

# **Untersuchungen zur Rolle von Connexin32 in der chemisch-induzierten Hepatokanzerogenese im Mausmodell**

**Dissertation**

der Fakultät für Chemie und Pharmazie  
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen  
zur Erlangung des Grades eines Doktors  
der Naturwissenschaften

2000

vorgelegt von

Oliver Mönnikes

Tag der mündlichen Prüfung: 01.08.2000

Dekan: Prof. Dr. U. Nagel

1. Berichterstatter: Prof. Dr. M. Schwarz

2. Berichterstatter: Prof. Dr. K. W. Bock

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Toxikologie unter Anleitung von Prof. Dr. M. Schwarz und der Betreuung durch Prof. Dr. Karl-Walter Bock im Zeitraum vom November 1996 bis zum Juni 2000 durchgeführt.

## Danksagungen

Herrn Prof. Dr. K. W. Bock danke ich für die Bereitschaft, die vorliegende Arbeit an der Fakultät für Chemie und Pharmazie der Universität Tübingen zu vertreten und zu betreuen.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. M. Schwarz, für die Überlassung des Themas, Bereitstellung des Arbeitsplatzes, die ausgezeichnete Betreuung und die Einführung in „optisches Denken“.

Bei den Mitgliedern der Arbeitsgruppe möchte ich mich für das angenehme Arbeitsklima, die gute Zusammenarbeit und die interessanten Diskussionen bedanken; bei Dr. Albrecht Buchmann für seine ständige Ansprechbarkeit und „Rat und Tat“; Johanna Mahr für all das, was aus Räumen mit Geräten und einer Ansammlung von Personen ein wirklich gutes Labor macht; Elke Zabinski für „Schneiden und Färben“ sowie das tolle Mikroklima in unserem Labor; Herrn Schuster für seinen ständigen Einsatz „rund um`s Mäusemachen“; Alex & Co. für die Glanzzeiten im VG; Christoph B., dem „King of Western“ für..., na was wohl?

Allen Mitarbeitern des Institutes für Toxikologie danke ich für die ausgesprochen freundschaftliche und kollegiale Atmosphäre.

Herrn Prof. Dr. J. Werringloer danke ich für die Hilfe bei der Durchführung der Experimente zur Bestimmung mikrosomaler Enzyme.

Herrn Prof. Dr. K. Willecke und seiner Arbeitsgruppe danke ich für die Bereitstellung von Cx32-Null-Mäusen und die gemeinsamen Projekte.

Ein „Tack så mycket“ geht nach Schweden zu Prof. L. Poellinger und seiner Arbeitsgruppe am Karolinska Institutet, insbesondere an Jacqueline Mcguire, Patrik Andersson und Pekka Kallio, für die Einführung in die Genotypisierung gentechnisch veränderter Mäuse und zwei lehrreiche und angenehme Aufenthalte in Stockholm.

Tiefer Dank gilt meinen Eltern, meinem Bruder und meinen Tanten für langjährige Unterstützung jedweder Art.

Last but not least Dank allen N.N.-Freunden, die hier nicht explizit genannt sind, für alles, was hier auch nicht explizit aufgeführt wird, aber das Leben lebenswert macht.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Moennikes, O., Buchmann, A., Ott, T., Willecke, K. und Schwarz, M. (1999)

The effect of Connexin32 null mutation on hepatocarcinogenesis in different mice strains.  
Carcinogenesis, **20**: 1379-1382.

<b>1. EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
1.1. Mehrstufenmodell der Kanzerogenese.....	1
1.2. Tumorpromotion.....	2
1.3. Gap Junctional Intercellular Communication (GJIC) .....	4
1.4. Struktur der Gap Junctions.....	5
1.5. Die Connexin-Genfamilie .....	7
1.6. Rolle der GJIC im Kanzerogeneseprozess.....	9
1.7. Aufgabenstellung.....	11
<b>2. MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>13</b>
2.1. Chemikalien.....	13
2.2. Reagenziensets (Kits).....	14
2.3. Laborgeräte .....	14
2.4. Sonstiges.....	15
2.5. Lösungen und Puffer .....	16
2.5.1. Histologie.....	16
2.5.2. Molekularbiologie.....	19
2.5.3. Proteinbestimmung (Biuret-KCN).....	20
2.5.4. Enzymologie .....	21
2.6. Versuchstiere.....	22
2.6.1. Tierhaltung und Zucht.....	22
2.6.2. Versuchsaufbau und Behandlung.....	23
2.6.2.1. Experiment I: Genetischer Hintergrund.....	23
2.6.2.2. Experiment II: Mosaik-Expression von Cx32.....	23
2.6.2.3. Experiment IIIa: Promotionsversuch .....	24
2.6.2.4. Phenobarbital IIIb: Inhibitionsversuch.....	25
2.6.2.5. Experiment IIIc: Biochemische Messungen .....	25

<b>2.7. Methoden</b> .....	<b>26</b>
2.7.1. Kennzeichnung der Tiere und Probenahme für die DNA-Analyse.....	26
2.7.2. DNA-Analyse mittels PCR .....	28
2.7.3. Induktion von Lebertumoren.....	32
2.7.4. Tötung der Tiere und Leberentnahme.....	33
2.7.5. Anfertigung von Paraffinschnitten.....	34
2.7.5.1. Konservierung von Leberproben.....	34
2.7.5.2. Paraffineinbettung.....	35
2.7.5.3. Silanisierung der Objektträger .....	35
2.7.5.4. Schneiden.....	36
2.7.5.5. Entparaffinieren der Schnitte .....	36
2.7.6. Anfertigung von Kryostatschnitten.....	36
2.7.6.1. Silanisierung der Objektträger .....	36
2.7.6.2. Schneiden.....	36
2.7.7. Histochemische Färbungen .....	36
2.7.7.1. Enzymhistologische Färbungen .....	36
2.7.7.2. Immunhistologische Färbungen .....	37
2.7.7.3. Gegenfärbung mit Hämalaun-Eosin (H&E).....	43
2.7.7.4. Eindecken mit Entellan ® oder Kaysers Glyceringelatine.....	44
2.7.8. Quantitative Auswertung der Leberschnitte.....	44
2.7.9. Cytochrom b <sub>5</sub> und Cytochrom P-450 Bestimmung.....	45
2.7.9.1. Präparation von Mikrosomen.....	45
2.7.9.2. Proteinbestimmung .....	47
2.7.9.3. Bestimmung von Cytochrome P-450 und b <sub>5</sub> .....	48
<b>3. ERGEBNISSE</b> .....	<b>50</b>
<b>3.1. Experiment I: Genetischer Hintergrund</b> .....	<b>50</b>
3.1.1. Körper- und relatives Lebergewicht.....	50
3.1.2. Kanzerogene Antwort im Experiment I .....	51
<b>3.2. Experiment II: Mosaik-Expression von Cx32</b> .....	<b>54</b>
3.2.1. Körper- und relatives Lebergewicht im Experiment II.....	55
3.2.2. Mosaikartige Expression von Cx32 im Normalgewebe.....	55
3.2.3. Cx32-Phänotyp präneoplastisch- und neoplastisch-veränderter Läsionen.....	56
3.2.4. Analyse der c-Jun-Expression in Lebertumoren .....	58
3.2.5. Ki67-Markierungsindex in Tumoren mit mosaikartiger Cx32-Expression .....	59

<b>3.3. Experiment III: Phenobarbitalstudie</b> .....	<b>59</b>
3.3.1. Experiment IIIa: Promotionsstudie .....	60
3.3.1.1. Körper- und Lebergewichte im Experiment IIIa (Promotionsstudie) .....	60
3.3.1.2. Kanzerogene Antwort im Experiment IIIa (Promotionsstudie).....	61
3.3.2. Experiment IIIb: Inhibitionsstudie .....	64
3.3.2.1. Körper- und relatives Lebergewicht im Experiment IIIb (Inhibitionsstudie) .....	64
3.3.2.2. G-6-Pase-defiziente Foci im Experiment IIIb (Inhibitionsstudie) .....	65
3.3.3. Expression von Connexin32 im Lebernorgewebe sowie in Lebertumoren .....	66
3.3.4. Effekt einer Kurzzeit-Phenobarbitalbehandlung auf die Lebergewichte sowie die Lebergehalte mikrosomaler Enzyme .....	67
<b>4. DISKUSSION</b> .....	<b>69</b>
<b>4.1. Experiment I: Genetischer Hintergrund</b> .....	<b>69</b>
<b>4.2. Experiment II: Mosaik-Expression von Cx32</b> .....	<b>70</b>
<b>4.3. Experiment III: Phenobarbitalstudie</b> .....	<b>73</b>
<b>5. ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>78</b>
<b>FARBTAFEL</b> .....	<b>80</b>
<b>6. LITERATURVERZEICHNISS</b> .....	<b>83</b>
<b>7. ANHANG</b> .....	<b>98</b>

## Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Abk.	Abkürzung
AK	Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxidisulfat
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indoloyl-phosphat, Toluidin-Salz
bp	Basenpaar
BrdUrd	5-Brom-2'-desoxyuridin
BSA	Rinderserumalbumin
Cx	Connexin
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DEN	Diethylnitrosamin
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxynucleotridtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
F1	erste Filialgeneration
G-6-Pase	Glukose-6-Phosphatase
H&E	Hämalaun und Eosin
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethan-sulfonsäure
HRP	Merrettichperoxidase
i.p.	intraperitoneal
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
KG	Körpergewicht
Lsg.	Lösung
MOPS	3-(N-Morpholino)-propan-sulfonsäure
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
PB	Phenobarbital
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
RT	Raumtemperatur
SDS	<i>Sodiumdodecylsulfate</i>
Tab.	Tabelle
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Upm	Umdrehungen pro Minute
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	<i>weight per volume</i>
w/w	<i>weight per weight</i>
wt	Wildtyp

## 1. Einleitung

### 1.1. *Mehrstufenmodell der Kanzerogenese*

Die heutige Vorstellung von der Kanzerogenese als einem mehrstufigen Prozess stammt aus den vierziger Jahren des 20. Jahrhunderts und beruht auf den Pionierarbeiten von Rous und Kidd (1941), Berenblum (1941a und b) Mottram (1944) Friedewald und Rous, (1944) und Berenblum und Shubik (1947 und 1949). Diese Experimente an der Nagelhaut (Kaninchenohr und Mäuserückenhaut) führten zu einem 2-Stufen-Modell. Inhaltsstoffe aus dem Steinkohleteer führten bei langfristiger Anwendung zum Auftreten von Tumoren, wenn eine (scheinbare) Wirkschwelle bei der Dosierung überschritten wurde. Unterhalb dieses Bereiches war keine Erhöhung der Tumorinzidenz zu erkennen. Andere Substanzen, wie Inhaltsstoffe aus dem stark hautreizenden Crotonöl (Samenöl aus *Croton Tigilum*), erhöhte die Tumorinzidenz selbst bei langfristiger Applikation nicht. Ging der chronischen Crotonölbehandlung jedoch auch nur eine einzige „unterschwellige“ Steinkohleteerapplikation voraus, dann zeigten sich bei einem erhöhten Prozentsatz der Tiere Papillome und Karzinome. Bei der Umkehrung der Anwendungsfolge wurde kein derartiger Effekt gesehen. Weitere Variationen der Behandlungsschemata (insbesondere Variationen der Einzeldosen bei konstanter Gesamtdosis, der Behandlungszeiträume und der behandlungsfreien Perioden) führten zu dem Konzept, welches phänomenologisch zwischen Initiation und Promotion unterscheidet. Dementsprechend werden Stoffe, die auf der entsprechenden Stufe verstärkend/beschleunigend wirken, als Initiatoren bzw. Promotoren bezeichnet (zur Übersicht siehe Boutwell, 1974).

In der ersten Stufe, der Initiation, entstehen, z.B. durch kanzerogene Substanzen wie im Steinkohleteer, irreversibel veränderte Zellen („initiierte“ Zellen oder Tumovorläuferzellen genannt). Diese unterscheiden sich phänotypisch nur wenig, wenn überhaupt, von normalen Körperzellen, weisen aber, wie spätere Untersuchungen zeigten, charakteristische Mutationen in zellregulatorisch wichtigen Genen auf. In der zweiten Stufe, der Promotion, erfolgt eine (weitgehend reversible) klonale Expansion dieser Vorläuferzellen, welche durch Substanzen, wie sie auch im Crotonöl vorkommen, beschleunigt werden kann.

Die Einteilung von Wirkstoffen in Promotoren und Initiatoren ist allerdings nicht absolut, da viele Substanzen beide Prozesse beeinflussen, wobei häufig eine Wirkungsweise dominiert. Das wirksame Agens aus dem Crotonöl, 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetat (TPA) ist z.B. als Promotor von Hauttumoren bekannt, führt aber darüber hinaus,

## Einleitung

wenn auch schwach ausgeprägt, zu Chromosomenaberrationen und Genamplifikationen (Emerit and Cerutti, 1982; Varshavsky, 1981), zeigt also auch irreversible genotoxische Wirkungen.

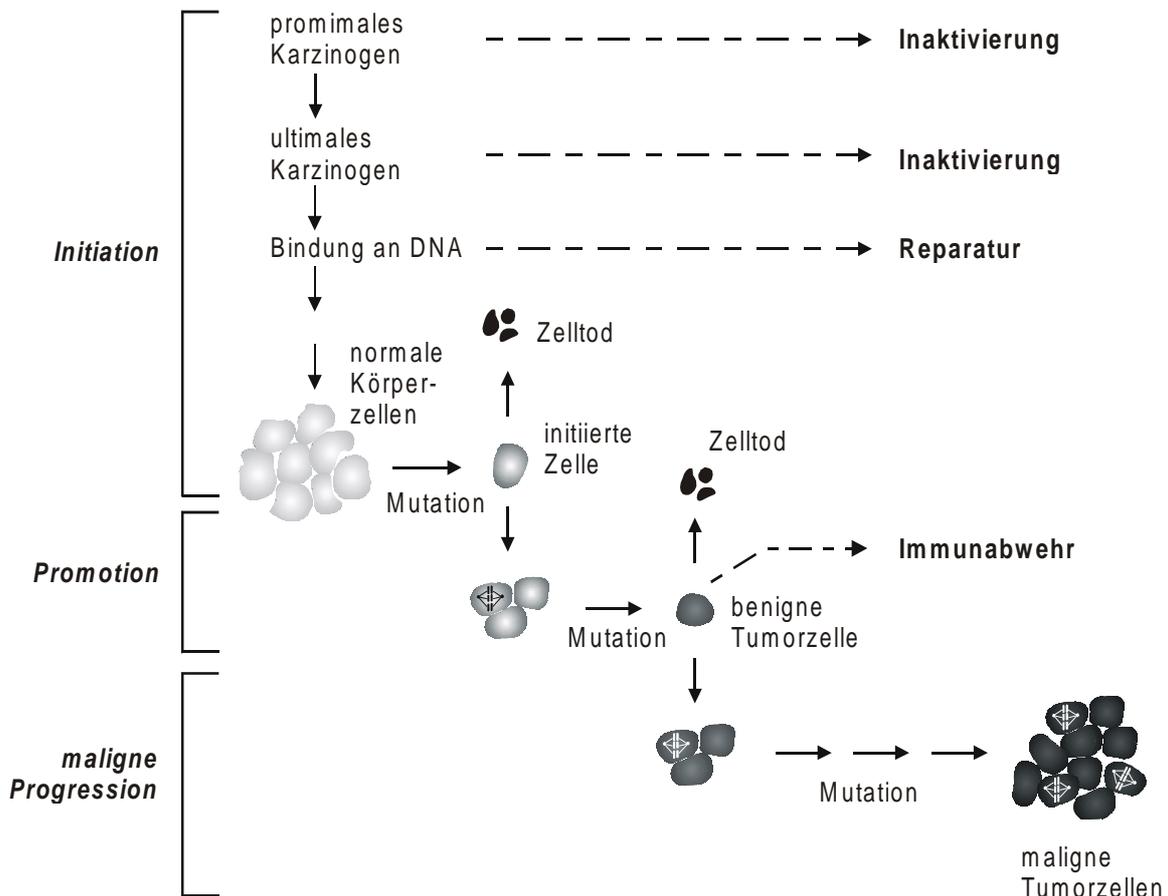
Die Bedeutung des Mehrstufenmodells der Kanzerogenese zeigt sich darin, dass es auch in anderen Organen wie Leber, Pankreas, Lunge, Blase und Niere erfolgreiche Anwendung gefunden hat (zur Übersicht siehe Scribner und Süss, 1978).

In Bezug auf den Menschen stützt sich das Konzept des mehrstufigen Verlaufes der Kanzerogenese insbesondere auf epidemiologische Studien. Mit Ausnahme weniger Krebsformen, welche beim Menschen bevorzugt im Kindesalter auftreten, sind Tumoren eine „Alterserkrankung“. Sie sind in der Regel bei Personen unter 30 Jahren eher selten; ihre Inzidenz steigt dagegen im letzten Lebensdrittel stark an. In den Industrienationen werden ungefähr 60 % der Krebstodesfälle bei Personen über 65 Jahren beobachtet. Diese Beobachtung ist in Übereinstimmung mit der Annahme einer sequentiell ablaufenden Akkumulation mehrerer Mutationsereignisse in einzelnen Somazellen, die dann in der Summe den malignen Phänotyp der betroffenen Zelle bedingen. Molekulargenetische Analysen verschiedener Tumorerkrankungen haben gezeigt, dass zwei (Retinoblastom) oder aber mehrere (kolorektales Karzinom) Mutationsereignisse in Tumorsuppressorgenen und/oder Protoonkogenen zur Entstehung dieser Krebsformen beitragen (siehe Fearon und Vogelstein, 1990).

### **1.2. Tumorpromotion**

Vermutlich ebenso bedeutsam wie die mutationsabhängigen Stufen der Initiation und Progression (Umwandlung benigner in maligne Tumoren) ist die Promotion, wie am Mehrstufen-Kanzerogenesemodell (s. Abb. 1-1) von Knudson und Moolgavkar erläutert werden soll (Moolgavkar und Knudson, 1981; Moolgavkar, 1983). Nach diesem entwickeln sich Tumorzellen in zwei oder mehreren Schritten über Zwischenzellpopulationen (Tumorvorläuferzellen). Der Initiation (Übergang von der Normalzelle in die Tumorvorläuferzelle), der Konversion (Übergang der Tumorvorläuferzelle in die Tumorzelle) und der Progression (schrittweise Malignisierung der Tumorzellpopulation) liegen Mutationsereignisse in „tumorassoziierten“ Genen zugrunde. Die Mutationsrate wird maßgeblich von der Zellteilungsrate beeinflusst: Erhöhung der Zellteilungsrate bedingt eine höhere Mutationsrate, da in der Regel eine DNA-Replikation notwendig ist, um eine Mutation zu „fixieren“. Der zweite wichtige Faktor ist das Proliferationsverhalten der Tumorvorläuferzellpopulation, wobei unter Proliferation die Nettozuwachsrate dieser Zellen über die Zeit zu verstehen ist. Diese resultiert aus den Teilungs- und Absterberaten der zugrundelie-

genden Zellen. Schon geringfügige Änderungen in einem oder beiden dieser Parameter können in einem Jahre bzw. Jahrzehnte andauernden Prozess die Größe der Population der transformierten Zellen und damit die Wahrscheinlichkeit der Krebsentstehung massiv beeinflussen.



**Abbildung 1-1:** Mehrstufenmodell der Kanzerogenese. In Ergänzung zum Text enthält das abgebildete Modell die maligne Progression als eigene Stufe. In der Initiation ist die bei einigen Kanzerogene notwendige metabolische Aktivierung der an sich unwirksamen Ausgangssubstanz (proximales Kanzerogen) zum eigentlich wirksamen Agens (ultimales Kanzerogen) aufgeführt. Neben der Apoptose sind ferner die metabolische Inaktivierung, DNA-Reperatur und Immunabwehr als weitere Mechanismen zur Tumorabwehr integriert. (Verändert nach Schwarz und Bock, 1998).

Mechanismus einer promovierenden Aktivität kann kompensatorische oder regenerative Zellproliferation als Folge einer Vergiftung, einer mechanischen Gewebereizung oder z.B. einer partiellen Hepatektomie sein. Eine tumorpromovierende Wirkung besitzen darüber hinaus Stoffe, die für die Zielzellen direkte Mitogene darstellen. Hierzu zählen das bereits erwähnte TPA ebenso wie einige Umweltstoffe aus dem Bereich der polyhalogenierten Dibenzodioxine, Dibenzofurane und Biphenyle sowie Organochlorinsektizide (Schulte-Hermann, 1985).

## Einleitung

Tumorpromotoren können durch anti-apoptotische Wirkungen die Gewebemhomöostase normaler, insbesondere aber transformierter Zellen, stören. Strukturell sehr unterschiedliche leberspezifische Tumopromotoren wie Nafenopin, Phenobarbital oder 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-p-dioxin (TCDD) vermindern die Reaktionsbereitschaft präneoplastisch-veränderter Hepatocyten auf Apoptosesignale zu reagieren, und tragen so zur klonalen Expansion der Zellpopulation bei (Bursch, 1992; Stinchcombe et al., 1995). Die zugrundeliegenden Mechanismen sind nur zum Teil verstanden. Diskutiert wird allerdings in diesem Zusammenhang ein Effekt, den eine Vielzahl von Tumorpromotoren auslösen können, nämlich eine Hemmung der sogenannten *gap junctional intercellular communication* (Yamasaki, 1996; Trosko, 1994).

### **1.3. Gap Junctional Intercellular Communication (GJIC)**

Krebs kann als eine Erkrankung an „gestörter Gewebshomöostase“ bezeichnet werden, vermittelt durch Defekte in der intra- extra- und interzellulären Kommunikation, welche die empfindliche Balance zwischen der zellulären Proliferation, der Differenzierung, der Apoptose und der Adaptation an geänderte Umgebungsbedingungen stören. Eine der am weitesten verbreiteten und ältesten Formen der interzellulären Kommunikation, welche man in vielen neoplastischen Zellen gestört findet, ist die über *gap junctions*. Bereits bei primitiven Vertebraten wie Quallen und Hydra zu finden, treten *gap junctions* beim adulten Säuger praktisch in allen Zelltypen auf. Zu den wenigen bekannten Ausnahmen zählen Skelettmuskelfibern, bestimmte Neuronen und zirkulierende Blutzellen, wobei es unter letzteren möglicherweise auch *gap junction* Protein exprimierende Vertreter gibt (Loewenstein, 1981; Bennett, 1990; Beyer und Steinberg, 1991).

Die in den *gap junctions* vorhandenen Kanäle bieten eine einfache und effektive Synchronisationsmöglichkeit für die in vielzelligen Organismen benötigten konzertierten Antworten ganzer Zellgruppen bis hin zu Organen auf äußere und innere Stimuli: Sie ermöglichen den direkten Austausch von Ionen, Metaboliten und Botenstoffen zwischen benachbarten Zellen, ein Vorgang der als *gap junctional intercellular communication* (GJIC) bezeichnet wird.

Die Aufgaben, welche der GJIC zugeordnet werden, gehen über die Wachstumskontrolle hinaus. Hinzukommen:

- Homöostase im Sinne einer raschen Gleichgewichtseinstellung von Nährstoffen, Ionen und Flüssigkeit zwischen den Zellen, die vielleicht älteste, verbreiteste und wichtigste Funktion dieser Kanäle (Loewenstein, 1981).

