
Curr Opin Struct Biol. 1996 Apr;6(2):183-92. Review.
- 21: POLITOFF A, SOCOLAR SJ, LOEWENSTEIN WR.
Metabolism and the permeability of cell membrane junctions.
Biochim Biophys Acta. 1967 Sep 9;135(4):791-3.
- 23: GILULA NB, SATIR P.
The ciliary necklace. A ciliary membrane specialization.
J Cell Biol. 1972 May;53(2):494-509.
- 24: SAEZ JC, CONNOR JA, SPRAY DC, BENNETT MV.
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. 1989 Apr;86(8):2708-12.
- 25: NIESSEN H, HARZ H, BEDNER P, KRAMER K, WILLECKE K.
Selective permeability of different connexin channels to the second messenger
inositol 1,4,5-trisphosphate.
J Cell Sci. 2000 Apr;113 (Pt 8):1365-72.
- 26: HORCHOLLE-BOSSAVIT G.
[Electrotonic transmission in the mammalian central nervous system (author's
transl)]
J Physiol (Paris). 1978;74(4):349-63. Review. French.

- 27: GROS DB, JONGSMA HJ.
Connexins in mammalian heart function.
Bioessays. 1996 Sep;18(9):719-30. Review.
- 28: WHITE TW, BRUZZONE R, GOODENOUGH DA, PAUL DL.
Mouse Cx50, a functional member of the connexin family of gap junction proteins, is the lens fiber protein MP70.
Mol Biol Cell. 1992 Jul;3(7):711-20.
- 29: NGEZAHAYO A, KOLB HA.
Regulation of gap junctional coupling in isolated pancreatic acinar cell pairs by cholecystokinin-octapeptide, vasoactive intestinal peptide (VIP) and a VIP-antagonist.
J Membr Biol. 1994 Apr;139(2):127-36.
- 30: LO CW, GILULA NB.
Gap junctional communication in the post-implantation mouse embryo.
Cell. 1979 Oct;18(2):411-22.
- 31: KALIMI GH, LO CW.
Communication compartments in the gastrulating mouse embryo.
J Cell Biol. 1988 Jul;107(1):241-55.
- 32: LEE SW, TOMASETTO C, SAGER R.
Positive selection of candidate tumor-suppressor genes by subtractive hybridization.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1991 Apr 1;88(7):2825-9.
- 33: CHAUDHURI R, SIGLER K, DUPONT E, TROSKO JE, MALKINSON AM, RUCH RJ.
Gap junctional intercellular communication in mouse lung epithelial cell lines: effects of cell transformation and tumor promoters.
Cancer Lett. 1993 Jul 30;71(1-3):11-8.
- 34: MUSIL LS, GOODENOUGH DA.
Multisubunit assembly of an integral plasma membrane channel protein, gap junction connexin43, occurs after exit from the ER.
Cell. 1993 Sep 24;74(6):1065-77.
- 35: KUMAR NM, FRIEND DS, GILULA NB.
Synthesis and assembly of human beta 1 gap junctions in BHK cells by DNA transfection with the human beta 1 cDNA.
J Cell Sci. 1995 Dec;108 (Pt 12):3725-34.
- 36: FALK MM, BUEHLER LK, KUMAR NM, GILULA NB.
Cell-free synthesis and assembly of connexins into functional gap junction membrane channels.
EMBO J. 1997 May 15;16(10):2703-16.
- 37: AHMAD S, DIEZ JA, GEORGE CH, EVANS WH.
Synthesis and assembly of connexins in vitro into homomeric and heteromeric functional gap junction hemichannels.
Biochem J. 1999 Apr 15;339 (Pt 2):247-53.
- 38: GEORGE CH, KENDALL JM, EVANS WH.
Intracellular trafficking pathways in the assembly of connexins into gap junctions.
J Biol Chem. 1999 Mar 26;274(13):8678-85.

- 39: Evans WH, Ahmad S, Diez J, George CH, Kendall JM, Martin PE.
Trafficking pathways leading to the formation of gap junctions.
Novartis Found Symp. 1999;219:44-54; discussion 54-9. Review.
- 40: LAIRD DW, CASTILLO M, KASPRZAK L.
Gap junction turnover, intracellular trafficking, and phosphorylation of connexin43 in brefeldin A-treated rat mammary tumor cells.
J Cell Biol. 1995 Dec;131(5):1193-203.
- 41: MUSIL LS, GOODENOUGH DA.
Gap junctional intercellular communication and the regulation of connexin expression and function.
Curr Opin Cell Biol. 1990 Oct;2(5):875-80. Review.
- 42: LAIRD DW, PURANAM KL, REVEL JP.
Turnover and phosphorylation dynamics of connexin43 gap junction protein in cultured cardiac myocytes.
Biochem J. 1991 Jan 1;273(Pt 1):67-72.
- 43: DERMIETZEL R, YANCEY SB, TRAUB O, WILLECKE K, REVEL JP.
Major loss of the 28-kD protein of gap junction in proliferating hepatocytes.
J Cell Biol. 1987 Oct;105(4):1925-34.
- 44: TRAUB O, LOOK J, DERMIETZEL R, BRUMMER F, HULSER D, WILLECKE K.
Comparative characterization of the 21-kD and 26-kD gap junction proteins in murine liver and cultured hepatocytes.
J Cell Biol. 1989 Mar;108(3):1039-51.
- 45: GINZBERG RD, GILULA NB.
Modulation of cell junctions during differentiation of the chicken otocyst sensory epithelium.
Dev Biol. 1979 Jan;68(1):110-29.
- 46: LARSEN WJ, TUNG HN, MURRAY SA, SWENSON CA.
Evidence for the participation of actin microfilaments and bristle coats in the internalization of gap junction membrane.
J Cell Biol. 1979 Dec;83(3):576-87.
- 47: VAUGHAN DK, LASATER EM.
Distribution of F-actin in bipolar and horizontal cells of bass retinas.
Am J Physiol. 1990 Aug;259(2 Pt 1):C205-14.
- 48: LAING JG, BEYER EC.
The gap junction protein connexin43 is degraded via the ubiquitin proteasome pathway.
J Biol Chem. 1995 Nov 3;270(44):26399-403.
- 49: Musil LS, Le AC, VanSlyke JK, Roberts LM.
Regulation of connexin degradation as a mechanism to increase gap junction assembly and function.
J Biol Chem. 2000 Aug 18;275(33):25207-15.
- 50: HERTLEIN B, BUTTERWECK A, HAUBRICH S, WILLECKE K, TRAUB O.
Phosphorylated carboxy terminal serine residues stabilize the mouse gap junction protein connexin45 against degradation.
J Membr Biol. 1998 Apr 1;162(3):247-57.