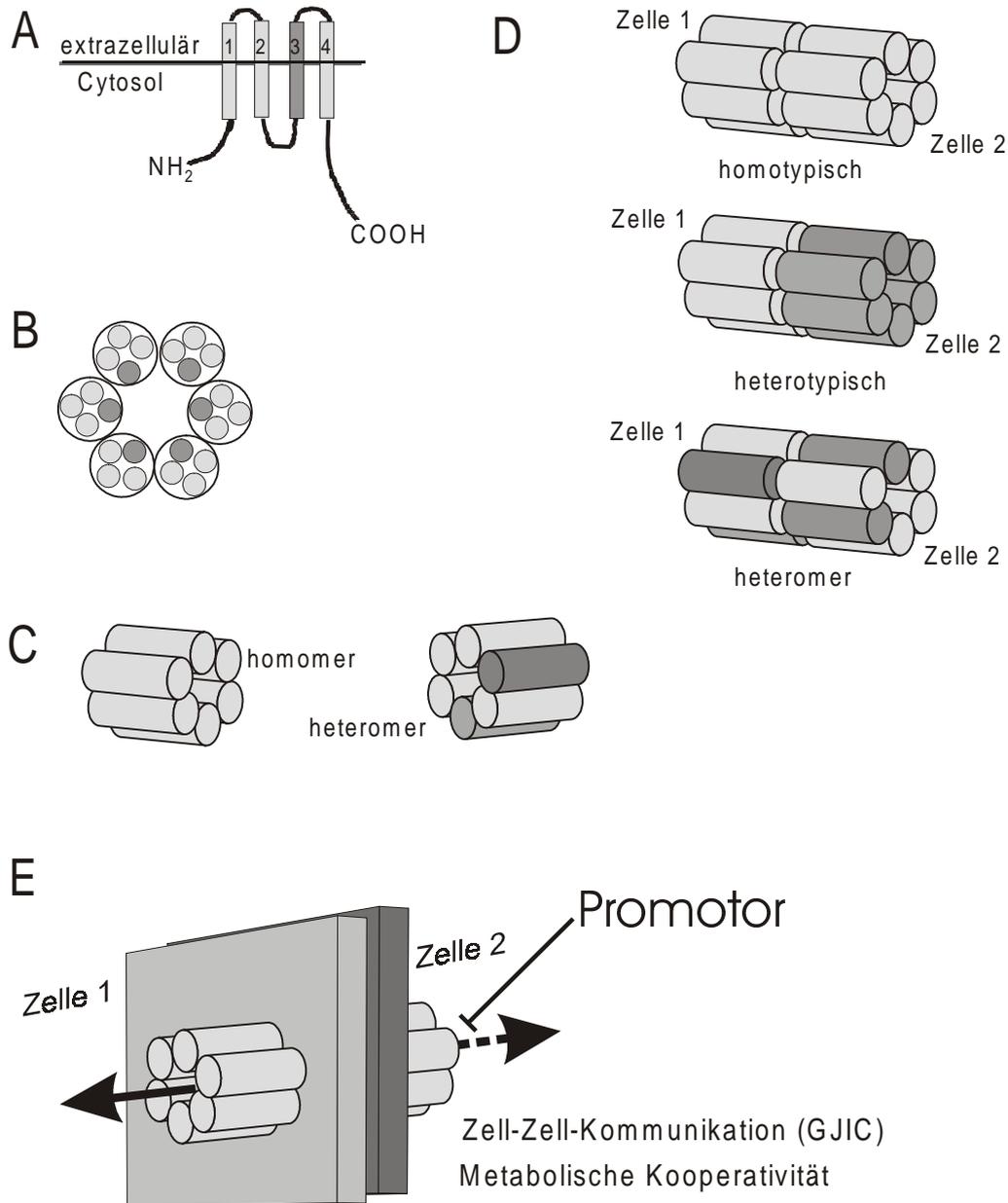
- Elektrophysiologische Kopplung. Insbesondere in elektrisch erregbaren Zellen wie Herzmuskelzellen, glatten Muskelzellen und Neuronen dienen gap junctions als elektrische Synapsen, aber auch andere Zelltypen können mit ihrer Hilfe zu elektrophysiologischen Einheiten verbunden werden (Lowenstein, 1981).
- Gewebsantwort auf Hormone und andere Signale. GJIC kann die Reaktion von Geweben oder Organen auf Stimuli verstärken, indem sie die Ausbreitung sekundärer Botenstoffe aus angeregten in „ruhende“ Nachbarzellen ermöglicht (Lawrence *et al.*, 1987; Murray, 1988; Nelles *et al.*, 1996).
- Regulation der embryonalen Entwicklung. Gap junctions dienen vermutlich als interzelluläre Wege für chemische und/oder elektrische Entwicklungssignale in Embryonen und definieren die Grenzen entwicklungsphysiologischer Einheiten (Kalimi und Lo, 1988).

Um die Rolle der GJIC in der Kanzerogenese und ihre Wechselwirkungen mit Tumorpromotoren besser zu verstehen, ist es hilfreich, sich den Aufbau und die Funktionsweise der Gap junction Kanäle zu verdeutlichen.

#### **1.4. Struktur der Gap Junctions**

*Gap junctions* bestehen im wesentlichen aus einer lokalen Anhäufung von Membrankanälen, welche einen ununterbrochenen Übergang vom Cytoplasma einer Zelle zum Cytoplasma der Nachbarzelle bereitstellen (zu diesen und den folgenden Ausführungen siehe Abbildung 1-2). Jeder *Gap junction* Kanal besteht aus zwei Halbkanälen, Connexone genannt, und jedes Connexon aus 6 Proteinen, den Connexinen (Cx). Jede der benachbarten Zellen stellt für den Kanal jeweils das Connexon bereit, das in ihrer Zellmembran eingelagert ist. Der funktionsfähige Kanal resultiert aus dem Zusammenschluss der beiden Halbkanäle im Interzellularraum. Aus der Existenz verschiedener Connexine als Grundbausteine dieser Strukturen und dem häufigen Vorkommen mehrere Connexine in einem Zelltyp (z.B. Cx32 und Cx26 in adulten Hepatozyten) ergeben sich vielfältige Kombinationsmöglichkeiten. Man unterscheidet homomere Connexone, d.h. solche, die nur aus Connexinen einer Sorte bestehen von heteromeren Connexonen, die zwei (oder mehr) verschiedenartige Connexine enthalten. Auf der Stufe der Kanäle lässt sich zwischen homotypischen Kanälen aus zwei baugleichen Connexonen und heterotypischen differenzieren, die aus der Vereinigung zweier unterschiedlicher, aber jeweils homomere Connexone entstehen. Als dritte Variante gibt es die Kombination zweier heteromere Connexone zu einem Kanal, der dann als heteromere Kanal bezeichnet wird.

## Einleitung



**Abbildung 1-2: Connexin, Connexon und GJIC – Skizzen und Begriffsbestimmungen.**  
 A) Schematische Darstellung der Struktur eines Connexinmoleküls mit 4 Transmembrandomänen und 3 Schlaufen. Die 3. Transmembrandomäne, deren hydrophile Aminosäurereste den Kanal im Connexon auskleiden, ist dunkler gefärbt. B) Aufsicht (schematisch) auf ein Connexon, gebildet aus 6 Connexinen (große Kreise) mit jeweils 4 Transmembrandomänen (kleine Kreise); die 3. Transmembrandomäne dunkler gehalten. C) Seitenansicht eines Connexons aus 6 Connexinen (Eine Säule entspricht einem Connexin, jeder Grauton einem Connexintyp). D) Zusammensetzung und Benennung von Kanälen aus verschiedenen Connexinen und Connexonen. E) Stoffaustausch zwischen benachbarten Zellen als Mechanismus der GJIC und Hemmung desselben durch Tumopromotoren. (A und B verändert nach Trosko und Ruch, 1998; C und D verändert nach White und Paul, 1999)

Inwieweit diese Möglichkeiten in der Natur realisiert werden, ist noch nicht vollständig geklärt, aber es gibt Hinweise aus *in vivo* und *in vitro* Versuchen, dass auf diese Weise

Kanäle mit unterschiedlichen Eigenschaften erzeugt werden können (Jiang und Goodenough, 1996; König und Zampighi, 1995; Perkins *et al.*, 1997; Nicholson *et al.*, 1987; Traub *et al.*, 1989; White 1995).

Abhängig von ihrem Aufbau haben die gap junction Kanäle einen Durchmesser von ca. 1,5-2 nm und sind für kleine Moleküle (< 2 kDa) durchlässig. Zu ihnen gehören Ionen, Wasser, Zucker, Nucleotide, Aminosäuren, Fettsäuren, kleine Peptide, niedermolekulare Medikamente und Karzinogene, jedoch keine Proteine, komplexe Lipide, Polysaccharide, RNA und andere voluminöse Moleküle. Der als GJIC bekannte Austausch ist ATP-unabhängig und beruht vermutlich auf passiver Diffusion (Loewenstein, 1981). Für die koppelnden Zellen bedeutet dies, dass sie nicht länger unabhängige Einheiten darstellen, sondern ein integriertes nachbarschaftliches Netzwerk bilden, in dem Grundstoffe und Signale ausgetauscht werden.

### **1.5. Die Connexin-Genfamilie**

Bei den Vertebraten werden die Proteine, welche die interzellulären Kanäle bilden, von einer Multigenfamilie, Connexine genannt, codiert (Bruzzone, *et al.*, 1996; Goodenough, *et al.*, 1996). Derzeit sind aus der Maus 14 Connexingene kloniert und 6 weitere aus anderen Vertebraten, für die man keine Mausorthologe kennt (O'Brien, *et al.*, 1996; O'Brien, *et al.*, 1998; Itahana, *et al.*, 1998; Yoshizaki, und Patino, 1995).

Die Connexine werden zell-, gewebe- und entwicklungsspezifisch exprimiert. In der adulten Leber sind dies hauptsächlich Cx32 und Cx26, die von den parenchymalen Leberzellen, den Hepatozyten, gebildet werden. Daneben findet sich, in den nicht-parenchymalen Leberzellen, wie Fettspeicherzellen (Itozellen) und dem hepatischen Bindegewebe, Cx43 (Paul, 1986; Kumar und Gilula, 1986; Zhang und Nicholson, 1989; Stutenkemper *et al.*, 1992; Spray *et al.*, 1991; Rojkind *et al.*, 1995).

Die Connexine zeigen eine einheitliche Grundstruktur mit 4 Transmembrandomänen und einem cytoplasmatischen Amino- und Carboxyterminus. Die dritte membrandurchspannende Region ist reich an hydrophilen Aminosäureresten und kleidet bei der Assoziation der Connexine zu einem Connexon die Innenseite des Kanals aus. Der C-Terminus weist die größte Variabilität unter den verschiedenen Domänen auf, wohingegen die Transmembrandomänen und die exoplasmatischen Schleifen stärker konserviert sind. Von einigen Connexinen ist bekannt, dass sie am C-Terminus phosphoryliert werden können (Trosko und Ruch, 1998).

## Einleitung

Obwohl weitgehend eine Benennung der Connexine nach der vorhergesagten relativen Molekülmasse üblich ist (Beyer *et al.*, 1989), wird von manchen Autoren eine Einteilung in zwei Klassen ( $\alpha$  und  $\beta$ ) vorgezogen (Risek *et al.*, 1990; Gimlich *et al.*, 1988). Sie bezieht sich auf Sequenzähnlichkeiten; das Fehlen spezifischer Proteindomänen erschwert jedoch eine verlässliche Abgrenzung der Gruppen.

Bisher ging man für beide Gruppen von einer relativ einfachen Genstruktur aus, bestehend aus zwei durch ein langes Intron (6-8 Kilobasenpaare) separierte Exons (White *et al.*, 1995). Das erste Exon ist kurz (um die 100 Basenpaare) und enthält keine proteincodierende Informationen. Diese befinden sich komplett zweiten Exon. Die Promotorsequenzen sind *upstream* von Exon 1 lokalisiert. In jüngerer Zeit analysierte Connexine passen teilweise nicht in das Schema. Das Nagerconnexin36, Rochenconnexin35 und Flussbarschconnexin34,7 schließen ein Intron im codierenden Bereich ein und passen anhand der Primärsequenz weder in die  $\alpha$ - noch in die  $\beta$ -Gruppe (O'Brien *et al.* 1996 und 1998; Condorelli *et al.*, 1998).

Auch für das Cx32-Gen der Ratte sind Abweichungen vom Aufbauschema gefunden worden. Es besitzt zwei weitere Promotorsequenzen, welche nur in neuronalen Geweben aktiv sind, aber nicht in der Leber. Diese Promotoren befinden sich weiter proximal zum Exon 2 und führen zu mRNS-Molekülen, welche die nichtkodierenden, alternativen Exons 1A oder 1B und Exon2 umfassen. Im Gegensatz zu anderen Connexingenen wird die Expression von Cx32 also von drei Promotoren kontrolliert, die gewebespezifisch arbeiten (Neuhaus *et al.*, 1995; Sohl *et al.*, 1996). Die im Lebergewebe der Ratte- und Maus-Cx32 aktiven Promotorbereiche liegen *upstream* von Exon 1 und enthalten keine *Konsensus*-TATA-Box-Sequenz. Stattdessen scheinen einige GC-reiche Sequenzabschnitte nahe der Transkriptionsstartstelle den Transkriptionsfaktor Sp1 zu binden und die Cx32-Transkription positiv zu regulieren. Ein neues 25bp-Element in dieser Region gilt als notwendig für die Connexintranskription und Konsensussequenzen für den *hepatic nuclear factor-1* und *nuclear factor-1* wurden hier ebenfalls identifiziert. In diesem Promotor weiter *upstream* gelegene DNase-I-hypersensitive Bereiche dienen hingegen vermutlich dem Abschalten des Gens in Zellen, die kein Cx32 exprimieren (Hennemann *et al.*, 1992; Bai *et al.*, 1993; Bai *et al.*, 1995).

Trotz der konservierten Sequenzen innerhalb der Connexine beruht die Vielfältigkeit dieser Proteine nicht auf einem alternativen Splicemechanismus, sondern es scheint für jedes Connexin ein eigenes Gen zu existieren. Die bisher lokalisierten Geneloci befinden sich auf verschiedene Chromosomen und scheinen einer zufälligen Verteilung zu folgen. Das Cx32-Gen zeichnet sich dabei durch seine X-chromosomale Lokalisation aus, es ist also nicht auf einem autosomalen, sondern einem Geschlechts-Chromosom gespeichert.

In weiblichen Säugern (X/X) wird eines der beiden X-Chromosomen während der frühen Embryonalentwicklung inaktiviert, um die gleiche Gendosis wie in Männchen (Y/X) zu gewährleisten. Es wird angenommen, dass beide X-Chromosomen die gleiche Wahrscheinlichkeit haben, inaktiviert zu werden und dass die einmal erfolgte Inaktivierungspräferenz an die Tochterzellen weitergegeben wird. Für X-chromosomal codierte Gene bedeutet dies, dass es in Geweben zur mosaikartigen Expression von Genen entweder des einen oder des anderen X-Chromosoms kommt (Knippers, 1997).

Mit der Beschreibung und Charakterisierung immer neuer Connexine hat auch die Zahl der Erkrankungen zugenommen, welche sich auf Mutationen in Connexinen zurückführen lassen. Das älteste bekannte Beispiel ist die X-chromosomale Form des Charcot-Marie-Tooth Syndroms (CMTX). Beim CMT handelt es sich um eine genetisch heterogene Gruppe von Neuropathien, die zu einer progressiven Degeneration der peripheren Nerven führen und u.a. durch Muskelschwäche und -atrophie sowie Erlöschen der Sehnenreflexe und Parästhesien charakterisiert sind. Bei den meisten Formen handelt es sich um Myelinisierungsstörungen mit Hypertrophie der Schwannschen Scheiden. Für die X-chromosomal vererbte Form konnte ein Zusammenhang mit Mutationen im Cx32-Gen gezeigt werden. Zur Zeit werden 90 verschiedene Mutationen mit dem CMT in Verbindung gebracht, die zumeist in der codierenden Sequenz liegen, sich aber nicht in einer bestimmten Sequenzdomäne häufen (White and Paul, 1996; zur Übersicht s. Bruzone et al., 1996).

### **1.6. Rolle der GJIC im Kanzerogeneseprozess**

Zahlreiche Arbeiten belegen, dass die Hemmung oder Aufhebung der GJIC für die Entstehung bzw. das Wachstum von Tumoren bedeutsam ist, wobei Connexine im Prinzip in die Reihe der Tumorsuppressorproteine einzuordnen sind. Als wesentliche Befunde seien genannt:

- Zahlreiche Stoffe mit tumorpromovierender Aktivität führen *in vitro* und *in vivo* zu einer Verminderung der GJIC. Hierzu gehören u.a. Phorbolester, Phenobarbital, polyhalogenierte Biphenyle sowie bestimmte Insektizide wie z.B. Endosulfan, Chlordan oder DDT (zur Übersicht s. Swierenga und Yamasaki, 1992).
- Umgekehrt können Stoffe wie z.B. Retinoide und Glucocorticoide, die in der Lage sind, GJIC positiv zu regulieren, den Kanzerogeneseprozess hemmen (Budunova und Williams, 1994).

## Einleitung

- Connexine sind häufig in Tumorzellen vermindert exprimiert (s. z.B. Janssen-Timmen *et al.*, 1986; Neveu *et al.*, 1994; Krutovskikh *et al.*, 1991; Bager *et al.*, 1994) oder intrazellulär aberrant lokalisiert (Krutovskikh *et al.*, 1994).
- Die Wiedereinführung der Gene in Connexin-defiziente tumorigene Zellen kann zur Unterdrückung des transformierten Phänotyps führen, was auf die tumorsupprimierende Aktivität der Connexine zurückgeführt werden kann (zur Übersicht s. Yamasaki und Naus, 1996).
- Umgekehrt können aktivierte Onkogene, wie z.B. Ras, GJIC unterdrücken und so zur malignen Transformation von Zellen beitragen (de Feijter *et al.*, 1992; zur Übersicht s. Trosko *et al.*, 1995).
- Cx32-Null-Mäuse zeigen im Vergleich zu den entsprechenden Wildtyp-Mäusen eine deutlich erhöhte Tumorantwort in der Leber, dem Organ, in welchem Cx32 (neben Cx26) an der Ausbildung der gap junctions beteiligt ist (Temme *et al.*, 1997; Moennikes *et al.*, 1999).

Viele Tumorzellen weisen eine verringerte GJIC auf (zur Übersicht s. Yamasaki und Naus, 1996), allerdings haben *in vitro* Studien gezeigt, daß keine 100%ige Korrelation zwischen Tumorigenität und der verringerten Fähigkeit zur GJIC besteht (Loewenstein, 1979). Bei der Entstehung von Tumoren in soliden Organen muss deshalb auch der Einfluss des Normalgewebes mit in Betracht gezogen werden, wobei zwischen homologer und heterologer GJIC unterschieden wird: Selbst wenn (prä)neoplastisch veränderte Zellen über homologe GJIC in der Lage sind, untereinander Signale auszutauschen, kann der Verlust der heterologen GJIC zwischen den transformierten Zellen und den umliegenden Normalzellen zu einer Störung der Wachstumskontrolle führen (zur Übersicht s. Yamasaki und Naus, 1996). Belege für diese Hypothese kommen aus Untersuchungen an Zelllinien: So konnte der transformierte Phänotyp von Zellen reversibel aufgehoben werden, indem in Co-Kulturen mit nicht-transformierten Zellen heterologe GJIC hergestellt wurde; nach Blockade der heterologen Kommunikation unter Beibehaltung homologer GJIC der transformierten Zellen untereinander war dagegen keine Reversion des Phänotyps zu beobachten (zur Übersicht s. Yamasaki und Naus, 1996). Eine Verminderung der heterologen GJIC wurde auch bei Co-Kultivierung primärer normaler und präneoplastisch veränderter Hepatozyten der Ratte beobachtet. Auch *in vivo* konnten vergleichbare Befunde erhoben werden: GST-P-positive, vermutlich präneoplastisch veränderte Hepatozyten in Leberfoci der Ratte waren zur homologen GJIC untereinander, nicht jedoch zur heterologen GJIC mit den umliegenden Normalzellen befähigt (Kru-

tovsikh et al., 1991). Entsprechende Untersuchungen mit anderen Spezies liegen bislang nicht vor.

Aufgrund ihrer Rolle als Tumorsuppressorgene sollten Connexin-Gene nach klassischer Vorstellung in Tumorzellen häufig in ihrer Funktion eliminiert sein. Inaktivierung durch Mutationsereignisse (Typ-I-Tumorsuppressorgene) oder tumorspezifische Erniedrigung in der Expression (Typ-II-Tumorsuppressorgene) wären demnach zu erwarten. Deletionen, Punktmutationen oder andere genetische Aberrationen wurden in den bisher untersuchten Tumoren nur selten beobachtet, während Hepatome des Menschen und der Ratte häufig erniedrigte oder aberrante Expression zeigten (zur Übersicht hierzu s. Yamasaki und Naus, 1996, sowie darin enthaltene Zitate).

Auch in Normalgeweben kommt es unter mitogenen Reizen, so z.B. nach Verwundung, regenerativer Hyperplasie, zytotoxischer Behandlung oder nach partieller Hepatektomie zu einer Verminderung der an der *gap junction*-Bildung beteiligten Proteine und damit einhergehend zu einer Verminderung der GJIC (Traub et al., 1983). Die negative Regulation von Connexinen ist demnach möglicherweise eine generelle Voraussetzung für proliferative Vorgänge oder kann eventuell selbst Proliferation induzieren. Für letztere Annahme spricht die Beobachtung, dass Hepatozyten in der Leber von Cx32-Null Mäusen eine etwa 4 bis 12-fach gesteigerte Zellteilungsrate aufweisen (Temme et al., 1997).

### **1.7. Aufgabenstellung**

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Rolle von Cx32 bei der chemisch-induzierten Hepatokanzerogenese im Mäusemodell zu untersuchen. Dazu sollten drei tierexperimentelle Studien mit verschiedenen Fragestellungen durchgeführt werden.

- Im Experiment I sollte der Einfluss des Cx32-Gendefektes vor unterschiedlichen genetischen Hintergründen analysiert werden. Durch Kanzerogene wie DEN werden Leberläsionen in den empfindlichen C3H-Mäusen und den resistenten C57BL-Mäusen in etwa gleichem Umfang induziert, weisen aber unterschiedliche Wachstumseigenschaften auf (Drinkwater, 1994; Dragani, 1994) Dazu war der Cx32-Gendefekt in Mäuse mit hoher (C3H) - bzw. niedriger (C57BL) Hepatokanzerogenese-Suszeptibilität einzukreuzen. Anschließend sollte der Kanzerogeneseprozess in einem Initiationsexperiment in den männlichen F1-Hybriden (jeweils Cx32<sup>Y/-</sup> bzw. Cx32<sup>Y/+</sup>) vergleichend untersucht werden.
- Für das zweite Experiment sollten Mäuse mit Cx32-Mosaizismus generiert werden, um in ein und demselben Tier die Bedeutung des Cx32-Proteins bei der

Hepatokanzerogenese zu analysieren. Dazu sollte die X-chromosomale Lokalisation des Cx32-Gens genutzt werden, die dazu führt, dass in jeder Zelle nur jeweils eines der beiden Cx32-Allele aktiv ist (X-chromosomale Inaktivierung ab der frühen Embryonalentwicklung (Knippers, 1997)). Da diese Inaktivierung bei der Zellteilung an die Tochterzellen weitergegeben wird, war in weiblichen Mäusen mit einem Cx32-Wildtyp-Allel und einem Cx32-Null-Allel (Cx32<sup>+/-</sup>) mit einem mosaikartigem Auftreten von phänotypisch Cx32-exprimierenden Hepatozyten und Cx32-defizienten Hepatozyten zu rechnen. Die Entwicklung dieser beiden Populationen und der Ablauf der Kanzerogenese in der „Mosaikleber“, sollten in diesem Initiationsexperiment untersucht werden.