- 51: DIESTEL S, ECKERT R, HULSER D, TRAUB O.
Exchange of serine residues 263 and 266 reduces the function of mouse gap junction protein connexin31 and exhibits a dominant-negative effect on the wild-type protein in HeLa cells.
Exp Cell Res. 2004 Apr 1;294(2):446-57.
- 52: TRAUB O, LOOK J, PAUL D, WILLECKE K.
Cyclic adenosine monophosphate stimulates biosynthesis and phosphorylation of the 26 kDa gap junction protein in cultured mouse hepatocytes.
Eur J Cell Biol. 1987 Feb;43(1):48-54.
- 54: TAKEDA A, HASHIMOTO E, YAMAMURA H, SHIMAZU T.
Phosphorylation of liver gap junction protein by protein kinase C.
FEBS Lett. 1987 Jan 5;210(2):169-72.
- 55: TAKEDA A, SAHEKI S, SHIMAZU T, TAKEUCHI N.
Phosphorylation of the 27-kDa gap junction protein by protein kinase C in vitro and in rat hepatocytes.
J Biochem (Tokyo). 1989 Oct;106(4):723-7.
- 57: SAEZ JC, NAIRN AC, CZERNIK AJ, SPRAY DC, HERTZBERG EL, GREENGARD P, BENNETT MV.
Phosphorylation of connexin 32, a hepatocyte gap-junction protein, by cAMP-dependent protein kinase, protein kinase C and Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II.
Eur J Biochem. 1990 Sep 11;192(2):263-73.
- 58: CROW JM, ATKINSON MM, JOHNSON RG.
Micromolar levels of intracellular calcium reduce gap junctional permeability in lens cultures.
Invest Ophthalmol Vis Sci. 1994 Jul;35(8):3332-41.
- 59: MUSIL LS, BEYER EC, GOODENOUGH DA.
Expression of the gap junction protein connexin43 in embryonic chick lens: molecular cloning, ultrastructural localization, and post-translational phosphorylation.
J Membr Biol. 1990 Jun;116(2):163-75.
- 60: LAIRD DW, REVEL JP.
Biochemical and immunochemical analysis of the arrangement of connexin43 in rat heart gap junction membranes.
J Cell Sci. 1990 Sep;97 (Pt 1):109-17.
- 61: MUSIL LS, BEYER EC, GOODENOUGH DA.
Expression of the gap junction protein connexin43 in embryonic chick lens: molecular cloning, ultrastructural localization, and post-translational phosphorylation.
J Membr Biol. 1990 Jun;116(2):163-75.
- 62: BRISSETTE JL, KUMAR NM, GILULA NB, DOTTO GP.
The tumor promoter 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate and the ras oncogene modulate expression and phosphorylation of gap junction proteins.
Mol Cell Biol. 1991 Oct;11(10):5364-71.
- 63: MUSIL LS, GOODENOUGH DA.
Biochemical analysis of connexin43 intracellular transport, phosphorylation, and assembly into gap junctional plaques.
J Cell Biol. 1991 Dec;115(5):1357-74.

- 64: Rash JE, Pereda A, Kamasawa N, Furman CS, Yasumura T, Davidson KG, Dudek FE, Olson C, Li X, Nagy JJ.
High-resolution proteomic mapping in the vertebrate central nervous system: Close proximity of connexin35 to NMDA glutamate receptor clusters and co-localization of connexin36 with immunoreactivity for zonula occludens protein-1 (ZO-1). *J Neurocytol.* 2004 Jan;33(1):131-51.
- 65: Berthoud VM, Iwanij V, Garcia AM, Saez JC.
Connexins and glucagon receptors during development of rat hepatic acinus. *Am J Physiol.* 1992 Nov;263(5 Pt 1):G650-8.
- 66: Berthoud HR, Powley TL.
Characterization of vagal innervation to the rat celiac, suprarenal and mesenteric ganglia. *J Auton Nerv Syst.* 1993 Feb;42(2):153-69.
- 67: Saez JC, Spray DC, Nairn AC, Hertzberg E, Greengard P, Bennett MV.
cAMP increases junctional conductance and stimulates phosphorylation of the 27-kDa principal gap junction polypeptide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986 Apr;83(8):2473-7
- 68: DERMIETZEL R, YANCEY SB, TRAUB O, WILLECKE K, REVEL JP.
Major loss of the 28-kD protein of gap junction in proliferating hepatocytes. *J Cell Biol.* 1987 Oct;105(4):1925-34.
- 69: TAKEDA A, SAHEKI S, SHIMAZU T, TAKEUCHI N.
Phosphorylation of the 27-kDa gap junction protein by protein kinase C in vitro and in rat hepatocytes. *J Biochem (Tokyo).* 1989 Oct;106(4):723-7.
- 70: Jiang JX, Paul DL, Goodenough DA.
Posttranslational phosphorylation of lens fiber connexin46: a slow occurrence. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1993 Dec;34(13):3558-65.
- 71: Laing JG, Westphale EM, Engelmann GL, Beyer EC.
Characterization of the gap junction protein, connexin45. *J Membr Biol.* 1994 Apr;139(1):31-40.
- 72: SAEZ JC, NAIRN AC, CZERNIK AJ, SPRAY DC, HERTZBERG EL, GREENGARD P, BENNETT MV.
Phosphorylation of connexin 32, a hepatocyte gap-junction protein, by cAMP-dependent protein kinase, protein kinase C and Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. *Eur J Biochem.* 1990 Sep 11;192(2):263-73.
- 73: TAKEDA A, SAHEKI S, SHIMAZU T, TAKEUCHI N.
Phosphorylation of the 27-kDa gap junction protein by protein kinase C in vitro and in rat hepatocytes. *J Biochem (Tokyo).* 1989 Oct;106(4):723-7.
- 74: SAEZ JC, NAIRN AC, CZERNIK AJ, SPRAY DC, HERTZBERG EL, GREENGARD P, BENNETT MV.
Phosphorylation of connexin 32, a hepatocyte gap-junction protein, by cAMP-dependent protein kinase, protein kinase C and Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. *Eur J Biochem.* 1990 Sep 11;192(2):263-73.

- 78: BRISSETTE JL, KUMAR NM, GILULA NB, DOTTO GP.
The tumor promoter 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate and the ras oncogene modulate expression and phosphorylation of gap junction proteins.
Mol Cell Biol. 1991 Oct;11(10):5364-71.
- 79: Martinez AD, Hayrapetyan V, Moreno AP, Beyer EC.
Connexin43 and connexin45 form heteromeric gap junction channels in which individual components determine permeability and regulation.
Circ Res. 2002 May 31;90(10):1100-7.
- 80: Berthoud VM, Iwanij V, Garcia AM, Saez JC.
Connexins and glucagon receptors during development of rat hepatic acinus.
Am J Physiol. 1992 Nov;263(5 Pt 1):G650-8.
- 81: Berthoud HR, Powley TL.
Characterization of vagal innervation to the rat celiac, suprarenal and mesenteric ganglia.
J Auton Nerv Syst. 1993 Feb;42(2):153-69.
- 83: Laing JG, Westphale EM, Engelmann GL, Beyer EC.
Characterization of the gap junction protein, connexin45.
J Membr Biol. 1994 Apr;139(1):31-40.
- 84: Lampe PD.
Analyzing phorbol ester effects on gap junctional communication: a dramatic inhibition of assembly.
J Cell Biol. 1994 Dec;127(6 Pt 2):1895-905.
- 86: Lau AF, Kanemitsu MY, Kurata WE, Danesh S, Boynton AL.
Epidermal growth factor disrupts gap-junctional communication and induces phosphorylation of connexin43 on serine.
Mol Biol Cell. 1992 Aug;3(8):865-74.
- 87: Warn-Cramer BJ, Cottrell GT, Burt JM, Lau AF.
Regulation of connexin-43 gap junctional intercellular communication by mitogen-activated protein kinase.
J Biol Chem. 1998 Apr 10;273(15):9188-96.
- 88: Lampe PD, Lau AF.
The effects of connexin phosphorylation on gap junctional communication.
Int J Biochem Cell Biol. 2004 Jul;36(7):1171-86.
- 89: Saez JC, Nairn AC, Czernik AJ, Fishman GI, Spray DC, Hertzberg EL.
Phosphorylation of connexin43 and the regulation of neonatal rat cardiac myocyte gap junctions.
J Mol Cell Cardiol. 1997 Aug;29(8):2131-45.
- 90: Swenson KI, Piwnica-Worms H, McNamee H, Paul DL.
Tyrosine phosphorylation of the gap junction protein connexin43 is required for the pp60v-src-induced inhibition of communication.
Cell Regul. 1990 Dec;1(13):989-1002.
- 91: Crow DS, Kurata WE, Lau AF.
Phosphorylation of connexin43 in cells containing mutant src oncogenes.
Oncogene. 1992 May;7(5):999-1003.