- Ziel der dritten tierexperimentellen Studie war, in Initiations-Promotions-Experimenten den Einfluss von Cx32 während der Promotionsphase der Hepatokanzerogenese näher zu charakterisieren.
  - Wie die meisten, wenn auch nicht alle Tumopromotoren, inhibiert Phenobarbital (PB) die über *gap junctions* vermittelte interzelluläre Kommunikation. Ausgehend von der Hypothese, dass die tumorpromovierende Wirkung dieses Stoffes auf der Unterdrückung von *GJIC* beruht, sollte diese Wirkung in Cx32-Null-Mäusen, bei denen die *GJIC* zwischen den Hepatozyten stark vermindert ist, nahezu nicht vorhanden sein. Diese These sollte im Experiment IIIa mit einem Initiations-Promotions-Design geprüft werden, in dem die Initiation in ausgewachsene Tieren erfolgte.
  - PB wirkt in der Leber der Maus nicht zwingend promovierend. Es ist bekannt, dass es die Tumorbildung inhibiert, wenn es chronisch Mäusen verabreicht wird, die neonatal mit DEN behandelt wurden (Lee *et al.*, 1998) im Gegensatz zu Ergebnissen mit Tieren, die im adulten Alter mit DEN behandelt wurden (Lee *et al.*, 1998; Pereira *et al.*, 1986; Diwan *et al.*, 1984). Versuch IIIb als Initiations-Promotions-Experiment mit neonatal initiierten Mäusen sollte Auskunft darüber geben, inwieweit dieser inverse oder „paradoxe“ Effekt vom Cx32-Protein beeinflusst wird.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Chemikalien

Acrylamid (wäßrige 30%ige Stammlösung)	Roth, Karlsruhe
Agarose (Seakem®)	Biozym, Oldendorf
Agarose	Gibco/BRL, Eggenstein
AG 501 X8 Resin	BioRad, München
3-Amino-9-ethylcarbazol	Sigma, Steinheim
3-Aminopropyltriethoxysilan	Fluka, Buchs, Schweiz
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Gibco/BRL, Eggenstein
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
3,3´-Diaminobenzidin (DAB)	Aldrich, Steinheim
N-Nitrosodiethylamin (Diethylnitrosamin; DEN)	Serva, Heidelberg
Dimethyldichlorsilan (2%ig in 1,1,1-Trichlorethan)	BDH Limited, Poole, Großbritannien
Dodecylsulfat, Natrium-Salz (SDS)	Serva, Heidelberg
Entellan®	Merck, Darmstadt
Eosin G (gelblich)	Merck, Darmstadt
Ethylendiamintetraacetat (EDTA-Na <sub>2</sub> )	Serva, Heidelberg
Ethidiumbromid	Serva, Heidelberg
Eukitt®	Kindler, Freiburg
Histowax®	Reichert-Jung, Nußloch
Hämatoxilin	Merck, Darmstadt
4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethan-sulfonsäure (HEPES)	Boehringer, Mannheim
3-(N-Morpholino)-propan-sulfonsäure (MOPS)	Sigma, Deisenhofen
Nonidet P-40 (NP-40)	Sigma, Deisenhofen
Nukleotide und Desoxynukleotide (100 mM)	Boehringer, Mannheim
Rinderserumalbumin (BSA)	Serva, Heidelberg
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Serva, Heidelberg
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Serva, Heidelberg
Tween 20	Serva, Heidelberg
Triton X-100	Serva, Heidelberg
Wasserstoffperoxid (30 %ige Lösung)	Aldrich, Steinheim

## 2.2. Reagenziensets (Kits)

Alle **Enzyme** (z.B. Restriktionsendonukleasen, inklusive Reaktionspuffer) wurden von der Firma Boehringer (Mannheim) bezogen, mit Ausnahme der *Taq*-Polymerase. Sie stammte, wie die übrigen Bestandteile der PCR-Lösung, von der Firma MBI (MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) oder Eurogentec (Seraing; Belgien). Die **Primer** für die PCR-Reaktionen wurden von den Firmen Interactiva (Ulm) oder MWG Biotech AG (Ebersberg) synthetisiert. Alle hier nicht aufgeführten Chemikalien sind im Text erwähnt oder stammten von der Firma Merck (Darmstadt).

## 2.3. Laborgeräte

Auswerteeinrichtung (Histologie)

Projektionsmikroskop mit Schrittmotortisch	Leitz, Wetzlar
Integrationstablett KS 400	Kontron, München
PC Vectra	Hewlett Packard
Auswertungsprogramm MOSYS	DKFZ, Heidelberg
DNA-Polyacrylamidgelelektrophoresekammer	EMBL, Heidelberg
DNA-Agarosegelelektrophoresekammer	E-Pharmacia, Uppsala, Schweden
Geldokumentation	Raytest, Straubenhardt
Kryostatmikrotom Frigocut 2800	Reichert-Jung, Nußloch
Mikrodismembrator Typ II	Braun, Melsungen
Mikroskopkamera CF 20 DXC air	Kappa Messtechnik GmbH, Gleichen
Netzgeräte	
GPS 200/	Pharmacia, Uppsala, Schweden
EPS 500/400400	Pharmacia, Uppsala, Schweden
PS 3003	Gibco/BRL, Heidelberg
Schlittenmikrotom Hn 40	Reichert-Jung, Nußloch
Spektralphotometer UV 160 A	Shimadzu, Düsseldorf
Thermocycler	
Personal Cycler	Biometra, Göttingen
Uno Thermoblock	Biometra, Göttingen
Ultrazentrifuge L7-65-ZU mit	
Rotor Ti 50	Beckmann, München
Vakuum-Konzentrator	BA-VC-300; Bachofer, Reutlingen
Vortex Genie 2	Bender und Hobein, Zürich, Schweiz

Waagen	
A 120 S	Sartorius, Göttingen
BA 2100 S	Sartorius, Göttingen
Zentrifugen	
Biofuge 13	Heraeus, Hanau
Centrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg

#### **2.4. Sonstiges**

Aluminiumfolie	Melitta, Minden
Ampullen mit Rollrand (10 ml; 20 mm Hals) mit Head-Space Kappen und Butylgummi	Multimed Wicker GmbH
Bördelzange	Multimed Wicker GmbH
Betäubungsbox	Umgebaute Pipettenspitzenbox, 10,5 x 13 x 8,5 cm (B x L x H); der ehemalige Boden dient, mit zwei Scharnieren und einem Griff versehen, als durchsichtiger Deckel; die Spitzen- halterung als Trennboden zwischen Tierraum und Betäubungs- mittelreservoir
»Blue caps«:	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Proben- und Zentrifugenröhrchen 50 ml und 15 ml	
Färbegefäße aus Glas und Zubehör	Schott, Mainz
Kasten nach Hellendahl mit Erweiterung	
Trog nach Coplin	
Färbegestell aus Glas	
Glaskasten mit Deckel für Färbegestell	
Drahtbügel für Färbegestell	
Filterpapier	3 MM; Whatman, Großbritannien
feuchte Kammer	Multimed Wicker GmbH
Kanülen Pravaz Nr.20; 0,40x21 mm	Rose GmbH, Trier
27Gx7/8` Luer/NSP	
Nitrocellulosefilter	Schleicher und Schüll, Dassel

## Material und Methoden

Reaktionsgefäße	Biozym Diagnostik GmbH, Hess. Oidendorf
2 ml, 1,5 ml und 0,6 ml	
Spritzen, 2 ml Discardit II; Luer 6 %	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Tätowierzange	Hauptner, Solingen
Tätowierfarbe	Hauptner, Solingen
Tierkäfige, Macrolon Typ3, -deckel und Trinkflaschen	Tecniplast Deutschland GmbH, Neumarkt-Sankt Veit
Tritix II Halbmaske mit Filter EN141 A1	Auergesellschaft GmbH, Berlin

## 2.5. Lösungen und Puffer

### 2.5.1. Histologie

#### Acetatpuffer, 0,1 M, pH 5,2

Eisessig 1,208 ml

Natriumacetat 10,7519 g

Eisessig in 210 ml Aqua bidest. mit Natriumacetat, gelöst in 790 ml Aqua bidest., vereinigen.

#### AEC-Färbelösung

3-Amino-9-ethylcarbazol 1,25 mM 4 mg

N,N'-Dimethylformamid 6,7 % (v/v) 1 ml

Acetatpuffer 0,1 M 14 ml

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%ige Lösung) 15 µl

3-Amino-9-ethylcarbazol in N,N'-Dimethylformamid lösen, Acetatpuffer zufügen und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zugeben.

#### Borsäure/Borat-Puffer (pH 7,6)

H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 170 mM 10,51 g

Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> x 10 H<sub>2</sub>O 7,5 mM 2,86 g

ad 1l Aqua bidest.

#### Carnoy-Lösung

absolutes Ethanol 6 Volumenteile

Chloroform 3 Volumenteile

Eisessig 1 Volumenteil

Frisch ansetzen.

Citratpuffer, 0,1 M Stammlösung, pH6

<i>tri</i> -Natriumcitrat-Dihydrat		29,41 g
------------------------------------	--	---------

*tri*-Natriumcitrat-Dihydrat in 800 ml Aqua bidest. lösen, pH mit Citronensäure einstellen und mit Aqua bidest. auf 1 l auffüllen. Vor Gebrauch 1:10 verdünnen.

DAB-Lösung

3,3'-Diaminobenzidin	0,05 % (w/v)	5 mg
----------------------	--------------	------

Tris (mit HCl auf pH 7,6 eingestellt)	50 mM	10 ml
---------------------------------------	-------	-------

H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (30%ige Lösung)	0,5 % (v/v)	50 µl
---	-------------	-------

DAB im Puffer lösen, im Eisbad kühl halten und kurz vor Gebrauch 2 Tropfen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zugeben. Cave: DAB ist potentiell kanzerogen!

Eosin-Lösung I

Eosin G	0,25 % (w/v)	0,63 g
---------	--------------	--------

Eosin in 250 ml Aqua bidest. lösen, mit einem Tropfen Eisessig versetzen; 1:10 verdünnen und durch Faltenfilter reinigen.

Eosin-Lösung II (alkoholisch)

Eosin G	0,4 % (w/v)	1 g
---------	-------------	-----

60%iges Ethanol	250 ml	
-----------------	--------	--

Eosin im 60%igen Ethanol lösen und durch Faltenfilter reinigen.

Formalin-Lösung

Formalin	4 % (v/v)	10 g
----------	-----------	------

PBS	250 ml	
-----	--------	--

Formalin im PBS lösen.

Glutaraldehydlösung

Glutaraldehyd (25%ig in Wasser)	5% (v/v)	50 ml
---------------------------------	----------	-------

Eisessig	5% (v/v)	12,5 ml
----------	----------	---------

mit Aqua bidest. auf 250 ml auffüllen

Inkubationslösung (G-6-Pase)

Tris-Maleat-Puffer, pH 6,5		70 ml
----------------------------	--	-------

Aqua bidest.		70 ml
--------------	--	-------

2%ige Bleinitratlsg.		10 ml
----------------------	--	-------

tropfenweise zugeben, fällt sonst aus

D-Glukose-6-phosphat, Mono-Na-Salz		75 mg
------------------------------------	--	-------

## Material und Methoden

### Mayer´s Hämalaun

Hämatoxilin	0,1 % (w/v)	1 g
Natriumjodat	0,02 % (w/v)	1,2 g
Aluminium-Kalium-Sulfat	5 % (w/v)	50 g
bei Raumtemperatur unter Rühren vollständig lösen		
Chloralhydrat	5 % (w/v)	50 g
Zitronensäure	0,1 % (w/v)	1 g
in 1 l Aqua bidest. lösen und vor Gebrauch filtrieren		

### NBT / BCIP-Färbelösung

Pufferlösung:

Tris-Puffer, pH 9,5	0,1 M	
MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	0,05 M	2,54 g
NaCl	0,1 M	1,46 g

diese Pufferlsg. ist bei Raumtemperatur haltbar; Mengenangaben für 250 ml Lösung

NBT/BCIP-Stammlösung: (von Boehringer Mannheim)

Nitroblautetrazoliumchlorid	18,75 mg / ml
5-Brom-4-chlor-3-indoloyl-phosphar, Toluidin-Salz	9,4 mg / ml

In 67 % DMSO (v / v)

Färbelösung erst unmittelbar vor den Einsatz aus Puffer und Stammlösung herstellen:  
200µl Stammlösung zu 10 ml Pufferlösung geben

### PBS (*phosphat buffered saline*; pH 7,4)

Natriumhydrogenphosphat (x 2 H <sub>2</sub> O)	0,7654 % (w/v)
Kaliumdihydrogenphosphat	0,0953 % (w/v)
Natriumchlorid	0,8766 % (w/v)

(d.h. 50 mM Phosphatpuffer und 150 mM NaCl)

### PBS/S

PBS supplementiert mit:

Natriumchlorid	2,03 g / 100 ml
BSA	1 g / 100 ml

(d.h. 500 mM NaCl und 1 % (w/v) BSA)

das BSA einsinken lassen, nicht rühren, da es sonst schäumt und klumpt

TB-Puffer 0,05 M, pH 8,7

Tris Base	6,0 g
MgCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O	406 mg

in ca. 800 ml Aqua bidest. lösen; pH 8,7 mit 1M HCl einstellen und auf 1000 ml auffüllen

TBS 0,15 M, pH 7.36

Tris Base	6,0 g
NaCl	5,8 g

in ca. 800 ml Aqua bidest. lösen, pH 7,36 mit konz. HCl einstellen und auf 1 l auffüllen

TBS/S

Tris-Maleat-Puffer 0,2M, pH 6,5

Tris	0,2 M	24,2 g
Maleinsäure	0,2 M	23,2 g

Mengenangaben für 1l Pufferlsg.

### 2.5.2. Molekularbiologie

DNA-Ladepuffer (10 x)

Bromphenolblau	0,25 % (w/v)
Xylencyanol	0,25 % (w/v)
Ficoll 400	15 % (w/v)

bei 4° C lagerbar

GNT-Puffer (für Proteinase K-Verdau)

Kaliumchlorid	50 mM	186,4 mg
Magnesiumdichlorid-Hexahydrat	1,5 mM	15,2 mg
Tris-HCl, pH 8,5	10 mM	
Tween ® 20	0,45 % (v/v)	225 µl
Nonidet ® P-40	0,45 % (v/v)	225 µl

Mengenangaben für 50 ml Pufferlsg.

Proteinase K-Lösung

Proteinase K	20 mg / ml
--------------	------------

Für Gewebeerddau dem GNT-Puffer zufügen, Endkonzentration 100 µg/ml

## Material und Methoden

### TE-Puffer (pH 8,0)

Tris	10 mM	1,211 g
EDTA- Na <sub>2</sub>	1 mM	0,372 g

(mit HCl auf pH 8,0 einstellen)  
Mengenangaben für 1l Pufferlsg.

### TBE-Puffer (pH 8,0)

Tris	90 mM	10,903 g
Borsäure	110 mM	6,801 g
EDTA- Na <sub>2</sub>	2,5 mM	0,931 g

Mengenangaben für 1l Pufferlsg.

### 2.5.3. Proteinbestimmung (Biuret-KCN)

#### Biuret

CuSO <sub>4</sub> x 5H <sub>2</sub> O	1,50 g
Na-K-Tartrat	6,0 g

In 500 ml Aqua bidest. lösen  
10 %ige NaOH (w/v) 300 ml

NaOH unter starkem Rühren zugeben, mit Aqua bidest. auf 1 l auffüllen. In einem Kunststoffgefäß langfristig haltbar; bei Bildung eines schwarzen Niederschlags verwerfen

#### KOH

KOH	0,015 N	0,842 g
-----	---------	---------

ad 1 l Aqua bidest.

#### KCN

KCN	6 M	39,06 g
-----	-----	---------

ad 100 ml Aqua bidest.

#### Saccharose

Saccharose	250 mM
------------	--------

Stammlsg (s.u.) 1:2 mit Aqua bidest. verdünnen

## 2.5.4. Enzymologie

Lösungen für die Mikrosomenpräparation**Stammlösungen**

Saccharose	500 mM	171,15 g
ad 1 l Aqua bidest.		
KCl	1 M	74,56 g
ad 1 l Aqua bidest.		
EDTA-Na <sub>2</sub>	100 mM	3,72 g
und 10,0 ml 1 N KOH ad 100 ml Aqua bidest.		

## Perfusionsmedium (physiolog. Kochsalzlsg.)

NaCl	0,09%	9 g
ad 1 l Aqua bidest.		

## Homogenisationsmedium

Saccharose	250 mM	500 ml Stammlsg.
EDTA-Na <sub>2</sub>	1 mM	10 ml Stammlsg.
ad 1 l Aqua bidest.		

## Waschmedium

KCl	150 mM	150 ml Stammlsg.
ad 1 l Aqua bidest.		

## Suspensionsmedium

Saccharose	250 mM	100 ml Stammlsg.
ad 200 ml Aqua bidest.		

Cytochrom b<sub>5</sub> und Cytochrom P-450 Bestimmung

## Tris/Mops-Puffer

Tris/Mops	50 mM	
KCl	150 mM	
MgCl <sub>2</sub>	10 mM	
37° C und pH 7,5		

## Material und Methoden

### Hexobarbital

Hexobarbital	60 mM	15,5 mg
ad 1 ml		

### NADH

NADH	30 mM	2,6 mg
ad 100 $\mu$ l 1 % NaHCO <sub>3</sub>		

## 2.6. Versuchstiere

### 2.6.1. Tierhaltung und Zucht

Mäuse der Stämme C3H/HEJ und C57BL/6J wurden von Charles River Deutschland GmbH (Sulzfeld) erhalten. Connexin32-defiziente Mäuse als Ausgang für die entsprechende Zucht stellte die Arbeitsgruppe von Prof. Willecke, Institut für Genetik, Universität Bonn zu Verfügung. Sie wurden ursprünglich durch gezielte homologe Rekombination generiert und hatten einen C57BL/6J x 129Sv Hintergrund (Nelles, *et al.*, 1996). Die Tiere wurden in Makrolonkäfigen Typ 3 unter einem künstlichen Tag/Nacht-Rhythmus (Hell/Dunkelphase je 12 Stunden) bei 20° C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50 % im Tierstall des Instituts für Toxikologie in Räumen mit S1-Freigabe gehalten. Sie erhielten Futter (Nr. 1429) der Firma Altromin (Lage) und Trinkwasser *ad libitum*.

Die Zucht der Connexin32-defizienten Mäuse erfolgte durch Bruder-Schwester-Verpaarung in Haremshaltung, je ein Bock mit bis zu vier Weibchen. Ausgehend von diesen Tieren wurden durch entsprechende Kreuzungen die Versuchstiere mit den gewünschten Genotypen generiert.

#### *Experiment I*

Heterozygote Cx32<sup>+/-</sup>-Weibchen wurden mit Cx32-Wildtypmännchen der Stämme C57BL/6J oder C3H/He gekreuzt. Die Männchen der F1-Generation segregierten in den Wildtyp-(Cx32<sup>Y/+</sup>) und den *Knockout*-Genotyp (Cx32<sup>Y/-</sup>), welche nach der Genotypisierung als Versuchstiere dienten.

#### *Experiment II*

C3H/He-Wildtypweibchen (Cx32<sup>+/+</sup>) wurden mit Cx32-defizienten Männchen (Cx32<sup>Y/-</sup>) gekreuzt. Die Weibchen der F1-Generation waren bezüglich Connexin32 heterozygot und wurden nach der Genotypisierung als Versuchstiere verwendet.

### Experiment III

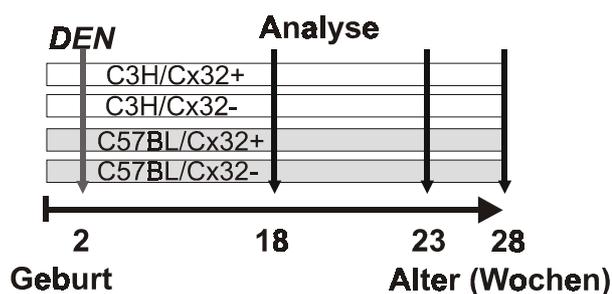
Heterozygote Cx32<sup>+/-</sup>-Weibchen wurden mit Cx32-Wildtypmännchen des C3H/He-Stammes gekreuzt. Die Männchen der F1-Generation segregierten in den Wildtyp (Cx32<sup>Y/+</sup>) und den *Knockout*-Genotyp (Cx32<sup>Y/-</sup>), welche nach der Genotypisierung als Versuchstiere dienten.

#### 2.6.2. Versuchsaufbau und Behandlung

Eine limitierte Zuchtkapazität und nicht genau vorhersagbare Geburtenzahlen machten es notwendig, die Versuchgruppenstärken für die nachfolgend beschriebenen Experimente an die verfügbare Zahl der Tiere anzupassen. Die entsprechenden Angaben zu der verwendeten Anzahl von Tieren sind zusammen mit den zugehörigen statistischen Auswertungen im Ergebnisteil aufgeführt.

##### 2.6.2.1. Experiment I: Genetischer Hintergrund

Männlichen Mäusen aller vier Genotypen (C3H/Cx32<sup>Y/-</sup>, C3H/Cx32<sup>Y/+</sup>, C57BL/Cx32<sup>Y/-</sup>, C57BL/Cx32<sup>Y/+</sup>) wurde zwölf bis vierzehn Tagen nach der Geburt einmalig DEN in einer Dosis von 10 µg je g KG i.p. verabreicht. Gruppen von vier bis zehn Tieren wurden sechzehn, einundzwanzig oder sechsundzwanzig Wochen später getötet, die Lebern entnommen, Körpergewicht, Lebergewicht und makroskopische Veränderungen (z.B. sichtbare Lebertumoren) bestimmt.



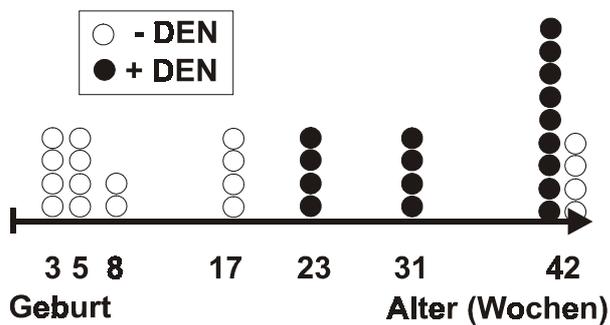
**Abbildung 2-1** Design Experiment I. Jeder Balken repräsentiert eine Versuchsguppe.

Von den Lebern wurden Gefrierschnitte gefertigt, Glucose-6-Phosphatase-Färbungen durchgeführt und diese stereologisch ausgewertet.

##### 2.6.2.2. Experiment II: Mosaik-Expression von Cx32

Weibliche Mäuse, deren Lebern aufgrund der Connexin32-Heterozygotie Moasizismus in der Connexin32-Expression aufwiesen, wurden in zwei Gruppen aufgeteilt. Den Mitglie-

der einer Gruppe wurde im Alter von zwölf bis vierzehn Tagen einmalig DEN in einer Dosis von 10 µg pro g KG i.p. appliziert. Diese Mäuse wurden nach dreiundzwanzig, einunddreißig oder zweiundvierzig Wochen getötet. Tiere aus der unbehandelten Gruppe wurden im Alter von drei, fünf, acht siebzehn bzw. dreiundvierzig Wochen getötet. Die Lebern wurden entnommen und Aliquote Mittels Carnoy bzw. Formalin fixiert sowie durch. Einfrieren auf Trockeneis und anschließende Lagerung bei -80° C konserviert. Größere Tumoren wurden, sofern sie auftraten, isoliert und mit flüssigem Stickstoff schockgefroren. Lebergewicht, Körpergewicht und die Beobachtung makroskopischer Befunde wurden notiert.



**Abbildung 2-2:** *Design Experiment II.*  
Jeder Punkt repräsentiert ein Tier.

Von den Lebern wurden Gefrier- und Paraffinschnitte angefertigt, die als Grundlage für die immun- und enzymhistochemischen Färbungen dienen:

Glukose-6-Phosphatase-Färbung

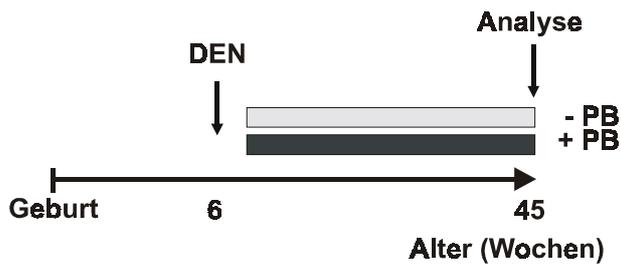
Connexin32-Färbung

c-jun-Färbung

Ki-67/Connexin32-Färbung

### 2.6.2.3. Experiment IIIa: Promotionsversuch

Männlichen Mäusen beider Genotypen (Cx32<sup>Y/-</sup> und Cx32<sup>Y/+</sup>) wurde im Alter von sechs Wochen eine DEN-Dosis von 90 µg je g KG i.p. appliziert. Nach einem dreiwöchigem behandlungsfreien Intervall wurden die Tiere in vier Gruppen aufgeteilt, so dass für jeden Genotyp eine Kontrollgruppe, welche eine Standarddiät (Haltungsdiät für Mäuse, Altromin, Lage) erhielt und eine Behandlungsgruppe, welche PB-haltiges Futter (mit 0,05% (w/w) PB (Sigma, Steinheim) supplementierte Haltungsdiät für Mäuse, hergestellt von Altromin Lage) bekam, resultierten. Die Tiere wurden im Alter von 45 Wochen getötet, die Lebern entnommen, Körpergewicht, Lebergewicht und makroskopische Veränderungen (z.B. sichtbare Lebertumoren) bestimmt.