- 92: Loo LW, Berestecky JM, Kanemitsu MY, Lau AF.
pp60src-mediated phosphorylation of connexin 43, a gap junction protein.
J Biol Chem. 1995 May 26;270(21):12751-61.
- 93: Swenson KI, Piwnica-Worms H, McNamee H, Paul DL.
Tyrosine phosphorylation of the gap junction protein connexin43 is required for
the pp60v-src-induced inhibition of communication.
Cell Regul. 1990 Dec;1(13):989-1002.
- 94: Saez JC, Spray DC, Nairn AC, Hertzberg E, Greengard P, Bennett MV.
cAMP increases junctional conductance and stimulates phosphorylation of the
27-kDa principal gap junction polypeptide.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1986 Apr;83(8):2473-7
- 95: Somogyi R, Kolb HA.
A G-protein mediates secretagogue-induced gap junctional channel closure in
pancreatic acinar cells.
FEBS Lett. 1989 Dec 4;258(2):216-8.
- 96: BRISSETTE JL, KUMAR NM, GILULA NB, DOTTO GP.
The tumor promoter 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate and the ras oncogene
modulate expression and phosphorylation of gap junction proteins.
Mol Cell Biol. 1991 Oct;11(10):5364-71.
- 97: Shiosaka S, Yamamoto T, Hertzberg EL, Nagy JJ.
Gap junction protein in rat hippocampus: correlative light and electron
microscope immunohistochemical localization.
J Comp Neurol. 1989 Mar 8;281(2):282-97.
- 98: BERTHOUD VM, LEDBETTER ML, HERTZBERG EL, SAEZ JC.
Connexin43 in MDCK cells: regulation by a tumor-promoting phorbol ester and Ca²⁺.
Eur J Cell Biol. 1992 Feb;57(1):40-50.
- 99: BERTHOUD VM, ROOK MB, TRAUB O, HERTZBERG EL, SAEZ JC.
On the mechanisms of cell uncoupling induced by a tumor promoter phorbol ester
in clone 9 cells, a rat liver epithelial cell line.
Eur J Cell Biol. 1993 Dec;62(2):384-96.
- 100: WASHIOKA H, WATANABE H, NEGISHI K, TONOSAKI A.
Horizontal-cell gap junction in the goldfish retina: area and density of
particles as revealed by complementary freeze replicas.
Arch Histol Cytol. 1991 May;54(2):181-8.
- 104: TRAUB O, LOOK J, DERMIETZEL R, BRUMMER F, HULSER D, WILLECKE K.
Comparative characterization of the 21-kD and 26-kD gap junction proteins in
murine liver and cultured hepatocytes.
J Cell Biol. 1989 Mar;108(3):1039-51.
- 105: SAEZ JC, GREGORY WA, WATANABE T, DERMIETZEL R, HERTZBERG EL, REID L,
BENNETT MV, SPRAY DC.
cAMP delays disappearance of gap junctions between pairs of rat hepatocytes in
primary culture.
Am J Physiol. 1989 Jul;257(1 Pt 1):C1-11. Erratum in: Am J Physiol 1989
Dec;257(6 Pt 1):G1041.

- 106: GIAUME C, FROMAGET C, EL AOUMARI A, CORDIER J, GLOWINSKI J, GROS D.
Gap junctions in cultured astrocytes: single-channel currents and characterization of channel-forming protein.
Neuron. 1991 Jan;6(1):133-43.
- 107: HOH JH, JOHN SA, REVEL JP.
Molecular cloning and characterization of a new member of the gap junction gene family, connexin-31.
J Biol Chem. 1991 Apr 5;266(10):6524-31.
- 108: RAHMAN S, CARLILE G, EVANS WH.
Assembly of hepatic gap junctions. Topography and distribution of connexin 32 in intracellular and plasma membranes determined using sequence-specific antibodies.
J Biol Chem. 1993 Jan 15;268(2):1260-5.
- 109: HOH JH, LAL R, JOHN SA, REVEL JP, ARNSDORF MF.
Atomic force microscopy and dissection of gap junctions.
Science. 1991 Sep 20;253(5026):1405-8.
- 111: BUKAUSKAS FF, ELFGANG C, WILLECKE K, WEINGART R.
Heterotypic gap junction channels (connexin26-connexin32) violate the paradigm of unitary conductance.
Pflugers Arch. 1995 Apr;429(6):870-2.
- 112: CAO F, ECKERT R, ELFGANG C, NITSCHKE JM, SNYDER SA, H-ULSER DF, WILLECKE K, NICHOLSON BJ.
A quantitative analysis of connexin-specific permeability differences of gap junctions expressed in HeLa transfectants and *Xenopus* oocytes.
J Cell Sci. 1998 Jan;111 (Pt 1):31-43.
- 113: HARRIS AL, BEVANS CG.
Exploring hemichannel permeability in vitro.
Methods Mol Biol. 2001;154:357-77.
- 114: VEENSTRA RD, WANG HZ, BEBLO DA, CHILTON MG, HARRIS AL, BEYER EC, BRINK PR.
Selectivity of connexin-specific gap junctions does not correlate with channel conductance.
Circ Res. 1995 Dec;77(6):1156-65.
- 115: NICHOLSON BJ, WEBER PA, CAO F, CHANG H, LAMPE P, GOLDBERG G.
The molecular basis of selective permeability of connexins is complex and includes both size and charge.
Braz J Med Biol Res. 2000 Apr;33(4):369-78. Review.
- 120: MORENO AP, ROOK MB, FISHMAN GI, SPRAY DC.
Gap junction channels: distinct voltage-sensitive and -insensitive conductance states.
Biophys J. 1994 Jul;67(1):113-9.
- 121: CALERO G, KANEMITSU M, TAFFET SM, LAU AF, DELMAR M.
A 17mer peptide interferes with acidification-induced uncoupling of connexin43.
Circ Res. 1998 May 18;82(9):929-35.

- 122: HOMMA N, ALVARADO JL, COOMBS W, STERGIOPOULOS K, TAFFET SM, LAU AF, DELMAR M.
A particle-receptor model for the insulin-induced closure of connexin43 channels.
Circ Res. 1998 Jul 13;83(1):27-32.
- 123: UNWIN PN, ENNIS PD.
Calcium-mediated changes in gap junction structure: evidence from the low angle X-ray pattern.
J Cell Biol. 1983 Nov;97(5 Pt 1):1459-66.
- 124: PERKINS GA, GOODENOUGH DA, SOSINSKY GE.
Formation of the gap junction intercellular channel requires a 30 degree rotation for interdigitating two apposing connexons.
J Mol Biol. 1998 Mar 27;277(2):171-7.
- 125: BARRIO LC, SUCHYNA T, BARGIELLO T, XU LX, ROGINSKI RS, BENNETT MV, NICHOLSON BJ.
Gap junctions formed by connexins 26 and 32 alone and in combination are differently affected by applied voltage.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1991 Oct 1;88(19):8410-4.
Erratum in: Proc Natl Acad Sci U S A. 1992 May 1;89(9):4220.
- 126: HENNEMANN H, SUCHYNA T, LICHTENBERG-FRATE H, JUNGBLUTH S, DAHL E, SCHWARZ J, NICHOLSON BJ, WILLECKE K.
Molecular cloning and functional expression of mouse connexin40, a second gap junction gene preferentially expressed in lung.
J Cell Biol. 1992 Jun;117(6):1299-310.
- 130: HULSER DF, RUTZ ML, ECKERT R, TRAUB O.
Functional rescue of defective mutant connexons by pairing with wild-type connexons.
Pflugers Arch. 2001 Jan;441(4):521-8.
- 131: KUMAR NM, GILULA NB.
The gap junction communication channel.
Cell. 1996 Feb 9;84(3):381-8. Review.
- 139: ABDULLA S.
Getting to the heart of gap junction pathology. Novartis Foundations Symposium: Gap junction-mediated intercellular signalling in health and disease. London, UK, 3-5 March 1998.
Mol Med Today. 1998 May;4(5):192-3..
- 140: BUTTERWECK A, ELFGANG C, WILLECKE K, TRAUB O.
Differential expression of the gap junction proteins connexin45, -43, -40, -31, and -26 in mouse skin.
Eur J Cell Biol. 1994 Oct;65(1):152-63.
- 141: CHOUDHRY R, TULI A, CHOUDHRY S.
Facial vein terminating in the external jugular vein. An embryologic interpretation.
Surg Radiol Anat. 1997;19(2):73-7.
- 142: GOLIGER JA, PAUL DL.
Expression of gap junction proteins Cx26, Cx31.1, Cx37, and Cx43 in developing and mature rat epidermis.
Dev Dyn. 1994 May;200(1):1-13.

- 143: GUO H, ACEVEDO P, PARSA FD, BERTRAM JS.
Gap-junctional protein connexin 43 is expressed in dermis and epidermis of human skin: differential modulation by retinoids.
J Invest Dermatol. 1992 Oct;99(4):460-7.
- 144: KAMIBAYASHI Y, OYAMADA M, OYAMADA Y, MORI M.
Expression of gap junction proteins connexin 26 and 43 is modulated during differentiation of keratinocytes in newborn mouse epidermis.
J Invest Dermatol. 1993 Dec;101(6):773-8.
- 145: KAMIBAYASHI Y, OYAMADA Y, MORI M, OYAMADA M.
Aberrant expression of gap junction proteins (connexins) is associated with tumor progression during multistage mouse skin carcinogenesis in vivo.
Carcinogenesis. 1995 Jun;16(6):1287-97.
- 146: LUKE RA, BEYER EC, HOYT RH, SAFFITZ JE.
Quantitative analysis of intercellular connections by immunohistochemistry of the cardiac gap junction protein connexin43.
Circ Res. 1989 Nov;65(5):1450-7.
- 147: RISEK B, KLIER FG, GILULA NB.
Multiple gap junction genes are utilized during rat skin and hair development.
Development. 1992 Nov;116(3):639-51
- 148: RICHARD G, LIN JP, SMITH L, WHYTE YM, ITIN P, WOLLINA U, EPSTEIN E JR, HOHL D, GIROUX JM, CHARNAS L, BALE SJ, DIGIOVANNA JJ.
Linkage studies in erythrokeratodermias: fine mapping, genetic heterogeneity and analysis of candidate genes.
J Invest Dermatol. 1997 Nov;109(5):666-71.
- 149: SALOMON D, MASGRAU E, VISCHER S, ULLRICH S, DUPONT E, SAPPINO P, SAURAT JH, MEDA P.
Topography of mammalian connexins in human skin.
J Invest Dermatol. 1994 Aug;103(2):240-7.
- 150: SAWEY MJ, GOLDSCHMIDT MH, RISEK B, GILULA NB, LO CW.
Perturbation in connexin 43 and connexin 26 gap-junction expression in mouse skin hyperplasia and neoplasia.
Mol Carcinog. 1996 Oct;17(2):49-61.
- 151: TADA J, HASHIMOTO K.
Ultrastructural localization of gap junction protein connexin 43 in normal human skin, basal cell carcinoma, and squamous cell carcinoma.
J Cutan Pathol. 1997 Nov;24(10):628-35.
- 152: SALOMON D, MASGRAU E, VISCHER S, ULLRICH S, DUPONT E, SAPPINO P, SAURAT JH, MEDA P.
Topography of mammalian connexins in human skin.
J Invest Dermatol. 1994 Aug;103(2):240-7.
- 153: RACZ D, ZILLIKENS S, FORSTREUTER P, NAGYKALDI Z, MAGYAR K, TOROK TL.
Pre-junctional stimulatory and post-junctional inhibitory effects of pinacidil in the isolated main pulmonary artery of the rabbit under different experimental conditions.
Pulm Pharmacol Ther. 1997 Aug;10(4):199-209.

- 154: DUFFY HS, DELMAR M, COOMBS W, TAFFTET SM, HERTZBERG EL, SPRAY DC.
Functional demonstration of connexin-protein binding using surface plasmon resonance.
Cell Commun Adhes. 2001;8(4-6):225-9.
- 155: TOYOFUKU T, AKAMATSU Y, ZHANG H, KUZUYA T, TADA M, HORI M.
c-Src regulates the interaction between connexin-43 and ZO-1 in cardiac myocytes.
J Biol Chem. 2001 Jan 19;276(3):1780-8. Epub 2000 Oct 16.
- 156: ROSS JM, MCINTIRE LV, MOAKE JL, RAND JH.
Platelet adhesion and aggregation on human type VI collagen surfaces under
physiological flow conditions.
Blood. 1995 Apr 1;85(7):1826-35.
- 157: BRENNISEN P, OH J, WLASCHEK M, WENK J, BRIVIBA K, HOMMEL C,
HERRMANN G, SIES H, SCHARFFETTER-KOCHANEK K.
Ultraviolet B wavelength dependence for the regulation of two major matrix-
metalloproteinases and their inhibitor TIMP-1 in human dermal fibroblasts.
Photochem Photobiol. 1996 Oct;64(4):649-57. Corrected and republished in:
Photochem Photobiol 1996 Nov;64(5):877-85.
- 158: KIELTY CM, SHUTTLEWORTH CA.
Microfibrillar elements of the dermal matrix.
Microsc Res Tech. 1997 Aug 15;38(4):413-27. Review.
- 159: VAN DER REST M, GARRONE R.
Collagen family of proteins.
FASEB J. 1991 Oct;5(13):2814-23. Review.
- 160: FLEISCHMAJER R, PERLISH JS, BURGESSON RE, SHAIKH-BAHAI F, TIMPL R.
Type I and type III collagen interactions during fibrillogenesis.
Ann N Y Acad Sci. 1990;580:161-75.
- 161: DOCHERTY AJ, O'CONNELL J, CRABBE T, ANGAL S, MURPHY G.
The matrix metalloproteinases and their natural inhibitors: prospects for
treating degenerative tissue diseases.
Trends Biotechnol. 1992 Jun;10(6):200-7. Review.
- 162: MATRISIAN LM.
The matrix-degrading metalloproteinases.
Bioessays. 1992 Jul;14(7):455-63. Review.
- 163: KAHARI VM, SAARIALHO-KERE U.
Matrix metalloproteinases in skin.
Exp Dermatol. 1997 Oct;6(5):199-213. Review.
- 164: KUGLER A.
Matrix metalloproteinases and their inhibitors.
Anticancer Res. 1999 Mar-Apr;19(2C):1589-92. Review.
- 165: STEIN B, RAHMSDORF HJ, STEFFEN A, LITFIN M, HERRLICH P.
UV-induced DNA damage is an intermediate step in UV-induced expression of human
Immunodeficiency virus type 1, collagenase, c-fos, and metallothionein.
Mol Cell Biol. 1989 Nov;9(11):5169-81.