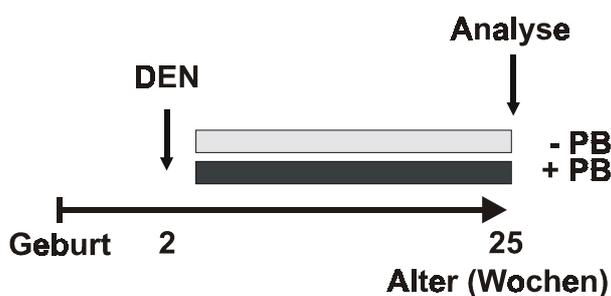


**Abbildung 2-3:** Design Experiment IIIa. Jeder Balken repräsentiert eine Behandlungsgruppe.

Von den Lebern wurden Gefrierschnitte gefertigt, Glucose-6-Phosphatase-Färbungen durchgeführt und diese stereologisch ausgewertet.

#### 2.6.2.4. Phenobarbital IIIb: Inhibitionsversuch

Männlichen Mäusen beider Genotypen ( $Cx32^{Y/-}$  und  $Cx32^{Y/+}$ ) wurde im Alter von zwölf bis vierzehn Tagen eine DEN-Dosis von  $10 \mu\text{g je g KG}$  i.p. appliziert. Nach einem zweiwöchigem behandlungsfreien Intervall wurden die Tiere in vier Gruppen aufgeteilt, so dass für jeden Genotyp eine Kontrollgruppe, welche eine Standarddiät erhielt und eine Behandlungsgruppe, welche PB-haltiges Futter (0,05% (w/w) PB, s.o.) bekam, resultierten. Die Tiere wurden im Alter von 29 Wochen getötet, die Lebern entnommen, Körpergewicht, Lebergewicht und makroskopische Veränderungen (z.B. sichtbare Lebertumoren) bestimmt. Größere Tumoren wurden, sofern sie auftraten, isoliert und mit flüssigem Stickstoff schockgefroren.



**Abbildung 2-4:** Design Experiment IIIb. Jeder Balken repräsentiert eine Behandlungsgruppe.

Von den Lebern wurden Gefrierschnitte gefertigt, Glucose-6-Phosphatase-Färbungen durchgeführt und diese stereologisch ausgewertet.

#### 2.6.2.5. Experiment IIIc: Biochemische Messungen

Männliche Mäuse beider Genotypen ( $Cx32^{Y/-}$  und  $Cx32^{Y/+}$ ) wurden im Alter von 53 Wochen in vier Gruppen aufgeteilt, so dass für jeden Genotyp eine Kontrollgruppe, welche eine Standarddiät erhielt und eine Behandlungsgruppe, welche PB-haltiges Futter

(0,05% (w/w) PB, s.o.) bekam, resultierten. Die Tiere wurden nach vier Wochen getötet, die Lebern entnommen, sowie Körpergewicht und Lebergewicht notiert. Die Lebermikrosomen wurden präpariert und Cytochrom b<sub>5</sub> und Cytochrom P-450 bestimmt.

### **2.7. Methoden**

#### 2.7.1. Kennzeichnung der Tiere und Probenahme für die DNA-Analyse

Die Identifizierung der einzelnen Zucht- oder Versuchstiere erfolgte über ein hierarchisches System. Es gliederte sich in den Zucht- bzw. Versuchsnamen oder ein abgeleitetes Kürzel, gefolgt von der Käfignummer in diesem Vorhaben. Den Schluss bildete ein Abkürzung, welche die Ohrmarkierung des einzelnen Tieres angab. Diese Markierung erfolgte durch Tätowierung oder Lochen der Ohren. Die Mäuse ließen sich durch die Kombination der Daten auf dem Käfigzettel (Zucht-/Versuchsbezeichnung und Käfignummer) und ihre Ohrmarkierung bestimmen und die von ihnen stammenden Gewebe-, Leberproben und Schnitte durch den kompletten Kurznamen eindeutig zuordnen.

So kennzeichnet z.B. die Kombination „**ProK16L**“ ein Tier (und von ihm stammende Proben und daraus gewonnene Daten) aus dem Experiment IIA, welches im Käfig Nr. 16 saß und am linken Ohr markiert war. O, R und LR sind entsprechende Abkürzungen für Tiere ohne Markierung bzw. Kennzeichnungen am rechten oder am linken und rechten Ohr. Aus praktischen Gründen (zum einen zügiges Anbringen, leichte Erkennbarkeit und Haltbarkeit der Kennzeichnung, zum anderen erlaubte Besetzungsdichte der Käfige) wurden maximal 4 zu unterscheidende Mäuse in einem Käfig vereint. Kamen bei der Verpaarung (Haremshaltung, 4 Weibchen und ein Bock) 5 Mäuse zusammen, so ließ sich das Männchen anhand der äußeren Geschlechtsmerkmale erkennen. Ein eindeutige Identifizierung der Jungtiere war erst mit der Genotypisierung notwendig, weshalb Ohrmarkierung und DNA-Probenahme kombiniert wurden. Günstiger Zeitpunkt hierfür war die Trennung der Jungtiere von den Muttertieren, ungefähr ab 3 Wochen nach der Geburt.

Es wurden zwei Methoden angewandt:

- Kennzeichnung durch Ohrtätowierung und Schwanzspitzen als Gewebeprobe oder
- Kennzeichnung durch Lochen der Ohren und Verwendung des separierten Ohrgewebes als Probenmaterial.

**Vorbereitungsliste Ohrmarkierung und Gewebeproben**

<b>Schwanzspitzen</b>	<b>Ohrlochung</b>
Tätowierzange mit Nadeleinsätzen	entfällt
Tätowierfarbe	entfällt
Ethanol, 70%	
Latex-Untersuchungshandschuhe	
Folie	fakultativ
Klebeband	fakultativ
Toilettenpapier (Tierstall)	
Skalpell	Ohrlocher
	schmale Pinzette
Betäubungsbox	
Betäubungsmittel	
LötKolben	entfällt
beschriftete Reaktionsgefäße	
2 ml, <i>Rundboden</i>	0,6 ml
Käfigzettel	
Edding	
Papier und Stift	
Proteinase K-Lsg. 20 mg/ml	
GNT-Puffer	

Die Anzahl der zu behandelnden Tiere wurde ermittelt, eine entsprechende Käfigbelegung geplant und Käfigzettel vorbereitet. Zwei Sätze von Reaktionsgefäßen, einer für die Probenahme im Tierstall und einer für die aufgearbeiteten Proben wurden beschriftet.

Im Tierstall wurde die Arbeitsfläche mit Folie abgeklebt, zwei - drei Blatt Toilettenpapier in die untere Kammer der Betäubungsbox gelegt, mit Betäubungsmittel angefeuchtet und letzterem einige Minuten Zeit gegeben, um das Gas-Flüssigphasengleichgewicht einzustellen. Dann konnten die Mäuse in die Kammer überführt werden, wobei zu beachten war, dass keine Extremitäten eingeklemmt wurden, und der Deckel dicht geschlossen war. Durch den transparenten Deckel konnte beobachtet werden, wie die Tiere das Bewusstsein verloren und, bei leichtem Kippen der Box, die Stellreflexe ausblieben.

Bei der DNA-Schwanzspitzenanalyse wurden die Tiere aus der Box genommen, auf eine Seite gelegt und das Ohr mit der Tätowierzange gelocht, es sei denn, die Maus sollte unmarkiert bleiben. Die Zange wurde so angesetzt, dass die gummierte Auflagebacke unter der Ohraußenseite anlag und die Nadeln das Ohr von der Innenseite her durch-

drangen. Ein wenig der pastösen Tätowierfarbe wurde zwischen Daumen- und Zeigefingerspitze verrieben und dann in das gelochte Ohr einmassiert. Mit einem Einwegskalpell wurde knapp 1 cm der Schwanzspitze abgeschnitten und der Blutfluss mit einer heißen LötKolbenspitze gestillt. Die Gewebeprobe kam in ein beschriftetes Reaktionsgefäß.

Auch bei der Ohrlochmarkierung wurden die Mäuse aus der Box genommen und auf eine Seite gelegt. Aus dem oben liegenden Ohr wurde mit Hilfe des Ohrlochers und einer schmalen Pinzette entweder direkt, oder für die Doppelmarkierung eines Ohres nach Zusammenlegen des Ohres mit zwei Fingern (ähnlich wie bei Papiersternen), eine Stück entfernt. Das so erhaltene Gewebe wurde in ein beschriftetes Reaktionsgefäß überführt.

Die Tiere wurden zum Aufwachen in einen frischen Käfig (ausgerüstet mit einem passend beschrifteten Käfigzettel) gelegt, und nach dem Aufwachen und einer Sichtkontrolle wieder vom Arbeits- in den Tierhaltungsraum gebracht.

Die Gewebeproben wurden einem Proteinase-K-Verdau unterworfen (verändert nach Malumbres *et al.*). Dazu wurden die Schwanzspitzen, je nach Länge mit 200 bis 400 µl GNT-Puffer und entsprechend 1 bis 2 µl Proteinase K-Stammlösung (20 mg/ml; Endkonzentration 100 µg/ml) versetzt, und 2 bis 4 Stunden im Thermomixer unter Schütteln (niedrigste Stufe) bei 56° C inkubiert. 2 ml Rundbodergefäße ermöglichten bei niedrigen Schüttelfrequenzen (cave Scherkräfte und genomische DNA) eine bessere Durchmischung als die konischen 1,5 ml Reaktionsgefäße. Erschien der Verdau noch unbefriedigend, wurde die Inkubation über Nacht fortgesetzt. Die Proteinase wurde durch Erhitzen (95° C, 15 Minuten) inaktiviert, Gewebereste kurz abzentrifugiert (4 Minuten, 13000 rpm, Eppendorf Tischzentrifuge) und der Überstand vorsichtig in frische Reaktionsgefäße überführt. Die Lösung kann gekühlt (4° C oder -20° C) gelagert werden und dient als Probe für die PCR zur Genotypisierung der Mäuse.

Der Verdau von Ohrgebe erfolgte analog, jedoch wurde wegen der geringeren Menge an Probenmaterial das Aufschlussvolumen auf 80 µl erniedrigt und 0,6 ml Reaktionsgefäße verwendet. Die Schüttelfunktion des Thermomixers war bei dem geringen Volumen wirkungslos, daher wurden die Ansätze gelegentlich von Hand gemischt (vorsichtig gegen das Reaktionsgefäß „schnippen“).

### 2.7.2. DNA-Analyse mittels PCR

#### **Theorie**

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) ermöglicht die spezifische Vervielfältigung definierter Genabschnitte durch die zyklische Wiederholung von

drei Reaktionsschritten: Der Hitzedenaturierung des DNA-Doppelstrangs, der Anlagerung der *primer* (*annealing*) und der enzymatischen DNA-Synthese (*extension*). Diese Methode wurde 1985 von Kary Mullis entwickelt und konnte durch die Entdeckung der hitzestabilen Taq-Polymerase aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* enorm verbessert werden (Saiki *et al.*, 1988).

Bei der PCR nimmt die Zahl der amplifizierten DNA-Fragmente am Reaktionsbeginn exponentiell mit der Zykluszahl zu. Nach ungefähr 17 Zyklen weicht jedoch die experimentell ermittelte Wachstumskurve von der theoretischen Wachstumskurve ab und erreicht nach etwa 35 Zyklen ein Plateau. In dieser Arbeit wurde die PCR eingesetzt, um spezifisch diejenigen DNA-Abschnitte zu amplifizieren, in denen sich Connexin32 Knock-Out-Mäuse von Wildtyptieren unterscheiden, um so die gezüchteten Tiere zu genotypisieren.

### PCR des Connexin32-Wildtyp-Gens

Primer:

Cx32-INT-Anzini (5'-*primer*): 5'-CCA-TAA-GTC-AGG-TGT-AAA-GGA-GC-3'

32Rev2 (3'-*primer*): 5'-AGA-TAA-GCT-GCA-GGG-ACC-ATA-GG-3'

Für die Amplifikation der genomischen DNA diente folgender Ansatz:

Aqua bidest.	14 µl
10 x Reaktionspuffer	2,5 µl
dNTP-Mix (je 10 mM)	5 µl
<b>INT</b> (5'-primer; 20 pM/µl)	1 µl
<b>Rev</b> (3'-primer; 20 pM/µl)	1 µl
DNA-Probe	1 µl
Taq-Polymerase (1 U/µl)	0,5 µl

Dieser Ansatz wurde mit 20 µl Paraffinöl überschichtet, sofern der Biometra Personal Cycler eingesetzt wurde. Wenn der Biometra Uno Thermoblock Verwendung fand, wurde dessen Deckelheizung auf 110° C eingestellt. Die Proben wurden 10 Minuten bei 94° C denaturiert, die Taq-Polymerase hinzupipettiert und anschließend 35 Zyklen des folgenden Temperaturprogramms durchlaufen:

Temperatur	Dauer	Zweck
95° C	60 Sekunden	Denaturierung der DNA
60° C	45 Sekunden	Anlagerung der <i>primer</i> ( <i>annealing</i> )
72° C	60 Sekunden	Verlängerung der <i>primer</i> ( <i>extension</i> )

## Material und Methoden

Am Ende des Temperaturprogramms wurde der Ansatz nochmals 10 Minuten bei 72° C inkubiert, um eine vollständige Verlängerung der DNA-Fragmente zu gewährleisten.

### PCR des Connexin32-Knock-Out-Gens

Primer:

Cx32-INT-Anzini (5'-*primer*): 5'-CCA-TAA-GTC-AGG-TGT-AAA-GGA-GC-3'

NEO-Anzini-32 (3'-*primer*): 5'-ATC-ATG-CGA-AAC-GAT-CCT-CAT-CC-3'

Für die Amplifikation der genomischer DNA diente folgender Ansatz:

Aqua bidest.	14 µl
10 x Reaktionspuffer	2,5 µl
dNTP-Mix (je 10 mM)	5 µl
INT (5'-primer; 20 pM/µl)	1 µl
NEO (3'-primer; 20 pM/µl)	1 µl
DNA-Probe	1 µl
Taq-Polymerase (1 U/µl)	0,5 µl

Dieser Ansatz wurde mit 20 µl Paraffinöl überschichtet, sofern der Biometra Personal Cycler eingesetzt wurde. Wenn der Biometra Uno Thermoblock Verwendung fand, wurde dessen Deckelheizung auf 110° C eingestellt. Die Proben wurden 10 Minuten bei 94° C denaturiert, Taq-Polymerase hinzupipettiert (*hot start*) und anschließend 35 Zyklen des folgenden Temperaturprogramms durchlaufen:

Temperatur	Dauer	Zweck
95° C	60 Sekunden	Denaturierung der DNA
63° C	45 Sekunden	Anlagerung der <i>primer</i> ( <i>annealing</i> )
72° C	60 Sekunden	Verlängerung der <i>primer</i> ( <i>extension</i> )

Am Ende des Temperaturprogramms wurde der Ansatz nochmals 10 Minuten bei 72° C inkubiert, um eine vollständige Verlängerung der DNA-Fragmente zu gewährleisten.

### Agarosegele

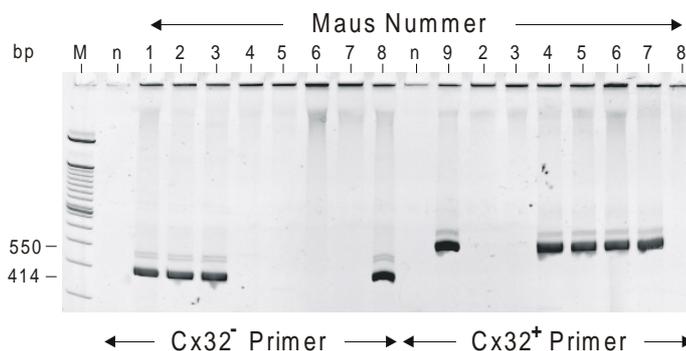
Zur Kontrolle der *in vitro* Amplifikation wurde ein 0,8%iges Agarose-Gel eingesetzt. Dazu wurden 0,8 g Agarose in 100 ml TBE aufgekocht und - nach Abkühlung auf ca. 45 ° C (etwas mehr als „handwarm“) - in eine vorbereitete Gelkammer gegossen. Die DNA-Proben wurden mit 10 x DNA-Ladepuffer (1/10 des Volumens der DNA-Lösung) versetzt. Nach dem Erstarren des Gels wurden die DNA-Proben auf das Gel aufgetragen und 45 Minuten bei 90 V in 1 x TBE elektrophoretisch aufgetrennt.

Als Marker diente Hae II-verdaute  $\Psi_{x174}$ -Phagen-DNA (DNA-Fragmente: 1353 bp, 1078 bp, 872 bp, 603 bp, 310 bp, 281 bp, 234 bp, 194 bp, 118 bp), bezogen von MBI Fermentas.

Nach Beendigung des Laufs wurde das Gel in 0,1%iger wässriger Ethidiumbromidlösung 15 Minuten gefärbt und unter UV-Bestrahlung das Bandenmuster mit einem Geldokumentationssystem archiviert.

### Acrylamidgele

Während der Etablierung der PCR-Bedingungen und zur Überprüfung neuer Primerchargen wurden 10%ige Acrylamidgele verwendet, die eine bessere Auflösung kurzer Sequenzen ermöglichen, aber aufwendiger zu präparieren sind. Die Gele wurden zwischen zwei 20 x 20 cm Glasplatten, welche über 1 mm dicke Abstandhalter (*Spacer*) separiert waren, gegossen. Dazu wurden 20,2 ml Aqua bidest., 12,0 ml Acrylamidlsg. (30%ig), und 3,6 ml 10 x TBE in einem kleinen Becherglas gemischt und die Polymerisation durch Zugabe von 180  $\mu$ l APS (10%ig) und 20  $\mu$ l TEMED gestartet. Dann wurde die Lsg. zügig, aber ohne Blasenbildung zwischen die Platten gegossen (aus Platten und *Spacer*n zusammengestellte Gelkammer schräg lagern, „Ohrenplatte“ oben, Ausguss des Becherglases im Ausschnitt zwischen den „Ohren“ auf die unteren Platte aufsetzen, Lsg. eingießen bis der Flüssigkeitsspiegel durch die Kapillarkräfte auch in die „Ohren“ steigt und Kamm einsetzen). Das Gel ist einsatzbereit, sobald die im Becherglas verbliebenen Reste erstarrt sind, gewinnt jedoch an Qualität, wenn man es über Nacht in Frischhaltefolie eingeschlagen und mit TBE-Puffer angefeuchtet „reifen“ lässt.



**Abbildung 2-5:** *Cx32*-Genotypisierung mittels PCR. DNA aus Schwanzspitzen wurde mit spezifischen Primerpaaren für das *Cx32*-Wildtyp- ( $Cx32^+$ ) oder *Cx32*-Knock-out-Allel ( $Cx32^-$ ) mittels PCR amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden durch PAGE separiert und mit Ethidiumbromid gefärbt.  $Cx32^-$  spezifische PCR-Produkte sind in den Spuren 1-3 und 8 zu sehen ( $Cx32^{Y/-}$ -Genotyp) und  $Cx32^+$  spezifische PCR-Produkte in den Spuren 4-7 und 9 ( $Cx32^{Y/+}$  Genotyp). M Größenmarker, n negativ Kontrolle (PCR-Reaktion ohne DNA).

## Material und Methoden

Der unten querlaufende *Spacer* wurde entfernt, das Gel in die Elektrophoreseapparatur eingespannt, die Pufferreservoirs mit 1 x TBE gefüllt und der Kamm entfernt. Überschüssige Polyacrylamidreste wurden mit einer kanülenbestückten Spritze, gefüllt mit Puffer aus der oberen Kammer, aus den Taschen gespült.

Probenauftrag, Färbung mit Ethidiumbromid und Archivierung erfolgten wie bereits bei den Agarosegelen beschrieben.

### 2.7.3. Induktion von Lebertumoren

#### **Vorbereitungsliste: DEN-Behandlung**

Folie (um Arbeitsflächen im Abzug und Tierstall abzudecken)

Klebeband und Schere

Kleenex-Rolle

Ethanol, 70%

Schreibpapier und Kuli

Edding, Filzschreiber

(Brief)Waage

Wägegefäß, Becherglas, Kunststoff (PP) ca. 2l

Schraubdeckel-Gefäß aus Plastik („Sicherheitsbehälter“ für DEN-Lsg.) z.B. 50 ml Falcon Blue Max (konisches Probenröhrchen mit Standfuß)

Glasampulle (mit Rollrand) und Head-Space Kappe mit Gummistopfen (für DEN-Injektionslsg.)

Bördelzange für Head-Space Kappe

DEN-Injektionslsg. (DEN in physiologischer Kochsalzlsg.)

Kanülen

Spritzen (1 ml)

Glasgefäß mit NaOH-Lsg. für Kanülen und DEN-„Vernichtung“ (NaOH-Lsg.: 12,5 g NaOH je Liter. + 10g Aluminiumfolie)

Warnschild für Tierstall

Latex-Untersuchungshandschuhe

Atemschutzmasken

Einmalanzug/Kittel

(Taschenrechner)

Durchführung:

Die Lebertumoren wurden durch eine intraperitoneale Injektion mit N-Nitrosodiethylamin (DEN) in einer Konzentration von 10 µg/g KG (Körpergewicht) am Tag 12 bis 15 nach der Geburt induziert (Experiment I, Experiment IIIb: Inhibitionsversuch und Experiment II) oder mit einer Konzentration von 90 µg/g KG (Körpergewicht) in der 6. Woche nach der Geburt (Experiment IIIa: Promotorversuch). Zum ersten Zeitpunkt befindet sich die Leber in einem DNA-Synthesemaximum, was die Induktion von Mutationen besonders wahrscheinlich macht. DEN ist ein flüchtiges Kanzerogen, daher wurde die Behandlung unter Atemschutz durchgeführt, der Raum anschließend für 12 Stunden gesperrt und am folgenden Tag die Einstreu außerhalb der Tierstallroutine und unter Verwendung von Staubschutzmasken ausgewechselt. Die Spritzen, Kanülen, Vorratsgefäße und überschüssige DEN-Lösung wurden durch Behandlung mit NaOH-Lösung über Nacht im Abzug dekontaminiert: Gegenstände inklusive dem offenen Vorratsgefäß mit restlicher DEN-Lsg. in der NaOH-Lsg. versenken und Aluminiumfolie zugeben.

2.7.4. Tötung der Tiere und Leberentnahme

Vorbereitungsliste:

Sezierplatte	Styroporplatte in Aluminiumfolie gepackt
Photowanne	Auffangwanne unter Sezierplatte
Papiertücher	als Abdeckung für die Sezierplatte
OP-Besteck	
Nadeln oder Kanülen	im OP-Besteck
70 %iges Ethanol, Spritzflasche	
PBS	zum Abspülen der blutigen Lebern
Protokollbögen	
Papier und Stifte: Bleistift, Kugelschreiber und Permanentschreiber	
Waage	
Wägegefäß	Becherglas aus Kunststoff
2 Petrischalen	Spül- und Wägegefäß
Trockeneisplatte/ -block	
Styroporbox mit Trockeneisbruch	
Dewargefäß	mit flüssigem Stickstoff
Kunststoffpinzetten	
Aluminiumfoliestreifen, etikettiert	
Carnoylsg. in Szintillationsgefäß	

## Material und Methoden

Formalinlsg. in Szintillationsgefäß

Schraubdeckelreaktionsgefäße

Steril, für RNA-Proben

Gefäße und Folie beschriftet mit Versuchsbezeichnung, Tier-Nr. und Datum

Sterilisationsbeutel

Abfallbeutel für die Kadaver

Lampe

### **Durchführung:**

Die Tiere wurden gewogen und durch cervikale Dislokation („Strecken“) getötet. Der Körper wurde auf der Sezierplatte mittels durch die Extremitäten gesteckte Nadeln aufgespannt, die Bauchbehaarung mit 70 %igem Ethanol befeuchtet, die Bauchdecke mit einer Schere entlang der Körperseiten aufgeschnitten, über den Kopf geschlagen und mit einer Nadel fixiert. Die Leber wurde freipräpariert, die Gallenblase entfernt, die Leber entnommen, in PBS gespült, auf einem Papiertuch abgetropft und gewogen.

Leber- bzw. Tumorgewebe wurde den für die geplante Untersuchung adäquaten Fixierungen zugeführt, d.h.:

- in den mit Fixierungslsg. gefüllten Szintillationsgefäßen versenkt;
- auf dem Trockeneisblock durchgefroren, auf diesem möglichst dicht (Gefrierbrand!) in vorgekühlte Aluminiumfolie eingewickelt, in der Styroporbox unter Trockeneisbruch zwischengelagert und endgültig bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert;
- in Schraubdeckelreaktionsgefäße überführt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

## 2.7.5. Anfertigung von Paraffinschnitten

### 2.7.5.1. Konservierung von Leberproben

#### **Carnoy-Fixierung**

Die Gewebeproben wurden nach der Entnahme aus dem Tier kurz in PBS geschwenkt und in ein mit Carnoy-Lösung gefülltes Szintillationsgefäß gegeben. Das Gefäß wurde verschlossen und über Nacht bei Raumtemperatur stehengelassen. Anschließend wurde die Carnoy-Lösung dekantiert und die Probe mit 10 ml Isopropanol überschichtet. Wenn die Lösung noch stark nach Eisessig roch, wurde das Isopropanol nach zwei Tagen erneuert. Die Proben können unter diesen Bedingungen bei Raumtemperatur gelagert oder in Paraffin eingebettet werden.