- 166: SCHARFFETTER K, WLASCHEK M, HOGG A, BOLSEN K, SCHOTHORST A, GOERZ G, KRIEG T, PLEWIG G.
UVA irradiation induces collagenase in human dermal fibroblasts in vitro and in vivo.
Arch Dermatol Res. 1991;283(8):506-11.
- 167: SCHARFFETTER-KOCHANNEK K, KLEIN CE, HEINEN G, MAUCH C, SCHAEFER T, ADELMANN-GRILL BC, GOERZ G, FUSENIG NE, KRIEG TM, PLEWIG G.
Migration of a human keratinocyte cell line (HACAT) to interstitial collagen type I is mediated by the alpha 2 beta 1-integrin receptor.
J Invest Dermatol. 1992 Jan;98(1):3-11.
- 168: SCHARFFETTER-KOCHANNEK K.
Photoaging of the connective tissue of skin: its prevention and therapy.
Adv Pharmacol. 1997;38:639-55. Review.
- 169: PETERSEN MJ, HANSEN C, CRAIG S.
Ultraviolet A irradiation stimulates collagenase production in cultured human fibroblasts.
J Invest Dermatol. 1992 Oct;99(4):440-4.
- 170: HERRMANN G, WLASCHEK M, LANGE TS, PRENZEL K, GOERZ G, SCHARFFETTER-KOCHANNEK K.
UVA irradiation stimulates the synthesis of various matrix-metalloproteinases (MMPs) in cultured human fibroblasts.
Exp Dermatol. 1993 Mar;2(2):92-7.
- 171: WLASCHEK M, BOLSEN K, HERRMANN G, SCHWARZ A, WILMROTH F, HEINRICH PC, GOERZ G, SCHARFFETTER-KOCHANNEK K.
UVA-induced autocrine stimulation of fibroblast-derived-collagenase by IL-6: a possible mechanism in dermal photodamage?
J Invest Dermatol. 1993 Aug;101(2):164-8.
- 172: WLASCHEK M, HEINEN G, POSWIG A, SCHWARZ A, KRIEG T, SCHARFFETTER-KOCHANNEK K.
UVA-induced autocrine stimulation of fibroblast-derived collagenase/MMP-1 by interrelated loops of interleukin-1 and interleukin-6.
Photochem Photobiol. 1994 May;59(5):550-6.
- 173: WLASCHEK M, BRIVIBA K, STRICKLIN GP, SIES H, SCHARFFETTER-KOCHANNEK K.
Singlet oxygen may mediate the ultraviolet A-induced synthesis of interstitial collagenase.
J Invest Dermatol. 1995 Feb;104(2):194-8.
- 174: WLASCHEK M, WENK J, BRENNEISEN P, BRIVIBA K, SCHWARZ A, SIES H, SCHARFFETTER-KOCHANNEK K.
Singlet oxygen is an early intermediate in cytokine-dependent ultraviolet-A induction of interstitial collagenase in human dermal fibroblasts in vitro.
FEBS Lett. 1997 Aug 18;413(2):239-42.
- 175: KOIVUKANGAS V, KALLIOINEN M, AUTIO-HARMAINEN H, OIKARINEN A.
UV irradiation induces the expression of gelatinases in human skin in vivo.
Acta Derm Venereol. 1994 Jul;74(4):279-82.
- 176: WENK HN, HONDA CN.
Immunohistochemical localization of delta opioid receptors in peripheral tissues.
J Comp Neurol. 1999 Jun 14;408(4):567-79.

- 177: LIOTTA LA, RAO CN.
Tumor invasion and metastasis.
Monogr Pathol. 1986;(27):183-92.
- 178: APLIN AE, HOWE AK, JULIANO RL.
Cell adhesion molecules, signal transduction and cell growth.
Curr Opin Cell Biol. 1999 Dec;11(6):737-44. Review.
- 179: GIANCOTTI FG, RUOSLAHTI E.
Integrin signaling.
Science. 1999 Aug 13;285(5430):1028-32. Review.
- 180: XIA H, FITZGERALD J, BREDT DS, FORSAYETH JR.
Detection of mycoplasma infection of mammalian cells.
Biotechniques. 1997 May;22(5):934-6.
- 181: GROSSGEBAUER K, KEGEL M, WAGNER J.
[Fluorescent test of mycoplasma colonies by agar diffusion technique (author's transl)]
Klin Wochenschr. 1977 Jun 15;55(12):609-10. German.
- 182: BERX G, CLETON-JANSEN AM, NOLLET F, DE LEEUW WJ, VAN DE VIJVER M,
CORNELISSE C, VAN ROY F.
E-cadherin is a tumour/invasion suppressor gene mutated in human lobular breast cancers.
EMBO J. 1995 Dec 15;14(24):6107-15.
- 183: BERX G, CLETON-JANSEN AM, STRUMANE K, DE LEEUW WJ, NOLLET F,
VAN ROY F, CORNELISSE C.
E-cadherin is inactivated in a majority of invasive human lobular breast
cancers by truncation mutations throughout its extracellular domain.
Oncogene. 1996 Nov 7;13(9):1919-25.
- 184: SOMMERS CL, THOMPSON EW, TORRI JA, KEMLER R, GELMANN EP, BYERS SW.
Cell adhesion molecule uvomorulin expression in human breast cancer cell lines:
relationship to morphology and invasive capacities.
Cell Growth Differ. 1991 Aug;2(8):365-72.
- 185: THOMPSON EW, TORRI J, SABOL M, SOMMERS CL, BYERS S, VALVERIUS EM,
MARTIN GR, LIPPMAN ME, STAMPFER MR, DICKSON RB.
Oncogene-induced basement membrane invasiveness in human mammary epithelial cells.
Clin Exp Metastasis. 1994 May;12(3):181-94.
- 186: PIERCEALL WE, WOODARD AS, MORROW JS, RIMM D, FEARON ER.
Frequent alterations in E-cadherin and alpha- and beta-catenin expression in
human breast cancer cell lines.
Oncogene. 1995 Oct 5;11(7):1319-26.
- 187: NIEMAN MT, PRUDOFF RS, JOHNSON KR, WHEELLOCK MJ.
N-cadherin promotes motility in human breast cancer cells regardless of their
E-cadherin expression.
J Cell Biol. 1999 Nov 1;147(3):631-44.
- 188: LIOTTA LA, TRYGGVASON K, GARBISA S, HART I, FOLTZ CM, SHAFIE S.
Metastatic potential correlates with enzymatic degradation of basement membrane collagen.
Nature. 1980 Mar 6;284(5751):67-8.

- 189: NAKAJIMA M, WELCH DR, WYNN DM, TSURUO T, NICOLSON GL.
Serum and plasma M(r) 92,000 progelatinase levels correlate with spontaneous metastasis of rat 13762NF mammary adenocarcinoma.
Cancer Res. 1993 Dec 1;53(23):5802-7.
- 190: GARBISA S, NEGRO A, KALEBIC T, POZZATTI R, MUSCHEL R, SAFFIOTTI U, LIOTTA LA.
Type IV collagenolytic activity linkage with the metastatic phenotype induced by ras transfection.
Adv Exp Med Biol. 1988;233:179-86.
- 201: HAYASHI T, NOMATA K, CHANG CC, RUCH RJ, TROSKO JE.
Cooperative effects of v-myc and c-Ha-ras oncogenes on gap junctional intercellular communication and tumorigenicity in rat liver epithelial cells.
Cancer Lett. 1998 Jun 19;128(2):145-54.
- 202: TROSKO JE, RUCH RJ.
Cell-cell communication in carcinogenesis
Front Biosci. 1998 Feb 15;3:D208-36.
PMID: 9458335 [PubMed - as supplied by publisher]
- 203: LOEWENSTEIN WR.
Junctional intercellular communication: the cell-to-cell membrane channel.
Physiol Rev. 1981 Oct;61(4):829-913. Review.
- 204: HAYASHI T, NOMATA K, CHANG CC, RUCH RJ, TROSKO JE.
Cooperative effects of v-myc and c-Ha-ras oncogenes on gap junctional intercellular communication and tumorigenicity in rat liver epithelial cells.
Cancer Lett. 1998 Jun 19;128(2):145-54.
- 205: TROSKO JE, RUCH RJ.
Cell-cell communication in carcinogenesis
Front Biosci. 1998 Feb 15;3:D208-36.
- 206: MESNIL M.
Connexins and cancer.
Biol Cell. 2002 Nov;94(7-8):493-500. Review.
- 207: KALIMI GH, HAMPTON LL, TROSKO JE, THORGEIRSSON SS, HUGGETT AC.
Homologous and heterologous gap-junctional intercellular communication in v-raf-, v-myc-, and v-raf/v-myc-transduced rat liver epithelial cell lines.
Mol Carcinog. 1992;5(4):301-10.
- 208: HAYASHI T, NOMATA K, CHANG CC, RUCH RJ, TROSKO JE.
Cooperative effects of v-myc and c-Ha-ras oncogenes on gap junctional intercellular communication and tumorigenicity in rat liver epithelial cells.
Cancer Lett. 1998 Jun 19;128(2):145-54.
- 209: TADA J, HASHIMOTO K.
Ultrastructural localization of gap junction protein connexin 43 in normal human skin, basal cell carcinoma, and squamous cell carcinoma.
J Cutan Pathol. 1997 Nov;24(10):628-35.

- 210: BOUKAMP P, PETRUSSEVSKA RT, BREITKREUTZ D, HORNUNG J, MARKHAM A, FUSENIG NE.
Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line.
J Cell Biol. 1988 Mar;106(3):761-71.
- 211: BOUKAMP P, POPP S, ALTMeyer S, HULSEN A, FASCHING C, CREMER T, FUSENIG NE.
Sustained nontumorigenic phenotype correlates with a largely stable chromosome content during long-term culture of the human keratinocyte line HaCaT.
Genes Chromosomes Cancer. 1997 Aug;19(4):201-14.
- 212: FUSENIG NE, BOUKAMP P.
Multiple stages and genetic alterations in immortalization, malignant transformation, and tumor progression of human skin keratinocytes.
Mol Carcinog. 1998 Nov;23(3):144-58. Review.
- 213: BOUKAMP P, TILGEN W, DZARLIEVA RT, BREITKREUTZ D, HAAG D, RIEHL RK, BOHNERT A, FUSENIG NE.
Phenotypic and genotypic characteristics of a cell line from a squamous cell carcinoma of human skin.
J Natl Cancer Inst. 1982 Mar;68(3):415-27.
- 214: ISHIKAWA O, YOKOYAMA Y, MIYACHI Y.
Disaccharide analysis of dermal fibroblast-derived glycosaminoglycans in the three-dimensional culture.
J Dermatol Sci. 1994 Dec;8(3):203-7.
- 215: BOUKAMP P, PETRUSSEVSKA RT, BREITKREUTZ D, HORNUNG J, MARKHAM A, FUSENIG NE.
Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line.
J Cell Biol. 1988 Mar;106(3):761-71.
- 216: CLAIRMONT A, TESSMAN D, STOCK A, NICOLAI S, STAHL W, SIES H.
Induction of gap junctional intercellular communication by vitamin D in human skin fibroblasts is dependent on the nuclear vitamin D receptor.
Carcinogenesis. 1996 Jun;17(6):1389-91.
- 217: Berthoud VM, Iwanij V, Garcia AM, Saez JC.
Connexins and glucagon receptors during development of rat hepatic acinus.
Am J Physiol. 1992 Nov;263(5 Pt 1):G650-8.
- 218: KLOTZ LO, PATAK P, ALE-AGHA N, BUCHCZYK DP, ABDELMOHSEN K, GERBER PA, VON MONTFORT C, SIES H.
2-Methyl-1,4-naphthoquinone, vitamin K(3), decreases gap-junctional intercellular communication via activation of the epidermal growth factor receptor/extracellular signal-regulated kinase cascade.
Cancer Res. 2002 Sep 1;62(17):4922-8.

- 219: BERNEBURG M, GREYER-BECK S, KURTEN V, RUZICKA T, BRIVIBA K, SIES H, KRUTMANN J.
Singlet oxygen mediates the UVA-induced generation of the photoaging-associated mitochondrial common deletion.
J Biol Chem. 1999 May 28;274(22):15345-9.
- 220: SCHULZ WA, OBENDORF MS, SIES H.
Localization of strand breaks in plasmid DNA treated with reactive oxygen species.
Methods Enzymol. 1994;234:45-51.
- 221: KELLY KA, HAVRILLA CM, BRADY TC, ABRAMO KH, LEVIN ED.
Oxidative stress in toxicology: established mammalian and emerging piscine model systems.
Environ Health Perspect. 1998 Jul;106(7):375-84. Review.
- 222: BARNARD JA, LYONS RM, MOSES HL.
The cell biology of transforming growth factor beta.
Biochim Biophys Acta. 1990 Jun 1;1032(1):79-87. Review.
- 223: GABBIANI G, BADONNEL MC.
Contractile events during inflammation.
Agents Actions. 1976 Feb;6(1-3):277-80.
- 224: NOUCHI T, TANAKA Y, TSUKADA T, SATO C, MARUMO F.
Appearance of alpha-smooth-muscle-actin-positive cells in hepatic fibrosis.
Liver. 1991 Apr;11(2):100-5.
- 225: BERTSCH T, BLEUEL H, DESCHL U, REBEL W.
A new sensitive cardiac Troponin T rapid test (TROPT) for the detection of experimental acute myocardial damage in rats.
Exp Toxicol Pathol. 1999 Nov;51(6):565-9.
- 227: DETMAR M.
Tumor angiogenesis.
J Invest Dermatol Symp Proc. 2000 Dec;5(1):20-3. Review.
- 228: GUO H, ACEVEDO P, PARSA FD, BERTRAM JS.
Gap-junctional protein connexin 43 is expressed in dermis and epidermis of human skin: differential modulation by retinoids.
J Invest Dermatol. 1992 Oct;99(4):460-7.
- 229: MESNIL M.
Connexins and cancer.
Biol Cell. 2002 Nov;94(7-8):493-500. Review.
- 230: EDWARDS DR, MURPHY G.
Cancer. Proteases--invasion and more.
Nature. 1998 Aug 6;394(6693):527-8.
- 231: MEYER T, HART IR.
Mechanisms of tumour metastasis.
Eur J Cancer. 1998 Feb;34(2):214-21. Review.