### Formalin-Fixierung

Die Gewebeproben wurden nach der Entnahme aus dem Tier kurz in PBS geschwenkt und in ein mit Formalin-Lösung (4 % Formalin in PBS) gefülltes Szintillationsgefäß gegeben. Das Gefäß wurde verschlossen und über Nacht bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend wurde die Formalin-Lösung dekantiert und die Probe eine Stunde lang mit Leitungswasser gespült, wobei das Wasser mehrfach durch frisches ersetzt wurde. Die Entwässerung erfolgte über eine aufsteigende Isopropanol-Reihe:

Isopropanol	Zeit
50%	45 Minuten
75%	1 Stunde
90%	2 Stunden
100%	2 Stunden
100%	über Nacht

Die Proben können unter diesen Bedingungen bei Raumtemperatur gelagert oder in Paraffin eingebettet werden.

#### 2.7.5.2. Paraffineinbettung

Eine Histowax® / Isopropanol-Lösung (Verhältnis 5:1) wurde hergestellt und über Nacht auf 60° C im Wasserbad erhitzt. Die entwässerten Proben wurden nach Dekantieren des zur Entwässerung genutzten Isopropanols (aus dem letzten Schritt der Isopropanol-Reihe) im Ofen bei 60° C mit der Histowax® / Isopropanol-Lsg. über Nacht inkubiert. Der Überstand wurde abgegossen und die Proben bei 60° C in Gießformen überführt, die flüssiges Histowax® enthielten. Nach einer Inkubationszeit von 8 Stunden bei 60° C wurden die Gießformen in eine Wanne mit Eiswasser gegeben. Die erstarrten Paraffinblöcke wurden (in der Regel am nächsten Tag) aus den Gießformen entnommen. Die Würfel wurden auf der Oberseite mit einem Skalpell begradigt, auf einer mit Aluminiumfolie abgedeckten Heizplatte angeschmolzen und ein beschrifteter Zettel mit dem wiedererstarrenden Wachs fixiert.

#### 2.7.5.3. Silanisierung der Objektträger

Die Objektträger wurden 5 Minuten in Beschichtungslösung (2 % (v/v) 3-Aminopropyltriethoxysilan in Aceton) gestellt. Danach wurden die Objektträger zweimal kurz in Aceton und *Aqua bidest.* geschwenkt und getrocknet.

### 2.7.5.4. Schneiden

Von den eingebetteten Proben wurden mit dem Mikrotom ca. 5 µm dicke Schnitte angefertigt. Diese wurden mit einem Pinsel vorsichtig von der Klinge gelöst, in einem Wasserbad bei 45° C „gestreckt“ und anschließend auf die silanisierten Objektträger aufgezogen.

### 2.7.5.5. Entparaffinieren der Schnitte

Zur Entparaffinierung wurden die Schnitte zweimal 5 Minuten in Xylol inkubiert. Anschließend folgte die Rehydratisierung in einer absteigenden Alkoholreihe (je 2 Minuten in 100 %, 96 %, 70 % und 50 % (v/v) Ethanol), nach der die Schnitte in wässrigen Lösungen weiter behandelt werden konnten.

## 2.7.6. Anfertigung von Kryostatschnitten

### 2.7.6.1. Silanisierung der Objektträger

wie oben

### 2.7.6.2. Schneiden

Von den eingefrorenen Gewebeproben wurden mit Hilfe des Kryostatmikrotoms 10 µm dicke Schnitte angefertigt. Diese wurden dann auf die silanisierten Objektträger aufgezogen und mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur getrocknet.

## 2.7.7. Histochemische Färbungen

### 2.7.7.1. Enzymhistologische Färbungen

#### 2.7.7.1.1. Glukose-6-phosphatase (G-6-Pase)-Färbung

Ausgangsmaterial: luftgetrocknete Gefrierschnitte, 10 µm dick, auf silanisierten Objektträgern

- 30 Minuten bei 37° C Inkubationslsg. einwirken lassen
- 5 Sekunden mit Leitungswasser spülen

- 60 – 90 Sekunden mit 7,5%iger Ammoniumsulfidlg. (15 ml Ammoniumsulfid pro analysi auf 185 ml Aqua bidest.) fällen
- 5 Sekunden mit Leitungswasser spülen
- 5 Minuten mit Glutaraldehydsg. fixieren
- 5 Minuten mit fließendem Leitungswasser spülen
- 30 Sekunden mit Hämalaun gegenfärben
- 15 Minuten mit fließendem Leitungswasser „bläuen“
- mit aufsteigender Ethanolreihe entwässern (jeweils 20 Sekunden in 50%igem, 70%igem, 96%igem und 100%igem Ethanol inkubieren)
- 2 x 20 Sekunden in Xylol spülen
- Eindecken in Entellan®

#### 2.7.7.2. Immunhistologische Färbungen

##### **Färbung**

Die immunhistochemische Färbung der Gewebeschnitte erfolgte in zwei Schritten. Zunächst wurde ein antigenspezifischer Antikörper (Primärantikörper; 1. Antikörper) auf das Substrat gegeben. Dessen Antigenbindung wurde anschließend durch die Verwendung eines Sekundärantikörpers (2. Antikörper), der gegen das Fc-Fragment des Primärantikörpers gerichtet ist, nachgewiesen. Als **Negativkontrollen** wurden stets auch Ansätze, bei denen entweder der Primär- oder der Sekundärantikörper durch Normalserum ersetzt wurde, durchgeführt.

Das Färbeprotokoll war von dem verwendeten Konjugat des Sekundärantikörpers abhängig. Wurde ein Peroxidase-gekoppelter Antikörper verwendet, war eine Inaktivierung der Gewebe-Peroxidasen notwendig. War das Konjugat des Sekundärantikörpers ein Fluoreszenzfarbstoff, konnte dieser Protokollschritt dagegen unterlassen werden.

Die eingesetzten Antikörper und Normalseren sind in der folgenden Tabelle aufgeführt. Die Inkubationen mit Antikörpern und Normalseren erfolgten stets in einem 200 µl Volumen (Schnitt wurde auf dem Objektträger mit einem DAKO-Fettstift umrandet).

**Antikörper und Normalseren für die immunhistochemische Färbung.**

a) Primärantikörper

Antigen	Spezies	Firma/Herkunft	Verdünnung
BrdUrd, human	Maus, monoklonal	Dako, Hamburg	1:20
c-jun / AP-1 (Ab-1)	Kaninchen, polyklonal	Dianova, Hamburg	1:10
Connexin32	Kaninchen, polyklonal	Dr. Traub, Bonn	1:1 000
Connexin32	Maus, monoklonal	Zytomed, Berlin	1:250
Connexin32	Ziege, polyklonal	SantaCruz Biotech, Santa Cruz, USA	1:250
Ki-67, Maus	Ratte, polyklonal	Dianova, Hamburg	1:20

b) Sekundärantikörper

Antigen	Konjugat	Spezies	Firma/Herkunft	Verdünnung
Kaninchen-IgG	HRP	Schwein	Dako, Hamburg	1:20
Maus-IgG	HRP	Ziege	Sigma, Steinheim	1:20
Ratten-IgG	HRP	Kaninchen	Dako, Hamburg	1:20
Ziege-IgG	HRP	Maus	SantaCruz Biotech, Santa Cruz, USA	1:50

c) Kennzeichen der Fluoreszenzfarbstoff-Konjugate

Fluoreszenzfarbstoff	Anregungs- wellenlänge	Emissions- wellenlänge	Farbe
Cy3	553	568-574	rot

d) Normalseren/Fab-Fragment

Beschreibung	Spezies	Firma/Herkunft
Schweine-Normalserum	Schwein	Dako, Hamburg
Ziegen-Normalserum	Ziege	Biospa

#### 2.7.7.2.1. c-jun-Färbung

Ausgangsmaterial: Paraffinschnitte 10 µm dick, auf silaniserten Objektträgern entparaffinieren, s.o.

- Rehydratisieren in absteigender Ethanolreihe: jeweils 1 Minute in 100%igem, 96%igem, 70%igem und 50%igem Ethanol inkubieren
- 5 Minuten in TBS inkubieren
- Mikrowellenaufschluß: 25 Minuten mit 720 W in 1 l Citratpuffer
- 5 Minuten in TBS inkubieren
- 30 Minuten blocken unspezifischer Bindungsstellen mit Ziegennormalserum, 1:30 verdünnt in TBS
- Inkubation mit Kaninchen Anti-c-jun Ig Fraktion 1:10 verdünnt in TBS/S über Nacht bei 4° C in einer feuchten Kammer
- 2 x 5 Minuten in TBS waschen
- 30 Minuten mit sekundärem Antikörper (anti-Kaninchen-IgG biotinyliert, 1:200 in TBS verdünnt) inkubieren
- 2 x 5 Minuten in TBS waschen
- 30 Minuten mit Streptavidin-AP-Komplex 1:200 in TBS koppeln
- 2 x 5 Minuten in TB-Puffer inkubieren
- Farbentwicklung mit NBT/BCIP-Lsg., ca. 15 Minuten unter mikroskopischer Kontrolle
- Färbung stoppen durch Waschen in Aqua bidest.
- Einbetten des Schnittes mit Kaysers Glyceringelantine.

#### 2.7.7.2.2. Connexin32-Färbung

Ausgangsmaterial: Gefrierschnitte, 10 µm dick, auf silaniserten Objektträgern

- Schnitte gut trocknen (Ofen 40° C, ca. ½ Stunde)
- Fixierung mit kaltem absoluten Ethanol (unvergällt); 5 Minuten bei -20° C im Kryostaten in vorgekühltem Ethanol
- Schnitte schnell (einzeln) mit Fön trocknen (wenn nicht schnell genug getrocknet wird, „verschwimmen“ die Connexinbälckchen)

## Material und Methoden

- ½ Stunde bei Raumtemperatur auskühlen und trocknen
- 5 Minuten in PBS inkubieren
- mit aufsteigender Methanolreihe entwässern, jeweils 1 Minute in 50%igem, 70%igem und 90%igem Methanol inkubieren
- Inaktivierung endogener Peroxidasen: 15 Minuten in einer Lösung aus 200 ml Methanol und 667 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30 %) inkubieren
- Rehydratisieren in absteigender Methanolreihe: jeweils 1 Minute in 90%igem, 70%igem und 50%igem Methanol inkubieren
- 2 x 5 Minuten in PBS inkubieren
- 5 Minuten in PBS/S inkubieren
- unspezifische Bindungsstellen mit Schweinenormalserum (1:30 in PBS/S) absättigen, 5 Minuten
- Inkubation mit Anti-Connexin32-Antikörper in PBS/S verdünnt:

aus Kaninchen	1:1000
aus Maus	1:250
aus Ziege	1:250

über Nacht in der feuchten Kammer bei 4° C

- 5 Minuten in PBS/S inkubieren
- unspezifische Bindungsstellen mit Schweinenormalserum (1:30 in PBS/S) absättigen, 5 Minuten
- Inkubation mit 2. Antikörper, verdünnt in PBS/S, bei Raumtemperatur

Antikörper gegen	Verd.	Zeit
Kaninchen-IgG	1:20	1 Stunde
Maus-IgG	1:20	1 Stunde
Ziege-IgG	1:50	20 Minuten

alle sekundären Antikörper waren HRP-konjugiert.

- 5 Minuten in PBS waschen
- 5 Minuten in Acetatpuffer konditionieren
- Färbung mit AEC-Lösung bei Raumtemperatur, ca. 20 Minuten unter mikroskopischer Endpunktkontrolle

- 5 Minuten waschen in Acetatpuffer
- 5 Minuten waschen in PBS
- 5 Minuten waschen Aqua bidest.
- Fakultativ Hämalaun-Gegenfärbung integrieren:
  - 5 Minuten Hämalaunlg.
  - 10 Minuten bläuen mit fließendem Leitungswasser
- Einbetten des Schnittes mit Kaysers Glyceringelantine.

### 2.7.7.2.3. Connexin32 / BrdUrd-Färbung

Ausgangsmaterial: Gefrierschnitte, 10 µm dick, auf silanisierten Objektträgern

wie Connexin32-Einzelfärbung beginnen, die zusätzlichen Arbeitsschritte setzen nach der AEC-Färbung ein

- 5 Minuten waschen in Acetatpuffer (noch wie in Einzelfärbung)
- 5 Minuten waschen in PBS (noch wie in Einzelfärbung)
- 15 Minuten in 4 N HCl bei Raumtemperatur inkubieren (1. neuer Schritt)
- 2 x waschen in PBS
- 3 Minuten mit 0,01 % (w/v) Trypsin in Borsäure/Boratpuffer, pH 7,6 inkubieren
- 5 Minuten in PBS waschen
- unspezifische Bindungsstellen mit Schweine-Normalserum (1:30 in PBS) blocken, 5 Minuten
- Inkubation mit dem Primärantikörper (Maus Anti-BrdUrd Ig-Fraktion; 1:20 in PBS verdünnt) über Nacht bei 4° C in einer feuchten Kammer
- Objektträger kurz in PBS schwenken
- Inkubation mit dem Sekundärantikörper (Ziege Anti-Maus-IgG, HRP-konjugiert, 1:40 in PBS/S verdünnt) für 20 Minuten bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer
- Zweimal 5 Minuten in PBS waschen
- Schnitt 5 bis 15 Minuten mit DAB-Lösung färben (mikroskopische Kontrolle)
- 5 Minuten in PBS waschen
- Schnitt 5 Minuten in *Aqua bidest.* waschen

## Material und Methoden

- fakultativ Hämalaun-Gegenfärbung integrieren (s.o.) oder gleich eindecken, s.u.

Die im ersten Teil dieses Protokolls erzeugte Connexin32-AEC-Färbung verändert wegen pH-Änderungen im zweiten Teil (BrdUrd-Färbung) des Protokolls ihrer Farbe; diese Farbumschläge sind reversibel und stören nicht!

### 2.7.7.2.4. Ki-67 / Connexin32-Doppelfärbung

Ausgangsmaterial: Gefrierschnitte, 10 µm dick, auf silanisierten Objektträgern

Präparieren, Fixieren, Inaktivieren der endogenen Peroxidasen und Blocken unspezifischer Bindungsstellen mit Schweinenormalserum wie in der Connexin32-Einzelfärbung, dann wird aber zuerst der Ki-67-Antikörper eingesetzt:

- Inkubation mit dem Primärantikörper (Ratte Anti-Maus-Ki67; 1:20 verdünnt in PBS/S) über Nacht bei 4° C in einer feuchten Kammer
- 5 Minuten waschen in PBS/S
- unspezifische Bindungsstellen mit Schweinenormalserum (1:30 in PBS/S) absättigen, 5 Minuten
- Inkubation mit dem sekundärem Antikörper (Kaninchen Anti-Rattenimmunglobuline, Ig-Fraktion, HRP-konjugiert, 1:20) bei Raumtemperatur für 60 Minuten
- 2 x 5 Minuten waschen mit PBS
- 5 Minuten äquilibrieren mit PBS/S
- unspezifische Bindungsstellen mit Schweinenormalserum (1:30 in PBS/S) absättigen, 5 Minuten
- Inkubation mit dem zweiten primären Antikörper (Kaninchen Anti-Connexin32, 1:1000 in PBS/S verdünnt); über Nacht bei 4° C in einer feuchten Kammer
- 5 Minuten waschen mit PBS/S
- unspezifische Bindungsstellen mit Schweinenormalserum (1:30 in PBS/S verdünnt) absättigen, 5 Minuten
- Inkubation mit dem zweiten sekundären Antikörper (Schwein Anti-Kaninchenimmunglobuline, Ig-Fraktion, HRP konjugiert, 1:20 in PBS/S verdünnt) für eine Stunde bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer
- 5 Minuten waschen mit PBS

- 5 Minuten in Acetatpuffer konditionieren
- Färbung mit AEC-Lösung wie unter Connexin-Einzelfärbung beschrieben, fakultativ mit Hämalaugegefärbung und mit Kaysers Glyceringelantine eindecken, s.u.

### 2.7.7.3. Gegenfärbung mit Hämalun-Eosin (H&E)

Allgemein wird die H&E-Färbung wegen ihrer einfachen und raschen Durchführbarkeit als Übersichtsfärbung eingesetzt. Sie zeigt Zellkerne, sauren Schleim u.a. blau, alles übrige in verschiedenen Tonabstufungen in rot. Hämalun als positiv geladener Farbstoff kann Basophilie einer Struktur anzeigen. Die meistens erwünschte selektive Kernfärbung wird durch die Azidität der Lösung und einen Überschuss an Alaun erreicht: Aluminiumionen und andere Kationen konkurrieren mit dem Farbstoff um die Bindung an negativ geladene Valenzen, und das saure Milieu vermindert die Dissoziation von Carboxylgruppen im Gewebe.

Eosin ist wohl der gebräuchlichste Farbstoff für eine Cytoplasmafärbung. Bei dem Eosin Y bzw. Eosin G (Y für yellow oder G für gelblich) genannten Farbstoff handelt es sich um Tetrabrom-Fluorescein.

Die H&E-Gegenfärbung erfüllt mehrere Zwecke:

mikroskopische Beurteilung des Gewebezustandes;

Identifizierung von Artefakten wie Risse durchs Schneiden oder Faltenwurf beim Aufziehen;

Einscannen der Schnittflächen mit dem Integrationstablett

Zellzahlbestimmung in den Leberschnitten

### **Färbegang**

- Objektträger kurz in Aqua bidest. tauchen
- 5 Minuten in Hämalun-Lösung tauchen
- 10 Minuten in fließendem Leitungswasser bläuen und fixieren
- kurz in 50%igem Ethanol äquilibrieren
- 3 Minuten in alkoholischer Eosin-Lösung I färben
- Entwässern durch aufsteigende Ethanolreihe:
- 30 Sekunden 80%iges Ethanol

## Material und Methoden

- kurz 96%iges Ethanol
- 1 Minute 100%iges Ethanol
- 2 x 5 Minuten mit Xylol spülen
- Eindecken in Entellan®

### 2.7.7.4. Eindecken mit Entellan® oder Kaysers Glyceringelatine

Entellan® oder Kaysers Glyceringelatine dienen als Einbettungsmedien für dehydratisierte, bzw. hydratisierte Schnitte.

Zum Einbetten eines hydratisierten Schnittes mit Kaysers Glyceringelatine einen Tropfen der warmen (60° C) Gelatine mit einem Glasstab auf den Schnitt geben, mit gebogener Präpariernadel Deckglas auflegen, eingeschlossene Luftblasen ausdrücken und nach dem Erstarren der Gelatine Ränder des Deckglases mit Nagellack abdichten.

Das Einbetten eines dehydratisierte Schnittes mit Entellan® erfolgt analog, nur dass die Lösung ohne Erwärmen gebrauchsfertig ist.

### 2.7.8. Quantitative Auswertung der Leberschnitte

Die quantitative Erfassung von gefärbten Arealen in Leberschnitten für Flächenbestimmungen oder als Grundlage stereologischer Berechnungen erfolgte mit Hilfe des rechnergestützten Bildanalyseprogramms MOSYS. Hierzu wurden die gefärbten Schnitte via Projektionsmikroskop mit Schrittmotortisch (Metallux, Fa. Leitz, Wetzlar) auf ein 30 x 30 cm großes Integrationstablett (Fa. Kontron, München) projiziert. Die Digitalisierung erfolgte durch manuelles Umfahren der Schnittländer und anderer Zielflächen ( z.B. Inselanschnittumrisse) mit einem Cursor. Die x/y-Koordinaten der jeweiligen Konturen wurden in einen Personal Computer (Hewlett Packard Vectra, IBM-AT kompatibel mit 80287-Koprozessor) eingelesen. Schnittpräparate, welche als Ganzes nicht in einem Bild auf das Tablett projiziert werden konnten, wurden mit Schrittmotortisch und Computer segmentiert, wobei der Rechner noch während der Aufnahme ein Gesamtbild konstruierte. Der verwendete Abbildungsmaßstab wurde durch Projektion einer Kalibrierskala von 2 mm Länge ermittelt und in den Rechner eingegeben.

Die so generierten Daten (Schnittfläche, Zahl und Anschnittfläche von Inseln) geben Aussagen über die Verhältnisse im zweidimensionalen Raum, sind jedoch nur bedingt ein Maß für die Verteilung im gesamten Leberlappen. Aufgrund stereologischer Gesetzmäßigkeiten sind die Anschnittwahrscheinlichkeiten für größere Inseln höher, als die für

kleinere Inseln. Berechnungen nach den Modellen von Fullman und Saltykov (Campbell *et al.*, 1982; 1986), wie sie mit dem MOSYS-Programm durchgeführt wurden, lieferten Aussagen für den dreidimensionalen Raum. Die Korrektur der unterschiedlichen Anschnitt-Wahrscheinlichkeiten erfolgte durch Kehrwertbildung der Einzeldurchmesser, wodurch eine stärkere Gewichtung der kleinen Inseln erreicht wurde. Das Modell nach Saltykov berücksichtigt ferner die Größenklassenverteilung der Anschnitte bei der Berechnung der Inselzahl je  $\text{cm}^3$ . Unter den Voraussetzungen

- kugelförmiger oder ellipsoider Inseln;
- statistisch gleichmäßiger Verteilung der Inseln im Leberlappen und
- einer im Vergleich zu den untersuchten Strukturen dünnen Schnittdicke

ermittelt MOSYS folgende Parameter:

- Zahl der Inseln pro  $\text{cm}^3$  Lebergewebe,
- Prozentualer Volumenanteil des Inselgewebes am Gesamtlebervolumen und
- Größenklassenverteilung der Inseln.

## 2.7.9. Cytochrom $b_5$ und Cytochrom P-450 Bestimmung

### 2.7.9.1. Präparation von Mikrosomen

Die Mäuse wurden im Arbeitsraum des Tierstalles gewogen, dekapitiert, kurz entblutet, der Bauchraum geöffnet und die Leber freipräpariert (Gallenblase entfernen!), s.o. Die Lebern wurden abgespült, gewogen und in eiskalter physiologischer Kochsalzlg. in das Labor transportiert.

Nach dem Waschen der Leber in Perfusionsmedium, wurde sie gewogen und je g Leber 9 ml kaltes Homogenisationsmedium zugegeben. Die Leber wurde unter Eiskühlung mit einer Schere zunächst grob zerkleinert und anschließend im Pottergefäß homogenisiert.

Die Homogenate wurden in Zentrifugenröhrchen pipettiert, gegeneinander austariert und eine fraktionierende Zentrifugation durchgeführt.

Ultrazentrifuge L7-65-UZ mit Ti 50 Rotor von Beckmann, 250  $\mu\text{l}$  Aqua bidest. als Dämpfung je Zentrifugenröhrchen, auf 4° C vorgekühlt

Die Zentrifugation erfolgte ohne Unterbrechung über 30 Minuten, wobei nach jeweils 10 Minuten die Geschwindigkeit erhöht wurde.

## Material und Methoden

<b>Zeit</b>	<b>Upm</b>	<b>K (gerundet)</b>	<b>Sedimentation von</b>
10 Minuten	3 000	26 000	Gewebe- u. Zellresten
10 Minuten	9 000	2 500	Zellkernen
10 Minuten	13 000	1 200	Mitochondrien

Anschließend wurde die aufschwimmende Fettschicht abgesaugt, das Homogenat in saubere Zentrifugenröhrchen dekantiert, mit 4 ml kaltem Homogenisationsmedium aufgestockt, die frisch beschickten Zentrifugenröhrchen gegeneinander austariert und das Pellet aus den „alten“ Röhrchen verworfen. Sodann erfolgte die erste Sedimentation der Mikrosomen:

Ultrazentrifuge L7-65-UZ mit Ti 50 Rotor von Beckmann, 250 µl Aqua bidest. als Dämpfung je genutzter Bohrung, auf 4° C vorgekühlt

<b>Zeit</b>	<b>Upm</b>	<b>K (gerundet)</b>	<b>Sedimentation von</b>
30 Minuten	30 000	216	Mikrosomen

Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in einer dem Ausgangsvolumen (siehe erste Zugabe von Homogenisationsmedium) entsprechenden Menge Waschmedium (eiskalte KCl-Lsg.) mit einem 1 ml Potter-Elvehjem-Homogenisator resuspendiert, in gewogene Zentrifugengefäße überführt und diese gegeneinander austariert. Es schloss sich die zweite Mikrosomensedimentation an:

Ultrazentrifuge L7-65-UZ mit Ti 50 Rotor von Beckmann, 250 µl Aqua bidest. als Dämpfung je genutzter Bohrung, auf 4° C vorgekühlt

<b>Zeit</b>	<b>Upm</b>	<b>K (gerundet)</b>	<b>Sedimentation von</b>
30 Minuten	30 000	216	Mikrosomen

Der Überstand wurde verworfen, das Zentrifugenröhrchen mit Pellet gewogen und aus der Differenz zwischen leerem Röhrchen und Röhrchen mit Niederschlag das Pelletgewicht berechnet. Das Pellet wurde in einem 1 ml Potter in Suspensionsmedium resuspendiert, wobei je g Pellet 4 ml Medium eingesetzt wurden.

### Aufbewahrung der Mikrosomen

Die Mikrosomen konnten als Pellet in den Zentrifugenröhrchen, mit Suspensionsmedium überschichtet und unter Stickstoff, bei 4° C bis zu 24 Stunden gelagert werden. Resuspendiert wurden sie erst bei Bedarf.

## 2.7.9.2. Proteinbestimmung

Zur Proteinbestimmung wurden die Proben zunächst 1:10 mit 0,015 N KOH verdünnt. Die gleichen Verdünnungen wurden von einer 250 mM Saccharoselösung hergestellt.

Vorverdünnung 1:10

	Saccharoseverdünnung	Proteinverdünnung
0,015 N KOH ( $\mu\text{l}$ )	900	450
250 mM Saccharose ( $\mu\text{l}$ )	100	- -
Protein-Suspension ( $\mu\text{l}$ )	- -	50
	1000 $\mu\text{l}$	500 $\mu\text{l}$

Mit den Verdünnungen wurde die Proteinbestimmung nach folgendem Schema durchgeführt:

Reagenzglas	1	2	3	4
Biuret	750			
Saccharose-verd. ( $\mu\text{l}$ )	250	188	125	--
Protein-verd. ( $\mu\text{l}$ )	--	62	125	250
Gesamtvolumen	1000			

Nach gutem Mischen wurde 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, erneut gemischt und die Extinktion  $E_1$  bei 545 nm gegen Aqua bidest. gemessen. Die Proben wurden nach der Messung in die Reagenzgläser zurückgegeben, mit je 25  $\mu\text{l}$  6 M KCN versetzt, um die Lösung zu entfärben, und gemischt. Nach 10 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde von den erneut gemischten Lösungen die Extinktion  $E_2$  bei 545 nm gegen Aqua bidest. gemessen.

Zur Auswertung wurden die gemessenen Extinktionen gegen die in den Reagenzgläsern enthaltenen  $\mu\text{l}$  Proteinverdünnung aufgetragen. Aus den Steigungen der resultierenden Geraden ergab sich der Proteingehalt.

Es gilt:

$$c = [\Delta(E_1 - E_2) \times F] / [\epsilon \times d]$$

Für die 1:10 Verdünnung gilt  $F = 40$ , der Extinktionskoeffizient  $\epsilon$  beträgt  $0,281 \text{ ml mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

2.7.9.3. Bestimmung von Cytochrome P-450 und  $b_5$

Die Bestimmung wurde am Beckmann DU 70 Spectrophotometer durchgeführt. Hierzu wird bei der Lampenwahl VIS ausgewählt, da das Spektrum im sichtbaren Bereich gefahren wird.

Für den Scan werden folgende Parameter eingestellt:

	<b><math>b_5</math>-Bestimmung</b>	<b>P-450 Bestimmung</b>
Function	Abs	Abs
Starting $\lambda$	490	490
Ending $\lambda$	390	390
Speed (nm/min)	600	600
Calculation	Nat A2	Nat A2
Base	409	485
Peak	426	450
Factor	1,00	1,000
Upper limit	0,100	0,100
Lower limit	-0,100	-0,100
Sampling Device	None	None

Die Differenzspektren wurden im Einkanalmodus durch Aufzeichnung des ersten Spektrums als Basislinie und elektronischer Verrechnung mit dem zweiten Spektrum erzeugt.

Cytochrom  $b_5$

Der Ansatz wurde direkt in die Küvette pipettiert:

		Endkonzentration
2900 $\mu$ l	Puffer	
+ 100 $\mu$ l	Mikrosomen	ca. 1mg/ml
3000 $\mu$ l		
( + 50 $\mu$ l	Hexobarbital (60mM)	1 mM)

Aufzeichnung der Basislinie

+ 2 $\mu$ l	NADH (30 mM)	20 $\mu$ M
-------------	--------------	------------

Aufzeichnung des Spektrums

Das aufgezeichnete Spektrum zeigte das Differenzspektrum von  $b_5(Fe^{2+})$  minus  $b_5(Fe^{3+})$ .

Aus der Extinktionsdifferenz  $E_{426}$  minus  $E_{409}$  konnte die Konzentration an Cytochrom  $b_5$  berechnet werden. ( $\epsilon_{426-409 \text{ nm}} = 0,185 \mu\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )

#### 2.7.9.3.1. Cytochrom P-450

Der bereits in der Küvette vorhandene Ansatz konnte auch zur CYP-Bestimmung verwendet werden, wenn Hexobarbital zugegeben wurde, ansonsten wurde folgender Ansatz verwendet:

2850 $\mu\text{l}$	Puffer	Endkonzentration
+ 100 $\mu\text{l}$	Mikrosomen (ca. 30 mg/ml)	ca. 1 mg/ml
+ 50 $\mu\text{l}$	Hexobarbital (60 mM)	1 mM
3000 $\mu\text{l}$		

hierzu gab man wenige Körnchen Dithionit und zeichnete die Basislinie auf. Anschließend wurde für ca. 30 sec mit CO begast und das Spektrum aufgezeichnet. Das erhaltene Spektrum zeigte das Differenzspektrum von P-450( $\text{Fe}^{2+}$ -CO) minus P-450( $\text{Fe}^{2+}$ ).

Aus der Extinktionsdifferenz  $E_{450}$  minus  $E_{490}$  konnte die Konzentration an Cytochrom P-450 berechnet werden ( $\epsilon_{450-490 \text{ nm}} = 0,091 \mu\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (nach Omura + Sato 1964)).

### 3. Ergebnisse

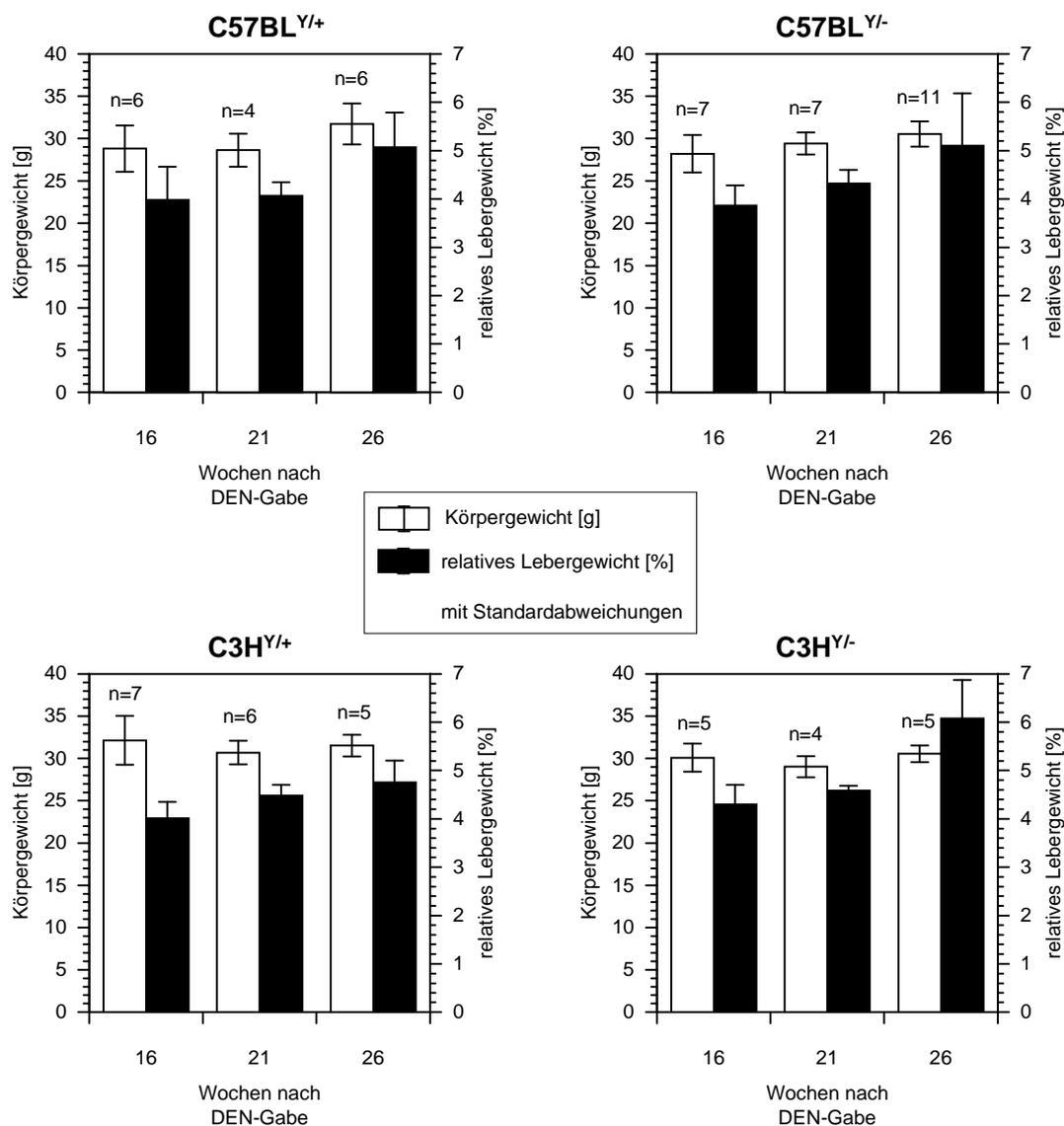
Cx32-Defizienz begünstigt die Entstehung von Lebertumoren in entsprechend genetisch veränderten Mäusen (Temme *et al.*; 1997). Die nachfolgend beschriebenen Experimente dienten der Aufklärung der zugrunde liegenden Mechanismen. Im wesentlichen wurden 3 tierexperimentelle Studien mit unterschiedlichen Zielrichtungen durchgeführt.

#### 3.1. Experiment I: Genetischer Hintergrund

Unterschiede in der Suszeptibilität für Hepatokanzerogenese zwischen verschiedenen Mäusestämmen sind wohl dokumentiert (siehe Übersichtsartikel von Drinkwater und Bennett, 1991; Drinkwater, 1994). C3H/He-Mäuse, z.B., weisen eine hohe Inzidenz an spontanen Lebertumoren auf und reagieren empfindlich auf chemische Hepatokanzerogene. Dagegen sind z.B. C57BL/6-Mäuse bei niedriger spontaner Lebertumorraten relativ resistent gegenüber chemisch-induzierter Hepatokanzerogenese (Drinkwater und Ginsler, 1986) Obwohl sowohl Hepatokanzerogenese-supprimierende als auch Suszeptibilität-vermittelnde Genloci identifiziert worden sind, ist die Funktion der zugrunde liegenden Gene noch nicht aufgeklärt (Drinkwater, 1994; Dragani *et al.*, 1995; Manenti *et al.*, 1994 und Balmain *et al.*, 1998). Im Experiment I sollte die Wechselwirkung zwischen Cx32 und anderen genetischen Faktoren bei der Hepatokanzerogenese geprüft werden. Hierzu wurden Cx32-Wildtyp- und Cx32-Null-Mäuse mit C3H/He- bzw. C57BL/6-Mäusen gekreuzt, die Cx32<sup>Y/-</sup>- und Cx32<sup>Y/+</sup>-F1-Männchen wurden einmalig mit Diethylnitrosamin behandelt und die präneoplastische Antwort in der Leber anhand der Entstehung Glucose-6-Phosphatase (G-6-Pase) defizienter Foci quantifiziert.

##### 3.1.1. Körper- und relatives Lebergewicht

Das durchschnittliche Körpergewicht blieb über die Zeit bei allen vier Genotypen konstant. Das relative Lebergewicht nahm bei allen Versuchsgruppen über die Zeit leicht zu (siehe Abb. 3-1). Cx32-defiziente Mäuse mit C57BL-Hintergrund zeigten keine erhöhten relativen Lebergewichte gegenüber den entsprechenden Wildtypmäusen. Bei den Cx32-defizienten Mäusen mit C3H-Hintergrund war das relative Lebergewicht zum letzten Untersuchungszeitpunkt (26 Wochen) signifikant gegenüber den Werten der entsprechenden Wildtypiere erhöht. Dies ist vermutlich auf das Auftreten von Tumoren in C3H<sup>Y/-</sup>-Mäusen zurückzuführen, was sich auch im hohen Volumenanteil G-6-Pase-defizienter Läsionen in Mäusen dieses Genotyps widerspiegelt (siehe Abbildung 3-2).



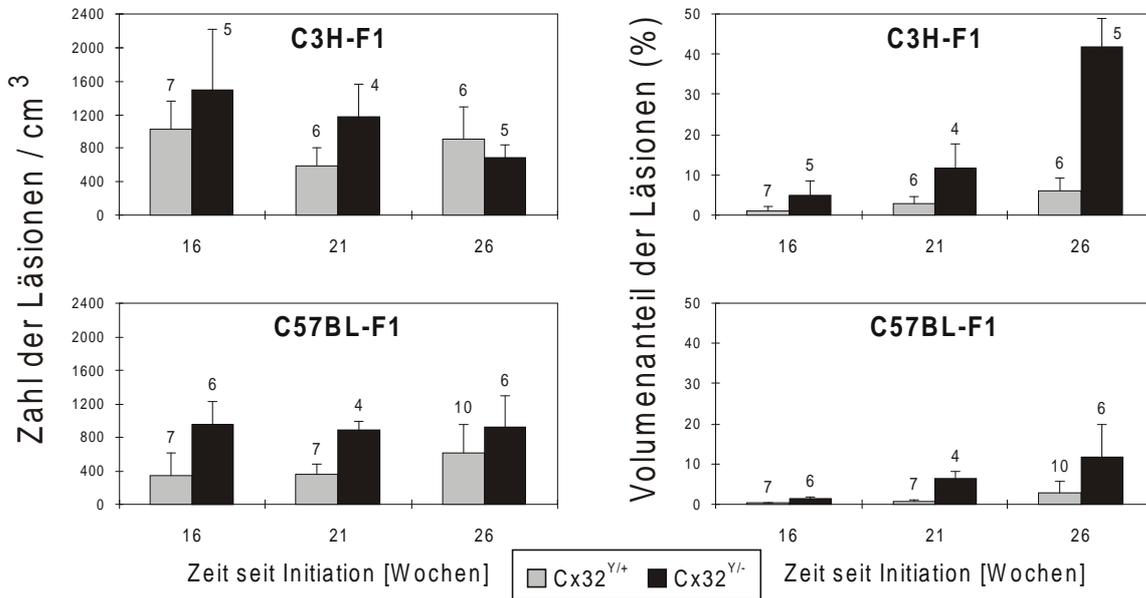
**Abbildung 3-1:** Körper- und relatives Lebergewicht der Versuchstiere im Experiment I. Die Balken repräsentieren die arithmetischen Mittel der Körper- bzw. relativen Lebergewichte der jeweiligen Versuchsgruppe; die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen an. Die Tierzahl ist über den Balken angegeben.

### 3.1.2. Kanzerogene Antwort im Experiment I

Präneoplastisch- und neoplastisch-veränderte Läsionen wurden in den Leberschnitten der behandelten Tiere über das Markerenzym G-6-Pase identifiziert, welches in den Läsionen gegenüber dem umliegenden Normalgewebe in seiner Aktivität erniedrigt ist (s. Farbtafel D). Die Zahl der enzymveränderten Läsionen pro cm<sup>3</sup> Lebergewebe und der prozentuale Volumenanteil der Läsionen in der Leber wurde über morphometrische Analysen bestimmt. In Abb. 3-2 sind die Ergebnisse für die Zahl der Läsionen je cm<sup>3</sup> Leber

## Ergebnisse

und den Volumenanteil der Läsionen am Lebergewebe für die vier Versuchsgruppen, geordnet nach Genotypen und Zeitpunkten, zusammengefasst.

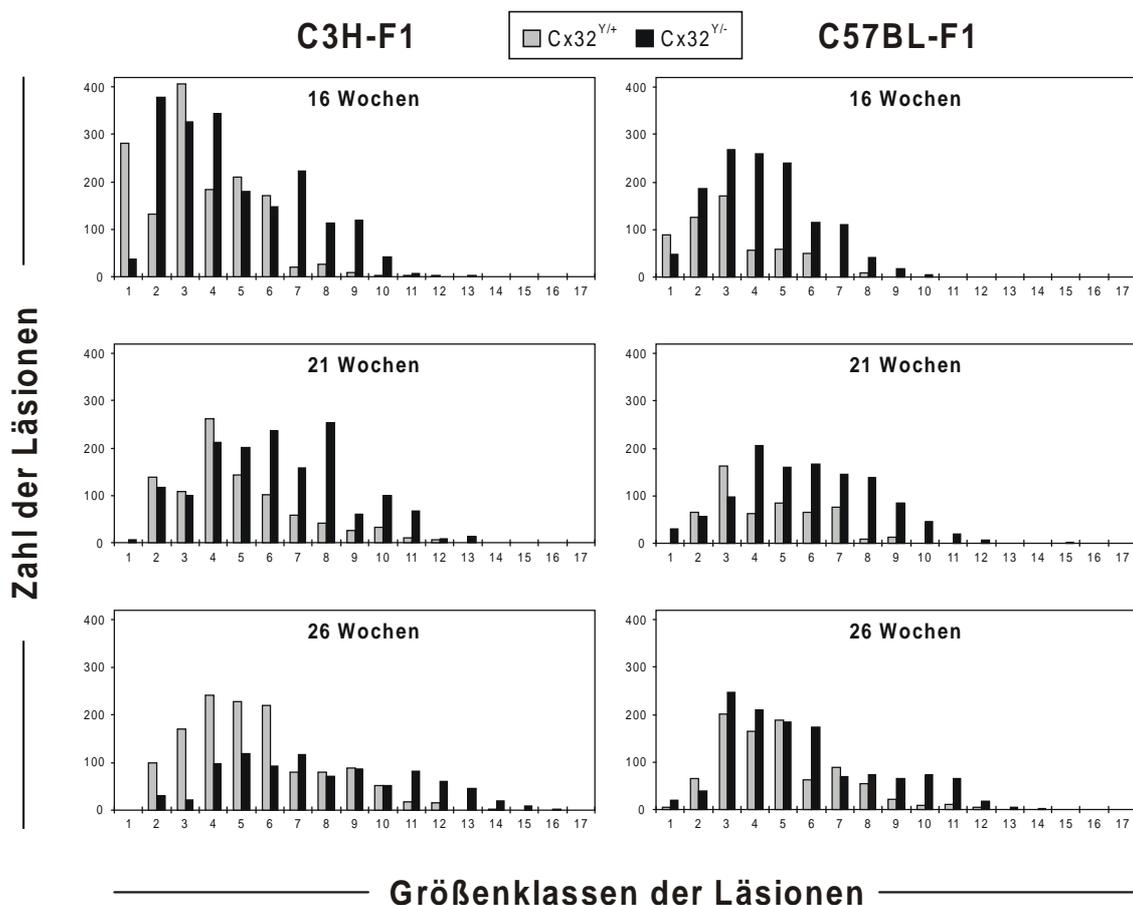


**Abbildung 3-2:** Quantitative Analyse G-6-Pase-defizienter Leberläsionen im Experiment 1. F1-Generationen von Cx32<sup>Y/+</sup>- und Cx32<sup>Y/-</sup>-Mäusen gekreuzt mit C3H/He bzw. C57BL-Mäusen wurden einmalig mit DEN behandelt und zu den angegebenen Zeitpunkten getötet. Mittels morphometrischer Methoden wurde die Zahl und der Volumenanteil enzymveränderter Läsionen in der Leber bestimmt. Die Balken zeigen die jeweiligen arithmetischen Mittel und Standardabweichungen der Zahl der enzymveränderten Läsionen pro cm<sup>3</sup> Lebergewebe und des prozentuale Volumenanteils der Läsionen in der Leber; darüber sind die zugehörigen Tierzahlen aufgeführt. Die statistische Analyse erfolgte über Zweiweg-ANOVA mit Interaktionstermen für Zeit und Genotyp unter Verwendung von PROC GLM in der SAS v.6.12 Analysis Software (SAS, Casy; NC). Die statistischen Angaben sind im Text aufgeführt.

Die Zahl der enzymveränderten Läsionen pro cm<sup>3</sup> veränderte sich im Beobachtungszeitraum in C3H-F1- und C57BL-F1-Mäusen, unabhängig vom Cx32-Genotyp, nur geringfügig; ein typisches Bild bei Initiationsexperimenten mit nur einer Karzinogenapplikation, bei der praktisch alle Läsionen zu Versuchsbeginn erzeugt werden. Die Zahl der Läsionen pro cm<sup>3</sup> war bei Cx32-defizienten C57BL-F1 Mäusen signifikant gegenüber dem entsprechenden Wildtyp erhöht ( $P < 0,0001$ ). Bei den entsprechenden C3H-F1-Tieren war der Unterschied deutlich geringer ( $P = 0,0504$ ).

Der relative Volumenanteil G-6-Pase-defizienter Foci stieg in allen Versuchsgruppen mit der Zeit an ( $P < 0,001$ ), was, bei in etwa gleichbleibender Zahl auf das zeitabhängige Wachstum der enzymveränderten Läsionen zurückgeführt werden kann. In C3H-F1- und C57BL-F1-Mäusen führte der Cx32-Defekt zu einem deutlich beschleunigtem Wachstum der Leberläsionen, gemessen am relativen Volumenanteil G-6-Pase-defizientem Gewe-

be ( $\sim 5$ -fach in C3H-F1;  $P < 0,0001$ , und  $\sim 7$ -fach in C57BL-F1;  $P < 0,0001$ ). Wie aufgrund der niedrigen Lebertumor-Suszeptibilität von C57BL-Mäusen zu erwarten war, lag der Volumenanteil des G6Pase-defizienten Gewebes in Mäusen des C57BL-F1-Genotyps zu allen drei Zeitpunkten tiefer als in C3H-F1-Mäusen. Cx32<sup>Y/-</sup>-Tiere mit genetischem C57BL-Hintergrund (C57BL-F1) zeigten, gemessen am Volumenanteil der Läsionen, eine stärkere kanzerogene Antwort als Cx32<sup>Y/+</sup>-Tiere mit C3H-Hintergrund (C3H-F1). Dies weist darauf hin, dass die Cx32-Defizienz die Hepatokanzerogenese effektiver verstärkte, als das (die) Suszeptibilitätsgen(e) im C3H-Stamm.



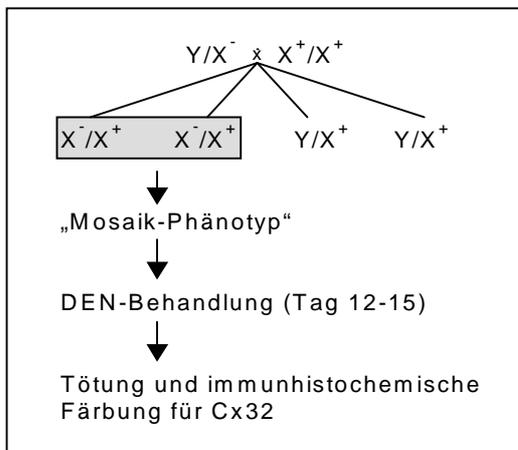
**Abbildung 3-3:** Größenklassenverteilung G-6-Pase-negativer Leberläsionen im Experiment I. Zur Behandlung der Versuchstiere siehe Legende zur Abbildung 3-2. Dargestellt ist die mittlere Häufigkeit der Läsionen in den jeweiligen Häufigkeitsklassen. Die Obergrenzen der Durchmesserklassen steigen logarithmisch von Klasse 1, antilog 2,0 (100  $\mu\text{m}$ ), Klasse 2, antilog 2,1 (126  $\mu\text{m}$ ), Klasse 3, antilog 2,2 (158  $\mu\text{m}$ ) bis Klasse 17, antilog 3,6 (3981  $\mu\text{m}$ ) an.