- 232: MUELLER MM, FUSENIG NE.
Tumor-stroma interactions directing phenotype and progression of epithelial skin tumor cells.
Differentiation. 2002 Dec;70(9-10):486-97. Review.
- 233: MACDOUGALL JR, MATRISIAN LM.
Contributions of tumor and stromal matrix metalloproteinases to tumor progression, invasion and metastasis.
Cancer Metastasis Rev. 1995 Dec;14(4):351-62. Review.
- 234: SCHEIDEN R, WAGENER C, KNOLLE U, DIPPEL W, CAPESIUS C.
Atypical squamous cells of undetermined significance: audit and the impact of potential litigation. Retrospective review of 682 cases.
Cytopathology. 2003 Oct;14(5):257-62.
- 235: CANFIELD PJ, XU FN, GREENOAK GE, REEVE VE, GALLAGHER CH, WILKINSON F.
Ultrastructure of ultraviolet radiation-induced hairless mouse skin carcinogenesis, with special reference to the epidermal-dermal junction.
Pathology. 1986 Jul;18(3):337-44.
- 236: BOUDREAU N, MYERS C, BISSELL MJ.
From laminin to lamin: regulation of tissue-specific gene expression by the ECM.
Trends Cell Biol. 1995 Jan;5(1):1-4.
- 237: AUBIN F, HUMBEY O, GUERRINI JS, MOUGIN C, LAURENT R.
[Non-melanoma skin cancers and human papillomavirus]
Ann Dermatol Venereol. 2003 Dec;130(12 Pt 1):1131-8. Review.
- 238: BERTHOUD VM, ROOK MB, TRAUB O, HERTZBERG EL, SAEZ JC.
On the mechanisms of cell uncoupling induced by a tumor promoter phorbol ester in clone 9 cells, a rat liver epithelial cell line.
Eur J Cell Biol. 1993 Dec;62(2):384-96
- 239: BERTHOUD VM, ROOK MB, TRAUB O, HERTZBERG EL, SAEZ JC.
On the mechanisms of cell uncoupling induced by a tumor promoter phorbol ester in clone 9 cells, a rat liver epithelial cell line.
Eur J Cell Biol. 1993 Dec;62(2):384-96
- 240: YUSPA SH, KILKENNY AE, STEINERT PM, ROOP DR.
Expression of murine epidermal differentiation markers is tightly regulated by restricted extracellular calcium concentrations in vitro.
J Cell Biol. 1989 Sep;109(3):1207-17.
- 241: MUNSHI HG, GHOSH S, MUKHOPADHYAY S, WU YI, SEN R, GREEN KJ, STACK MS.
Proteinase suppression by E-cadherin-mediated cell-cell attachment in premalignant oral keratinocytes.
J Biol Chem. 2002 Oct 11;277(41):38159-67. Epub 2002 Jul 23.
- 242: PLOTKIN LI, BELLIDO T.
Bisphosphonate-induced, hemichannel-mediated, anti-apoptosis through the Src/ERK pathway: a gap junction-independent action of connexin43.
Cell Commun Adhes. 2001;8(4-6):377-82.

- 243: STOUT CE, COSTANTIN JL, NAUS CC, CHARLES AC.
Intercellular calcium signaling in astrocytes via ATP release through connexin hemichannels.
J Biol Chem. 2002 Mar 22;277(12):10482-8. Epub 2002 Jan 14.
- 244: PFAHNL A, DAHL G.
Gating of cx46 gap junction hemichannels by calcium and voltage.
Pflugers Arch. 1999 Feb;437(3):345-53.
- 245: PFAHNL A, DAHL G.
Localization of a voltage gate in connexin46 gap junction hemichannels.
Biophys J. 1998 Nov;75(5):2323-31.
- 246: ZHOU XW, PFAHNL A, WERNER R, HUDDER A, LLANES A, LUEBKE A, DAHL G.
Identification of a pore lining segment in gap junction hemichannels.
Biophys J. 1997 May;72(5):1946-53.
- 257: TOROK K, STAUFFER K, EVANS WH.
Connexin 32 of gap junctions contains two cytoplasmic calmodulin-binding domains.
Biochem J. 1997 Sep 1;326 (Pt 2):479-83.
- 258: MOSMANN T.
Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays.
J Immunol Methods. 1983 Dec 16;65(1-2):55-63.
- 259: HANSEN MB, NIELSEN SE, BERG K.
Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill.
J Immunol Methods. 1989 May 12;119(2):203-10.
- 260: YUSPA SH.
The pathogenesis of squamous cell cancer: lessons learned from studies of skin carcinogenesis.
J Dermatol Sci. 1998 May;17(1):1-7. Review.
- 261: HAYASHI T, NOMATA K, CHANG CC, RUCH RJ, TROSKO JE.
Cooperative effects of v-myc and c-Ha-ras oncogenes on gap junctional intercellular communication and tumorigenicity in rat liver epithelial cells.
Cancer Lett. 1998 Jun 19;128(2):145-54.
- 262: MESNIL M.
Connexins and cancer.
Biol Cell. 2002 Nov;94(7-8):493-500. Review.
- 263: FITZGERALD DJ, FUSENIG NE, BOUKAMP P, PICCOLI C, MESNIL M, YAMASAKI H.
Expression and function of connexin in normal and transformed human keratinocytes in culture.
Carcinogenesis. 1994 Sep;15(9):1859-65.
- 264: TAKEDA A, HASHIMOTO E, YAMAMURA H, SHIMAZU T.
Phosphorylation of liver gap junction protein by protein kinase C.
FEBS Lett. 1987 Jan 5;210(2):169-72.

- 265: DIFFEY B.
Climate change, ozone depletion and the impact on ultraviolet exposure of human skin.
Phys Med Biol. 2004 Jan 7;49(1):R1-11.
- 266: DE GRUIJL FR, LONGSTRETH J, NORVAL M, CULLEN AP, SLAPER H, KRIPKE ML, TAKIZAWA Y, VAN DER LEUN JC.
Health effects from stratospheric ozone depletion and interactions with climate change.
Photochem Photobiol Sci. 2003 Jan;2(1):16-28. Review. Erratum in: *Photochem Photobiol Sci.* 2003 Mar;2(3):354.
- 267: MORDAN LJ, BERGIN LM, BUDNICK JE, MEEGAN RR, BERTRAM JS.
Isolation of methylcholanthrene-"initiated" C3H/10T1/2 cells by inhibiting neoplastic progression with retinyl acetate.
Carcinogenesis. 1982;3(3):279-85.
- 268: ESINDUY CB, CHANG CC, TROSKO JE, RUCH RJ.
In vitro growth inhibition of neoplastically transformed cells by non-transformed cells: requirement for gap junctional intercellular communication.
Carcinogenesis. 1995 Apr;16(4):915-21.
- 269: KING TJ, FUKUSHIMA LH, DONLON TA, HIEBER AD, SHIMABUKURO KA, BERTRAM JS.
Correlation between growth control, neoplastic potential and endogenous connexin43 expression in HeLa cell lines: implications for tumor progression.
Carcinogenesis. 2000 Feb;21(2):311-5.
- 272: STAHL W, SIES H.
Effects of carotenoids and retinoids on gap junctional communication.
Biofactors. 2001;15(2-4):95-8.
- 273: STOCK A, SIES H.
Thyroid hormone receptors bind to an element in the connexin43 promoter.
Biol Chem. 2000 Sep-Oct;381(9-10):973-9.
- 274: HOSSAIN MZ, BOYNTON AL.
Regulation of Cx43 gap junctions: the gatekeeper and the password.
Sci STKE. 2000 Oct 17;2000(54):PE1. Review.
- 275: KRUTOVSKIKH V, YAMASAKI H.
The role of gap junctional intercellular communication (GJIC) disorders in experimental and human carcinogenesis.
Histol Histopathol. 1997 Jul;12(3):761-8. Review
- 276: NICHOLSON BJ, WEBER PA, CAO F, CHANG H, LAMPE P, GOLDBERG G.
The molecular basis of selective permeability of connexins is complex and includes both size and charge.
Braz J Med Biol Res. 2000 Apr;33(4):369-78. Review.
- 277: Saez JC, Nairn AC, Czernik AJ, Fishman GI, Spray DC, Hertzberg EL.
Phosphorylation of connexin43 and the regulation of neonatal rat cardiac myocyte gap junctions.
J Mol Cell Cardiol. 1997 Aug;29(8):2131-45.