Der beschleunigende Effekt des Cx32-Gendefekts auf das Wachstum präneoplastischer Läsionen zeigte sich auch bei Analyse der Größenklassenverteilungen der Leberläsionen (Abbildung 3-3). In beiden F1-Stämmen waren die Läsionen der Cx32<sup>Y/-</sup>-Mäuse zu

größeren Durchmesserklassen hin verschoben und die höchsten Klassen waren zu allen Beobachtungszeitpunkten jeweils mit Läsionen aus Cx32-Null-Mäusen besetzt. Obwohl die Zahl der Läsionen in den hohen Durchmesserklassen nur klein war, leistete sie den größten Anteil zum Volumenanteil des enzymveränderten Gewebes in der Leber.

### 3.2. Experiment II: Mosaik-Expression von Cx32

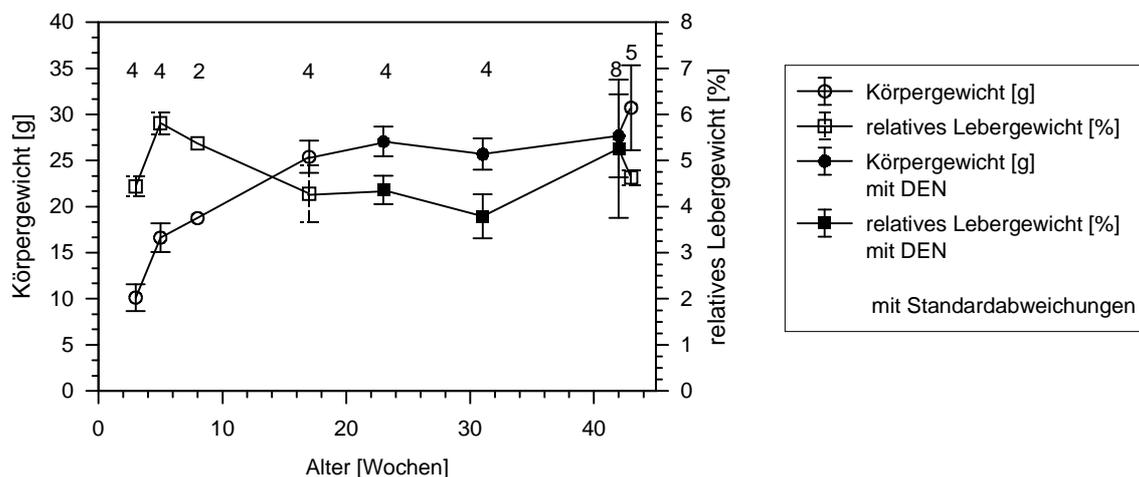
Connexin32 ist auf dem X-Chromosom lokalisiert. In Weibchen (X/X) wird eines der beiden X-Chromosomen während der frühen Embryonalentwicklung inaktiviert, um die gleiche Gendosis wie in Männchen (Y/X) zu gewährleisten. Es wird angenommen, dass beide X-Chromosomen die gleiche Wahrscheinlichkeit haben, inaktiviert zu werden und dass die einmal erfolgte Inaktivierungspräferenz an die Tochterzellen weitergegeben wird. Für X-chromosomal codierte Gene bedeutet dies, dass es in Geweben zur mosaikartigen Expression von Genen entweder des einen oder des anderen X-Chromosoms kommt (Knippers, 1997). Dies sollte prinzipiell auch für die Expression von Cx32 in der Leber von Mäusen vom Cx32<sup>X/-</sup>-Genotyp gelten, so dass in der Leber dieser Tiere Hepatozyten mit bzw. ohne Cx32-Expression auftreten sollten. Dies eröffnete die Möglichkeit, die Bedeutung des Cx32-Proteins bei der Hepatokanzerogenese innerhalb ein- und desselben Tiers zu analysieren. Für das Experiment wurden weibliche Cx32<sup>X/-</sup>-Tiere generiert und z.T. mit DEN behandelt. Die Bedeutung von Cx32 bei der Gewebemöostase im Normalgewebe sowie bei der Entstehung und dem Wachstum neoplastischer Läsionen wurde im Einzelnen untersucht (zur Verdeutlichung der experimentellen Vorgehensweise s. Abb. 3-4).



**Abbildung 3-4:** Experimentelle Vorgehensweise im Experiment II: Cx32<sup>Y/-</sup>-Männchen wurden mit Cx32-Wildtypweibchen verpaart und die Heterozygotie der F1-Weibchen bzgl. Cx32 durch DNA-Analyse überprüft. Ein Teil der Weibchen wurde im Alter von 12 bis 14 Tagen mit DEN behandelt und die Tiere zu verschiedenen Zeitpunkten getötet und untersucht.

### 3.2.1. Körper- und relatives Lebergewicht im Experiment II

Im Experiment II wurde ein Teil der Versuchstiere zwischen dem Tag 12 und 15 mit DEN (10µg/g K.G.) behandelt während ein anderer Teil unbehandelt blieb. Die Mäuse befanden sich zu Versuchsbeginn noch in der Wachstumsphase, worauf die zu Beginn steile und dann abflachende Zunahme des Körpergewichts zurückzuführen ist (s. Abb. 3-5). Bei den ausgewachsenen Tieren unterschied sich das Gewicht nur geringfügig. Die relativen Lebergewicht nahmen im Mittel (bis auf den ersten und letzten Untersuchungspunkt) leicht ab. Der hohe Wert bei Tieren der DEN-behandelten 41-Wochen-Gruppe spiegelt vermutlich das Auftreten neoplastischer Läsionen wieder. Ein signifikanter Einfluss der DEN-Behandlung auf Körper- und relatives Lebergewicht war nicht zu erkennen.



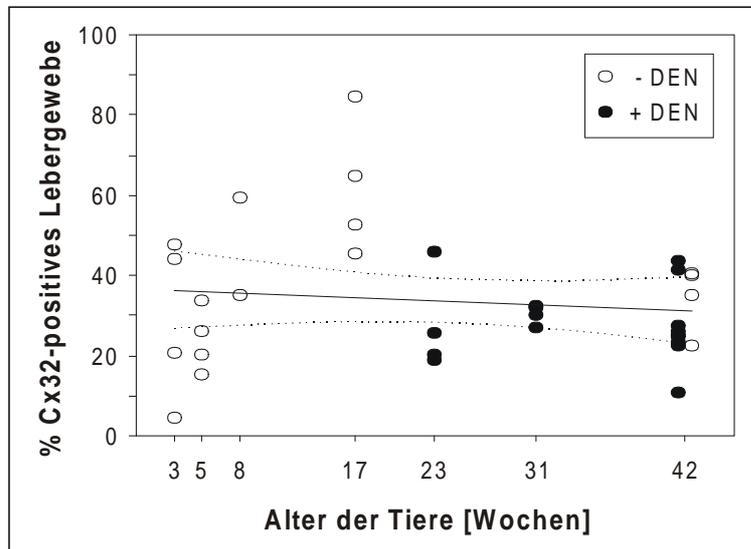
**Abbildung 3-5:** Entwicklung von Körper- und relativem Lebergewicht der Tiere im Experiment II. Ein Teil der Tiere wurde am Tag 12-15 mit DEN behandelt. Die 8-Wochenengruppe bestand nur aus 2 Tieren, daher ist keine Standardabweichung angegeben.

### 3.2.2. Mosaikartige Expression von Cx32 im Normalgewebe

Auftreten und Ausprägung des Cx32-Mosaizismus wurden durch immunhistochemische Färbung von Leberdünnschnitten analysiert. In reinrassigen Cx32-Wildtypweibchen (Cx32<sup>+/+</sup>) war das Protein in allen Hepatozyten sichtbar während, wie zu erwarten, in reinrassigen Cx32-Null-Mäusen (Cx32<sup>-/-</sup>) kein Cx32-Protein nachgewiesen werden konnte. Heterozygote Cx32<sup>+/-</sup>-Weibchen zeigten dagegen erwartungsgemäß ein Nebeneinander von Cx32-haltigen und Cx32-freien Arealen (s. Farbtafel A). Die Größe der jeweiligen Cx32-positiven und Cx32-negativen Areale war unterschiedlich und variierte von Versuchstier zu Versuchstier.

## Ergebnisse

Vorhergehende Untersuchungen an Cx32-Null-Mäusen wiesen auf eine deutlich erhöhte Zellteilungsrate in der Leber hin, ohne dass gleichzeitig eine Vergrößerung des Organs auftrat (Temme *et al.*, 1997). Hieraus lässt sich ableiten, dass die Neugeburt von Zellen und das Absterben von Zellen in der Leber der Cx32-Null-Mäuse wie in Cx32-Wildtyp-Mäusen ausbalanciert, wenn auch auf einem höheren Niveau abläuft. Bei gleichzeitiger Anwesenheit Cx32-positiver und Cx32-negativer Hepatozyten in Cx32<sup>X/-</sup>-Mäusen wäre denkbar gewesen, dass der Anteil Cx32-defizienter Hepatozyten in der Leber altersabhängig zunimmt. Zur Klärung dieser Frage wurden die Gewebsanteile beider Hepatozytenpopulationen in immunhistochemisch gefärbten Leberpräparaten ausgezählt. Die Ergebnisse sind in Abb. 3-6 dargestellt.



**Abbildung 3-6:** Prozentualer Anteil Cx32-positiver Hepatozyten im normalen Lebergewebe weiblicher Mäuse mit Cx32-Mosaizismus. Cx32-positive und Cx32-negative Hepatozyten wurden unter dem Mikroskop ausgezählt und ihr Verhältnis bestimmt. Jeder Punkt repräsentiert die Ergebnisse eines Tiers.

Der Anteil Cx32-immunhistochemisch-positiver Hepatozyten variierte beträchtlich zwischen den einzelnen Tieren. Eine altersabhängige Zunahme Cx32-negativer Hepatozyten sowie ein Einfluss von DEN auf die Gewebsverteilung waren nicht erkennbar. Im Mittel betrug der Anteil der Cx32-negativer Hepatozyten etwa 60 Prozent.

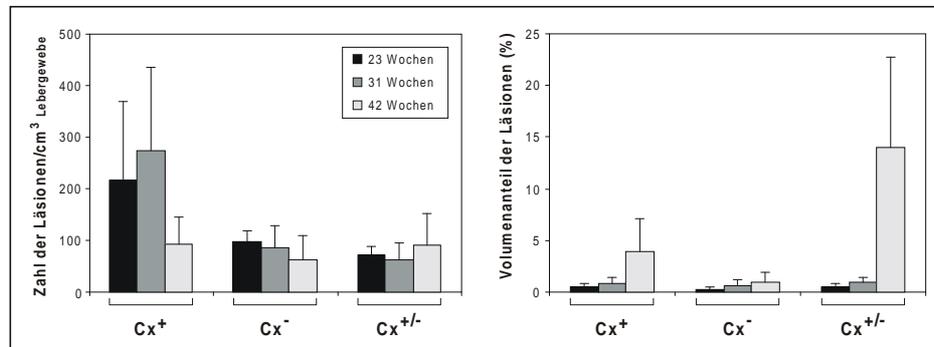
### 3.2.3. Cx32-Phänotyp präneoplastisch- und neoplastisch-veränderter Läsionen

In der Leber DEN-behandelter Mäuse war zu den späteren Untersuchungszeitpunkten das Auftreten präneoplastischer und neoplastischer Läsionen zu beobachten; diese wurden anhand des Markerenzym G-6-Pase identifiziert, welches in Tumoren und deren Vorläuferzellen in seiner Aktivität erniedrigt oder fehlend ist. Die Expression von Cx32-Protein wurde immunhistochemisch in Parallelschnitten sichtbar gemacht. Die Quantifizierung von Zahl und Größe der Läsionen erfolgte über morphometrische Verfahren

nach der Charakterisierung ihres Cx32-Status anhand der G-6-Pase-gefärbten Parallelschnitte, da bei dieser Färbung eine bessere Abgrenzung von Tumor- und Normalgewebe möglich war. Die so gewonnenen Daten bildeten die Grundlage für die sich anschließenden stereologischen Auswertungen bezüglich Zahl und Größe der Läsionen der verschiedenen Phänotypen.

Insgesamt konnten drei Herd-Phänotypen mit unterschiedlicher Cx32-Proteinausstattung identifiziert werden. Läsionen des ersten Phänotyps wiesen im Vergleich zu normalen Hepatozyten eine unveränderte oder homogen erhöhte Cx32-Expression mit identischer Membranlokalisation auf (s. Farbtafel B1). In Läsionen des zweiten Phänotyps war immunhistochemisch im Vergleich zum umliegenden Gewebe weniger Cx32 nachweisbar oder das Protein fehlte vollständig (s. Farbtafel B2). Läsionen des dritten Phänotyps zeigten unerwarteter Weise ein mosaikartiges Cx32-Expressionsmuster aus Cx32-negativen und darin eingebetteten Cx32-positiven Hepatozyten (s. Farbtafel B3).

Das Ergebnis der quantitativen Analyse zur Zahl und dem prozentualen Volumenanteil der Läsionen der verschiedenen Phänotypen in der Leber zu den drei Untersuchungszeitpunkten ist in Abb. 3-7 dargestellt.



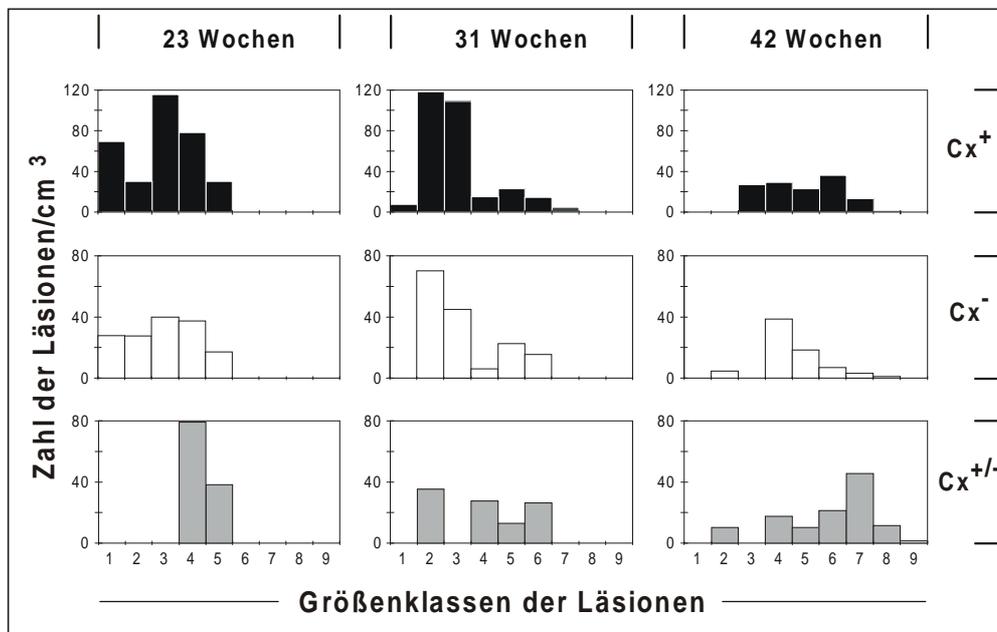
**Abbildung 3-7:** Zeitabhängige Veränderungen der Zahl und des Volumenanteils von Läsionen der verschiedenen Phänotypen. Die Säulen und Fehlerbalken zeigen Mittelwerte und Standardabweichungen. Die Zahl der analysierten Tiere betrug: 23 Wochen,  $n=4$ ; 31 Wochen,  $n=4$ ; 42 Wochen,  $n=5$ .

Die Zahl der Cx32-negativen Läsionen und der Läsionen mit mosaikartiger Cx32-Expression veränderte sich im Beobachtungszeitraum nicht signifikant; Cx32-positive Läsionen waren in der 23. und 31. Woche vergleichsweise häufig zu beobachten und wurden danach seltener. Prozentual ergab sich folgende Verteilung: 48% der Läsionen waren vom Cx32-positiven Phänotyp, 25% waren Cx32-negativ und 27% gehörten zur „gemischten“ Subpopulation.

## Ergebnisse

Bei den Cx32-positiven und den „gemischten“ Läsionen erhöhte sich ihr prozentualer Anteil am Lebergewebe mit zunehmendem Alter der Versuchstiere, wohingegen der Volumenanteil der Cx32-negativen Läsionen nicht signifikant zunahm (s. Abb. 3-7). Der Zuwachs zeigte sich jeweils am deutlichsten zum letzten Untersuchungszeitpunkt (42. Woche).

Die Analyse der Größenklassenverteilung erbrachte für die Zeitpunkte 23 und 31 Wochen nach der DEN-Behandlung keinen deutlichen Unterschied zwischen Läsionen der drei Phänotypen (s. Abb. 3-8). Mit steigendem Alter der Tiere (bzw. Zeit nach DEN-Gabe) verlagerte sich der Verteilungsschwerpunkt zu den Klassen mit größerem Durchmesser und die größten beobachteten Läsionen traten in der 42. Woche beim „gemischten“ Phänotyp auf.



**Abbildung 3-8:** Größenklassenverteilung neoplastischer Läsionen. Die Klassen steigen logarithmisch. Die Zahl der untersuchten Tiere betrug: 24 Wochen, n=4; 31 Wochen, n=4; 42 Wochen, n=5.

### 3.2.4. Analyse der c-Jun-Expression in Lebertumoren

Bei Annahme einer monoklonalen Entwicklung und stabiler Transmission von aktivem und inaktivem X-Chromosom sollte es Tumoren mit mosaikartiger Cx32-Expression nicht geben können. Da Läsionen dieses Phänotyps jedoch eindeutig nachweisbar waren, wurde nach Erklärungsmöglichkeiten für ihr Auftreten gesucht. Eine Erklärungsmöglichkeit bietet sich in der Annahme, dass in ansonsten negativen Läsionen normale Hepato-

zyten eingeschlossen sind, die dann natürlich Cx32-positiv sein sollten. Um diese Hypothese zu prüfen, wurden Serienschnitte immunhistochemisch für Cx32 und c-Jun-Protein gefärbt. Letzteres Protein lässt sich in einem Großteil der in der Mäuseleber auftretenden Läsionen immunhistochemisch nachweisen (Nakano *et al.*, 1994). Hierbei ist allerdings zweifelhaft, ob der verwendete Antikörper tatsächlich das Genprodukt des Transkriptionsfaktors c-Jun erkennt, da die immunhistochemische Färbung eine im wesentliche cytoplasmatische Lokalisation des Proteins zeigte. Da der Antikörper in normalen Hepatocyten jedoch kein Antigen erkennt, ist hier ein spezifischer Marker für präneoplastische bzw. neoplastische Hepatocyten verfügbar. Wie beispielhaft in Farbtafel C dargestellt ist, zeigte die immunhistochemische Parallelfärbung für Cx32 und c-Jun, dass Cx32-positive Zellen innerhalb von „gemischten“ Läsionen den Tumormarker c-Jun wie die Cx32-negativen Nachbarzellen des Tumors exprimierten.

### 3.2.5. Ki67-Markierungsindex in Tumoren mit mosaikartiger Cx32-Expression

Um Anhaltspunkte über das Proliferationsverhalten Cx32-positiver und –negativer Hepatocyten in „gemischten“ Läsionen zu erhalten, wurden Leberschnitte einer Cx32/Ki-67-Doppelfärbung unterzogen (siehe Farbtafel D). Ki-67 akkumuliert im Nucleus während aller Phasen des Zellzyklus außer der G<sub>0</sub>-Phase. Bei der Auswertung von insgesamt 18 Tumoren ergab sich für die Cx32-negativen Areale eine flächennormierte Häufigkeit Ki-67-positiver Kerne von 68,9/mm<sup>2</sup> +/- 31,4 (Mittelwert und Standardabweichung). Der entsprechende Markierungsindex für die Cx32-positiven Areale lag bei 76,2/mm<sup>2</sup> (+/- 49,9). Cx32-positive und –negative Hepatocyten in Läsionen mit mosaikartiger Expression scheinen demnach in etwa gleich schnell zu proliferieren.

## 3.3. **Experiment III: Phenobarbitalstudie**

Die meisten, wenn auch nicht alle Tumorpromotoren inhibieren die über *gap junctions* vermittelte interzelluläre Kommunikation (s. Einleitung), wobei die überwiegende Mehrzahl der verfügbaren Studien auf Zellkultursystemen beruht (zur Übersicht s. Klaunig, 1991; Swierenga und Yamasaki, 1992; Budonova, und Williams, 1994). Zu den untersuchten leberspezifischen Tumorpromotoren gehört das Antiepileptikum Phenobarbital. Ausgehend von der Hypothese, dass die tumorpromovierende Wirkung dieses Fremdstoffs auf einer Unterdrückung von GJIC beruht (zur Übersicht s. Trosko und Ruch, 1998; Yamasaki, 1990; Yamasaki und Naus, 1996), sollte die Promotionswirkung in Cx32-Null-Mäusen, bei denen GJIC zwischen Hepatozyten stark vermindert vorliegt,

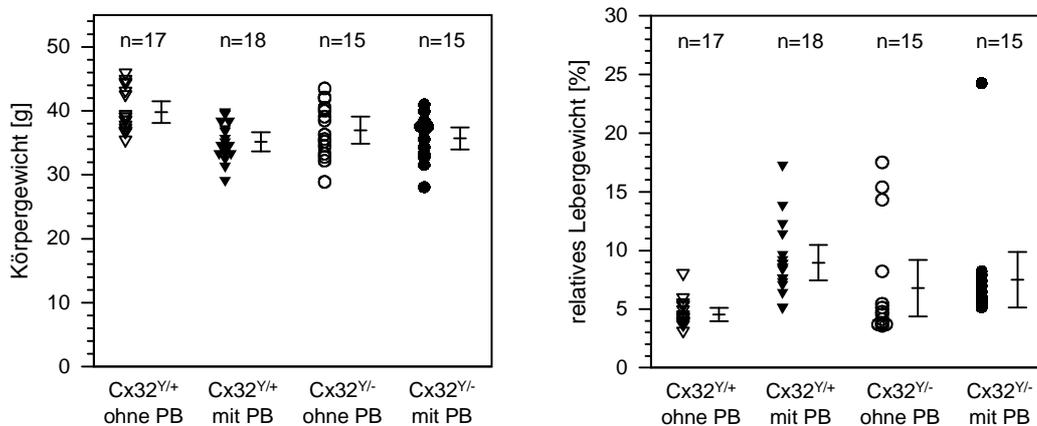
## Ergebnisse

nahezu nicht vorhanden sein. Diese These wurde mit einer Reihe zeitgleich durchgeführter Experimente geprüft. Hierzu wurden im ersten experimentellen Ansatz (Experiment IIIa) Cx32<sup>Y/+</sup>- und Cx32<sup>Y/-</sup>-Mäuse im Alter von 6 Wochen einmalig mit DEN behandelt und anschließend chronisch mit Phenobarbital in der Diät (bzw. dem entsprechenden Barbiturat-freien Kontrollfutter) nachbehandelt. In einem zweiten Ansatz (Experiment IIIb) wurde DEN an 15 Tage alte Mäuse der oben genannten Stämme appliziert und die Tiere anschließend mit Phenobarbital/Kontrolldiät nachbehandelt. Unter diesen Bedingungen wirkt das Barbiturat als Inhibitor der Hepatokanzerogenese. In beiden experimentellen Ansätzen wurde die kanzerogene Antwort in der Leber anhand der Entstehung G-6-Pase-defizienter Foci sowie anhand der Entstehung numerisch zählbarer Tumoren quantifiziert. Daneben wurden die Körper- und Organgewichte der Tiere bestimmt.

### 3.3.1. Experiment IIIa: Promotionsstudie

#### 3.3.1.1. Körper- und Lebergewichte im Experiment IIIa (Promotionsstudie)

Bei Versuchende, 36 Wochen nach Beginn der Phenobarbitalbehandlung, lag das durchschnittliche Körpergewicht der Tiere aller vier Versuchsgruppen (Cx32<sup>Y/+</sup> +/- Phenobarbital und Cx32<sup>Y/-</sup> +/- Phenobarbital) im gleichen Bereich (s. Abb. 3-9). Unterschiede ergaben sich bei Betrachtung des relativen Lebergewichtes. Bei Cx32<sup>Y/+</sup>-Mäusen kam es zu der erwarteten Erhöhung des relativen Lebergewichts bei den mit Phenobarbital behandelten Tieren (Students t-Test, zweiseitig  $p < 0,0001$ ). Dieser Effekt war bei Cx32<sup>Y/-</sup>-Mäusen nicht erkennbar.