- 278: Warn-Cramer BJ, Cottrell GT, Burt JM, Lau AF.
Regulation of connexin-43 gap junctional intercellular communication by mitogen-activated protein kinase.
J Biol Chem. 1998 Apr 10;273(15):9188-96.
- 279: CRUCIANI V, MIKALSEN SO.
Connexins, gap junctional intercellular communication and kinases.
Biol Cell. 2002 Nov;94(7-8):433-43. Review.
- 280: HERVE JC, SARROUILHE D.
Modulation of junctional communication by phosphorylation: protein phosphatases, the missing link in the chain.
Biol Cell. 2002 Nov;94(7-8):423-32. Review.
- 281: GIRI U, SHARMA SD, ABDULLA M, ATHAR M.
Evidence that in situ generated reactive oxygen species act as a potent stage I tumor promoter in mouse skin.
Biochem Biophys Res Commun. 1995 Apr 17;209(2):698-705.
- 282: ARORA-KURUGANTI P, LUCCHESI PA, WURSTER RD.
Proliferation of cultured human astrocytoma cells in response to an oxidant and antioxidant.
J Neurooncol. 1999;44(3):213-21.
- 283: FANG J, SAWA T, AKAIKE T, GREISH K, MAEDA H.
Enhancement of chemotherapeutic response of tumor cells by a heme oxygenase inhibitor, pegylated zinc protoporphyrin.
Int J Cancer. 2004 Mar 10;109(1):1-8.
- 284: NISHIDA M, FUTAMI S, MORITA I, MAEKAWA K, MUROTA SI.
Hypoxia-reoxygenation inhibits gap junctional communication in cultured human umbilical vein endothelial cells.
Endothelium. 2000;7(4):279-86.
- 285: SHAO C, FURUSAWA Y, AOKI M, ANDO K.
Role of gap junctional intercellular communication in radiation-induced bystander effects in human fibroblasts.
Radiat Res. 2003 Sep;160(3):318-23.
- 286: JUNN E, LEE KN, JU HR, HAN SH, IM JY, KANG HS, LEE TH, BAE YS, HA KS, LEE ZW, RHEE SG, CHOI I.
Requirement of hydrogen peroxide generation in TGF-beta 1 signal transduction in human lung fibroblast cells: involvement of hydrogen peroxide and Ca²⁺ in TGF-beta 1-induced IL-6 expression.
J Immunol. 2000 Aug 15;165(4):2190-7.
- 287: TANG B, VU M, BOOKER T, SANTNER SJ, MILLER FR, ANVER MR, WAKEFIELD LM.
TGF-beta switches from tumor suppressor to prometastatic factor in a model of breast cancer progression.
J Clin Invest. 2003 Oct;112(7):1116-24.
- 288: YAN T, RIGGS BL, BOYLE WJ, KHOSLA S.
Regulation of osteoclastogenesis and RANK expression by TGF-beta1.
J Cell Biochem. 2001 Aug 1-9;83(2):320-5.

- 289: TOBIN SW, DOUVILLE K, BENBOW U, BRINCKERHOFF CE, MEMOLI VA, ARRICK BA.
Consequences of altered TGF-beta expression and responsiveness in breast cancer: evidence for autocrine and paracrine effects.
Oncogene. 2002 Jan 3;21(1):108-18.
- 290: SIMEONE DM, PHAM T, LOGSDON CD.
Disruption of TGFbeta signaling pathways in human pancreatic cancer cells.
Ann Surg. 2000 Jul;232(1):73-80.
- 291: KIM R, TANABE K, EMI M, UCHIDA Y, TOGE T.
Potential roles of antisense therapy in the molecular targeting of genes involved in cancer (review).
Int J Oncol. 2004 Jan;24(1):5-17.
- 292: LI WQ, QURESHI HY, LIACINI A, DEHNADE F, ZAFARULLAH M.
Transforming growth factor beta1 induction of Tissue Inhibitor of MetalloProteinases 3 in articular chondrocytes is mediated by reactive oxygen species.
Free Radic Biol Med. 2004 Jul 15;37(2):196-207.
- 293: VALDES F, MURILLO MM, VALVERDE AM, HERRERA B, SANCHEZ A, BENITO M, FERNANDEZ M, FABREGAT I.
Transforming growth factor-beta activates both pro-apoptotic and survival signals in fetal rat hepatocytes.
Exp Cell Res. 2004 Jan 1;292(1):209-18.
- 294: CHIU C, MADDOCK DA, ZHANG Q, SOUZA KP, TOWNSEND AR, WAN Y.
TGF-beta-induced p38 activation is mediated by Rac1-regulated generation of reactive oxygen species in cultured human keratinocytes.
Int J Mol Med. 2001 Sep;8(3):251-5.
- 295: DE WEVER O, MAREEL M.
Role of myofibroblasts at the invasion front.
Biol Chem. 2002 Jan;383(1):55-67. Review.
- 296: SERINI G, GABBIANI G.
Mechanisms of myofibroblast activity and phenotypic modulation.
Exp Cell Res. 1999 Aug 1;250(2):273-83. Review.
- 297: POWELL DW, MIFFLIN RC, VALENTICH JD, CROWE SE, SAADA JI, WEST AB.
Myofibroblasts. I. Paracrine cells important in health and disease.
Am J Physiol. 1999 Jul;277(1 Pt 1):C1-9. Review.
- 298: POWELL DW, MIFFLIN RC, VALENTICH JD, CROWE SE, SAADA JI, WEST AB.
Myofibroblasts. II. Intestinal subepithelial myofibroblasts.
Am J Physiol. 1999 Aug;277(2 Pt 1):C183-201. Review.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Peter Brenneisen für die Überlassung des überaus interessanten Themas dieser Arbeit sowie die hervorragende wissenschaftliche Betreuung im Verlauf der Durchführung.

Ebenso gilt mein Dank Herrn Universitätsprofessor Dr. Dr. Helmut Sies für vielfältige Anregungen und für die Möglichkeit, diese Arbeit in seinem Institut durchführen zu können.

Herrn Professor Dr. Joachim Ernst (Institut für Mikrobiologie, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf) danke ich sehr für die Übernahme des Korreferates.

Bei Dr. Roland Reinehr (Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf) bedanke ich mich für die Kooperation.

Darüber hinaus möchte ich mich sehr bei und Professor Dr. Tankred Schewe und PD Dr. Lars-Oliver Klotz, für ihr stetes Bemühen um fachliche Beratungen und konstruktive Gespräche bedanken. Ein besonderer Dank gilt auch Andrea Borchardt, Marlis Scholtes und Sonja Gründel für ihre stets kompetente Hilfe in administrativen Fragen.

Ich danke weiterhin allen weiteren Mitarbeitern des Instituts für ein ausgezeichnetes Arbeitsklima aber auch für zahlreiche Hilfestellungen, insbesondere Claudia von Montfort, Ira Melchheier, Juliane Beier, Kotb Abdelmohsen, Bernhard Wendlandt, Bahar Cat und Felicitas Daubrawa.

Mein besonderer Dank gilt aber auch meinem Laborkollegen Dr. Holger Steinbrenner, Cristy Ramos, Dragana Mitic, Jang-He Oh und Claudia Wyrich.

Nicht zuletzt möchte ich mich auch bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken, die mich immer unterstützt haben.

Den größten Dank schulde ich jedoch meiner Frau Diana, die so manche Laune und Phase, insbesondere gegen Ende dieser Dissertation, gleichmütig ertragen und mir sehr viel Kraft gegeben hat. Ohne sie wäre diese Arbeit nicht entstanden.