**Abbildung 3-9:** Körper- und relatives Lebergewicht der Versuchstiere im Experiment IIIa. Die Marker repräsentieren jeweils ein Tier; über den Gruppen ist die Tierzahl angegeben, daneben zeigen Fehlerbalken die Mittelwerte und Standardabweichungen der jeweiligen Versuchsgruppe an.

Die Daten sind allerdings mit einer gewissen Vorsicht zu betrachten, da Veränderungen im relativen Lebergewicht durch Tumorbildung hervorgerufen sein können, wobei die Tumorantwort in den Phenobarbital-behandelten Cx32<sup>Y/+</sup>-Tieren am ausgeprägtesten war. So wiesen einzelne Tiere aufgrund von Tumorbildung extrem hohe rel. Lebergewichte auf (s. Abb. 3-9).

### 3.3.1.2. Kanzerogene Antwort im Experiment IIIa (Promotionsstudie)

#### 3.3.1.2.1. Tumorantwort

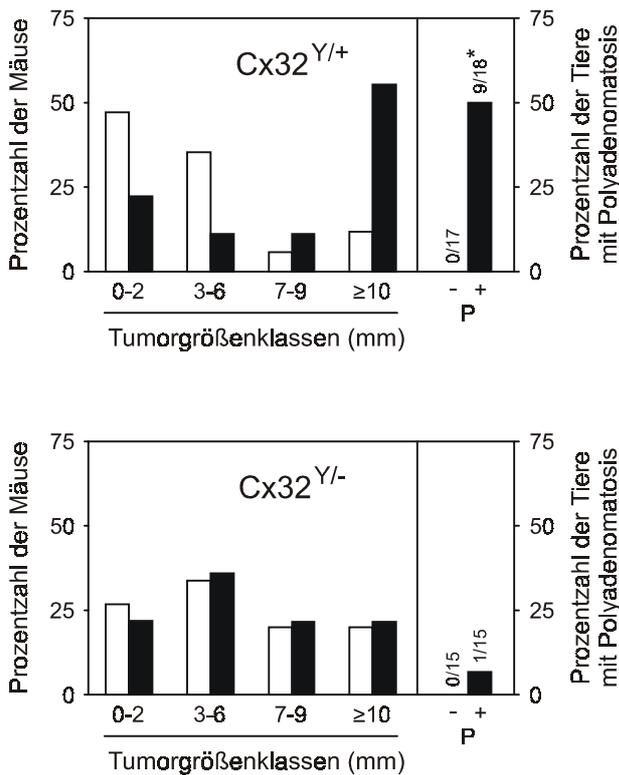
Als Parameter der kanzerogenen Antwort wurden nach dem Töten der Tiere und dem Freilegen der Leber zunächst die auf der Oberfläche des Organs sichtbaren Tumoren gezählt und ihrer Größe entsprechend klassifiziert. Einige der Lebern waren allerdings so stark von Tumoren durchsetzt, dass eine Zählung nicht mehr sinnvoll erschien; dieser Phänotyp wurde als „Polyadenomatosis“ eingestuft.

Bei Versuchende wurden zunächst folgende Tumorprävalenzen ermittelt: bei Cx32<sup>Y/+</sup> Kontrollmäusen (normale Diät) lag die Prävalenz an Lebertumoren bei 76% (13 von 17 Tieren hatten z.T. multiple Tumoren entwickelt); bei den mit Phenobarbital behandelten Tieren lag der Wert bei 94% (17 von 18 Tieren). Cx32<sup>Y/-</sup>-Kontrolltiere zeigten eine Tumorprävalenz von 87% (13 von 15) sowie von 100% in der entsprechenden Phenobarbitalgruppe (15 von 15).

Lebern mit dem Erscheinungsbild einer Polyadenomatosis wurden nur in Phenobarbital-behandelten Mäusen gefunden und ihre Häufigkeit unterschied sich signifikant ( $P < 0,01$ ) zwischen Cx32-Wildtyp- und -*Knockout*-Mäusen. 50% der Cx32<sup>Y/+</sup>-Mäuse wiesen das Erscheinungsbild einer Polyadenomatosis auf, aber nur 7% der Cx32<sup>Y/-</sup>-Mäuse zeigten eine derartig starke Tumorantwort (s. Abb. 3-10).

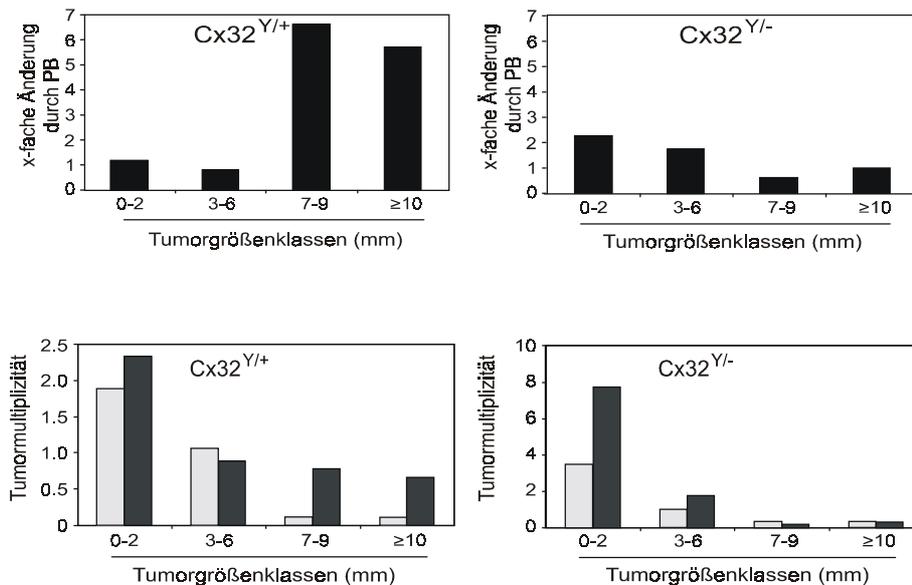
Bei Gruppierung der Mäuse nach dem größten im jeweiligen Tier gefundenen Tumor (s. Abb. 3-10) fielen von den nicht mit Phenobarbital behandelten Cx32<sup>Y/+</sup>-Kontrolltieren ~50% in die Kategorie mit Tumoren unter 2 mm Durchmesser und nur ~10% in die Kategorie mit Tumoren  $\geq 10$  mm. Umgekehrt wiesen bei den mit Phenobarbital behandelten Cx32<sup>Y/+</sup>-Mäusen ~55% Tumoren der Klasse  $\geq 10$  mm auf und lediglich ~20% fielen in den Bereich mit Tumoren unter 2 mm Durchmesser. Dieser durch Phenobarbitalbehandlung erzeugte Effekt trat bei den Tieren vom Cx32-Null Genotyp nicht auf (s. Abb. 3-10).

## Ergebnisse



**Abbildung 3-10:** Effekt von Phenobarbital auf die Tumorgößenklassenverteilung im Experiment IIIa (Promotionsstudie). In den Mäusen wurde zunächst der jeweils größte Tumor identifiziert, die Tiere entsprechend dieser Tumorgöße in die angegebenen Klassen eingeteilt und auf 100% (Gesamtheit der Tiere einer Gruppe) normiert. Betrachtet wurden nur Tiere ohne Polyadenomatosis (s. linker Teil der Abbildung). Im rechten Teil sind die prozentualen Häufigkeiten der Mäuse mit und ohne Polyadenomatosis (P) aufgeführt (Absolutzahlen sind ebenfalls angegeben). Weiße Säulen repräsentieren Tiere mit Kontrolldiät, schwarze Säulen stehen für Daten aus Phenobarbital-behandelten Tieren.

Bei Betrachtung der Multiplizität (mittlere Zahl an Tumoren/Maus der jeweiligen Gruppe) der nach Durchmesser klassifizierten Tumoren (s. Abb. 3-11) zeigte sich ein ähnliches Bild:



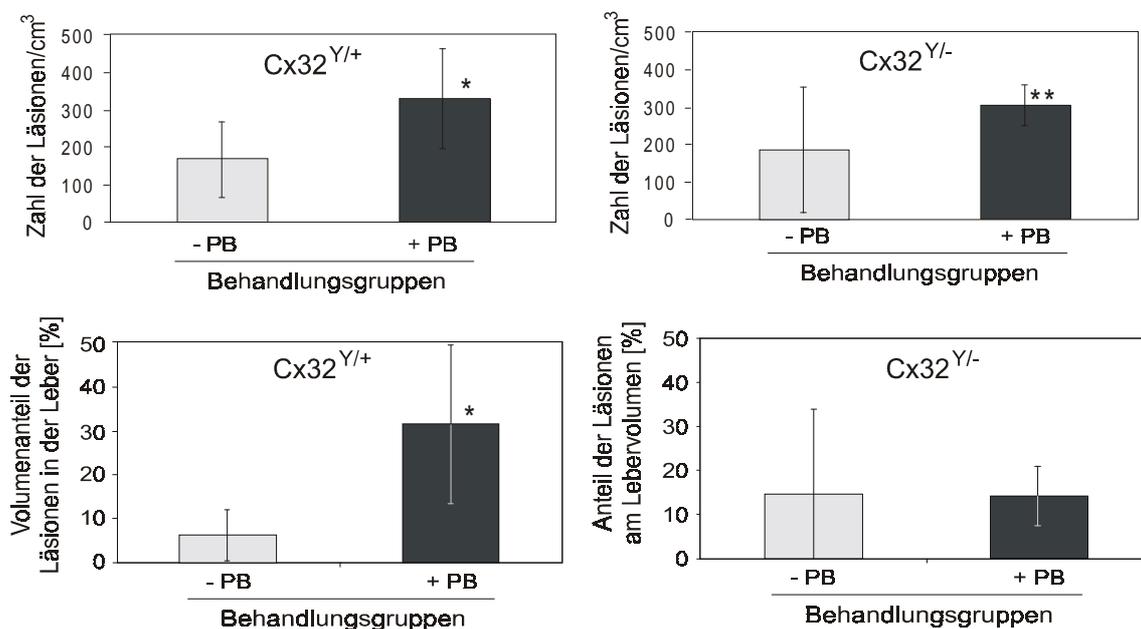
**Abbildung 3-11:** Effekt von Phenobarbital auf die Tumormultiplizität in Cx32-Wildtyp- und Cx32-Null Mäusen. Helle Balken stehen für Daten aus Tieren ohne PB-Behandlung, dunkle Balken für Daten aus Mäusen mit PB-Behandlung. Die Daten zeigen die Gesamtzahl der Tumoren je Größenklasse, geteilt durch die Zahl der Tiere je Gruppe. Mäuse mit

*Polyadenomatosis* wurden von der Analyse ausgeschlossen, da eine Quantifizierung nicht möglich war. Die Zahl der untersuchten Tiere betrug: Cx32<sup>Y/+</sup> minus PB, n=17; Cx32<sup>Y/+</sup> plus PB, n=9; Cx32<sup>Y/-</sup> minus PB, n=15; Cx32<sup>Y/-</sup> plus PB, n=14. X-fache Änderung gibt jeweils die Veränderung unter PB-Behandlung in Bezug auf die entsprechende Gruppe ohne PB-Behandlung an.

Unter Phenobarbital kam es bei den Cx32<sup>Y/+</sup>-Mäusen zu einer Versechsfachung bei den großen Tumoren (d.h. Durchmesser > 7 mm) im Vergleich zu nicht mit Phenobarbital behandelten Kontrollmäusen. Cx32<sup>Y/-</sup>-Mäuse zeigten dagegen keinerlei Anzeichen für eine derartige Beeinflussung durch Phenobarbital.

### 3.3.1.2.2. Glucose-6-Phosphatase-defiziente Foci

Anzahl und Größe von G-6-Pase-defizienten präneoplastischen und neoplastischen Läsionen konnten (analog zum im Experiment I beschriebenen Vorgehen) in 59 von 65 Mäusen quantifiziert werden. Die Häufigkeit der Läsionen war nach der Phenobarbital-Behandlung sowohl in Cx32<sup>Y/+</sup>-Mäusen als auch in Cx32<sup>Y/-</sup>-Tieren erhöht (s. Abb. 3-12).



**Abbildung 3-12:** Zahl/cm<sup>3</sup> und Volumenanteil (%) G-6-Pase-defizienter Läsionen in der Leber in Versuch IIIa. Helle Balken stehen für die Mittelwerte aus Tieren ohne PB-Behandlung, dunkle Balken für die Mittelwerte aus Mäusen mit PB-Behandlung; die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen. Die Zahl der untersuchten Tiere betrug: Cx32<sup>Y/+</sup> minus PB, n=16; Cx32<sup>Y/+</sup> plus PB, n=15; Cx32<sup>Y/-</sup> minus PB, n=13; Cx32<sup>Y/-</sup> plus PB, n=15. \*/\*\*signifikanter Unterschied zu den unbehandelten Mäusen: \* p=0.0003 bei Zahl/cm<sup>3</sup> und Volumenanteil (%) der Läsionen in der Leber von Cx32<sup>Y/+</sup>-Mäusen; \*\* p<0.02 bei der Zahl/cm<sup>3</sup> der Läsionen in der Leber von Cx32<sup>Y/-</sup>-Mäusen (Wilcoxon Rank Sum Test).

## Ergebnisse

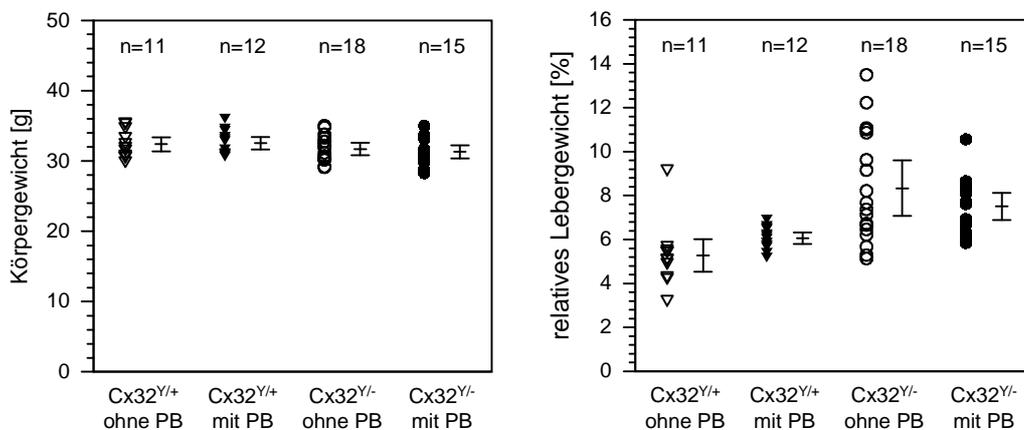
Bei Analyse des prozentualen Volumenanteils der enzymveränderten Läsionen zeigte sich bei Cx32<sup>Y/+</sup>-Tieren ein hoch-signifikanter ( $P = 0,0003$ ) fünffacher Anstieg durch Phenobarbital, wohingegen bei Cx32-defizienten Mäusen kein Unterschied zwischen behandelten und unbehandelten Tieren auftrat (s. Abb. 3-12).

### 3.3.2. Experiment IIIb: Inhibitionsstudie

Initiiert man Mäuse bereits im Säuglingsalter (12 bis 15 Tage nach der Geburt) und behandelt sie anschließend mit Phenobarbital, so wirkt dieses als Inhibitor der Hepatokarzinogenese, statt als Promotor. Ob dieser paradoxe Effekt durch Connexin32 beeinflusst werden kann, wurde in diesem Versuch untersucht. Hierzu wurden Cx32-Wildtyp- und Cx32-Null-Mäuse im Alter von 2 Wochen einmalig mit Diethylnitrosamin behandelt. Nach einem behandlungsfreiem Intervall von 2 Wochen erhielten jeweils die Hälfte der Tiere eine PB-haltige bzw. eine unveränderte Diät und nach 25 Wochen wurde die präneoplastische Antwort in der Leber anhand der Entstehung G-6-Pase defizienter Foci quantifiziert.

#### 3.3.2.1. Körper- und relatives Lebergewicht im Experiment IIIb (Inhibitionsstudie)

Das mittlere Körpergewicht der Tiere war in allen Versuchsgruppen in etwa gleich (s. Abb. 3-13). Die relativen Lebergewichte zeigten beim Vergleich von PB-behandelten und nicht PB-behandelten Tieren in Cx32<sup>Y/+</sup>-Mäusen einen leichten Anstieg unter PB.

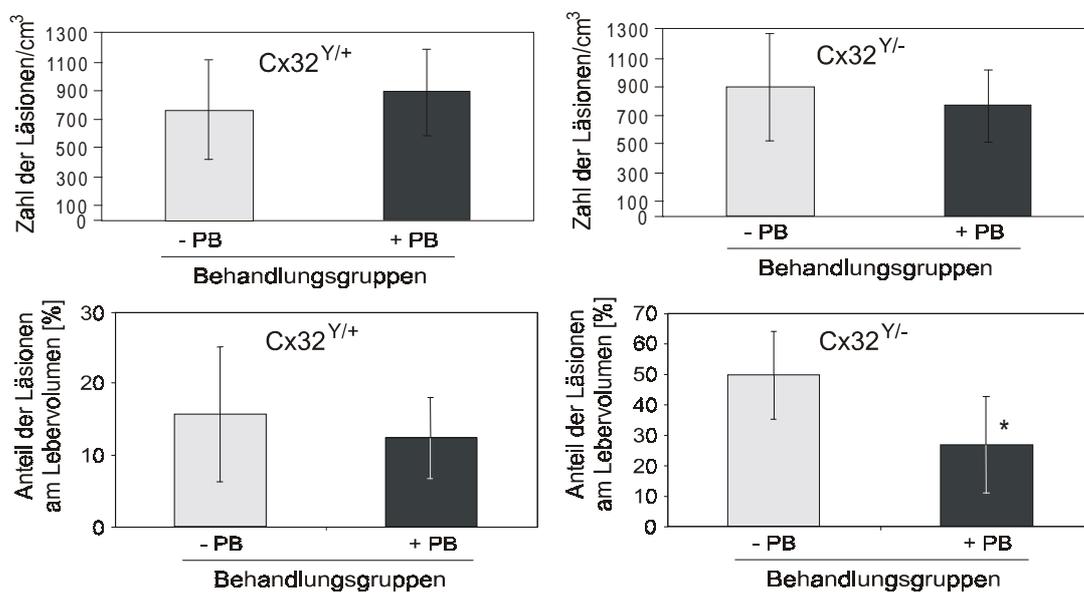


**Abbildung 3-13:** Körper- und relatives Lebergewicht der Versuchstiere im Experiment IIIb. Die Marker repräsentieren jeweils ein Tier; Über den Gruppen ist die Tierzahl angegeben, daneben zeigen Fehlerbalken die Mittelwerte und Standardabweichungen der jeweiligen Versuchsgruppe an.

In Cx32<sup>Y/-</sup>-Mäusen war dieser Effekt nicht sichtbar; allerdings ist hier das Auftreten von Tumoren in einigen der mit PB-behandelten Tiere als Störfaktor bei der Analyse zu berücksichtigen (s. Abb. 3-13).

### 3.3.2.2. G-6-Pase-defiziente Foci im Experiment IIIb (Inhibitionsstudie)

Der Versuchszeitraum im Experiment IIIb (Inhibitionsstudie) war kürzer als der im Experiment IIIA (Promotionsversuch), was zu einer insgesamt geringeren Tumorantwort führte. Die kanzerogene Antwort in diesem Experiment wurde daher ausschließlich anhand der Analyse G-6-Pase-defizienter Leberläsionen bestimmt. Analysiert wurde, wie im vorigen Experiment, die Zahl sowie der Volumenanteil enzymveränderter Foci in der Leber. Die Versuchsergebnisse sind in Abbildung 3-14 zusammengefasst. Phenobarbital hatte weder in Cx32<sup>Y/+</sup>- noch in Cx32<sup>Y/-</sup>-Mäusen einen signifikanten Einfluss auf die Häufigkeit der Läsionen (Zahl/cm<sup>3</sup> Lebergewebe). Der prozentuale Volumenanteil der Läsionen in der Leber war hingegen in beiden Stämmen nach der Phenobarbitalbehandlung erniedrigt; allerdings war dieser Effekt nur bei den Cx32-Wildtyptieren signifikant ( $P = 0,0007$ ).



**Abbildung 3-14:** Zahl/cm<sup>3</sup> und Volumenanteil (%) G-6-Pase-defizienter Läsionen in der Leber im Versuch IIIb. Helle Balken stehen für die Mittelwerte aus Tieren ohne PB-Behandlung, dunkle Balken für die Mittelwerte aus Mäusen mit PB-Behandlung; die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen. Die Zahl der untersuchten Tiere betrug: Cx32<sup>Y/+</sup> minus PB, n=10; Cx32<sup>Y/+</sup> plus PB, n=12; Cx32<sup>Y/-</sup> minus PB, n=18; Cx32<sup>Y/-</sup> plus PB, n=16. \*signifikanter Unterschied zu Cx32<sup>Y/-</sup>-Mäusen ohne PB-Behandlung beim Volumenanteil der Läsionen in der Leber ( $p=0.0007$ ; Wilcoxon Rank Sum Test).

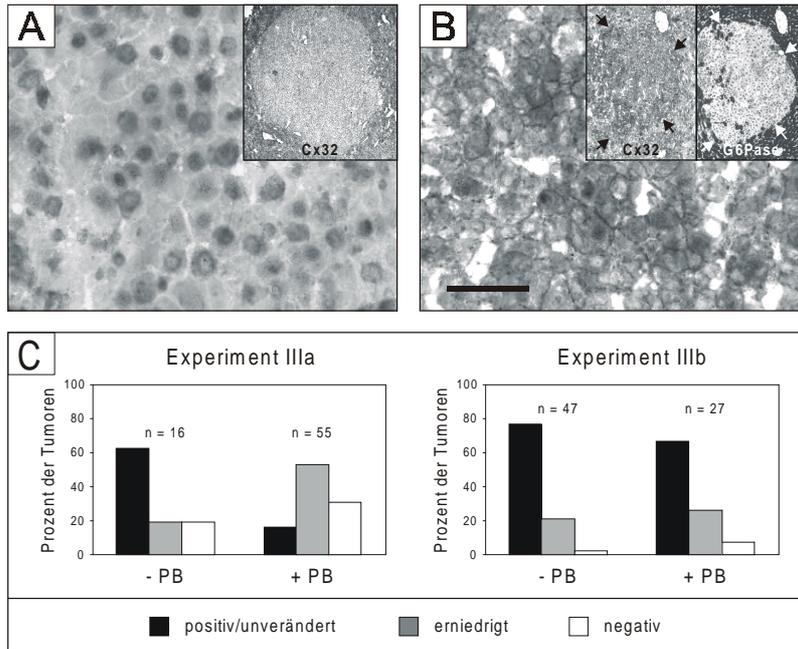
## Ergebnisse

In Tieren, die im adulten Alter mit DEN behandelt wurden (Experiment IIIa), war die Zahl der enzymveränderten Läsionen geringer als bei Tieren, die am Tag 12-15 mit DEN behandelt wurden (Experiment IIIb), obwohl die DEN-Dosis im Experiment IIIa 9-fach höher gewählt wurde. Die geringere Häufigkeit der Läsionen war mit einem ebenfalls geringem Volumenanteil der G-6-Pase-defizienten Herde in der Leber verknüpft (vergleiche Daten in Abbildung 3-12 und Abbildung 3-14). Diese Befunde lassen sich mit der höheren Kanzerogen-Empfindlichkeit der jungen Mäuse erklären, die vermutlich auf der höheren Proliferationsrate der Hepatozyten in diesem Entwicklungsstadium beruht (Vesselinovitch *et al.*, 1979).

### 3.3.3. Expression von Connexin32 im Lebernorgewebe sowie in Lebertumoren

Die Expression von Cx32 wurde auf Proteinebene immunhistochemisch unter Benutzung von anti-Cx32-Antikörpern analysiert. Leberschnitte von Cx32<sup>Y/+</sup>-Mäusen zeigten im Normalgewebe keinen Effekt von Phenobarbital auf die Expression oder intrazelluläre Lokalisation des Cx32-Proteins (siehe Farbtabelle E).

Lebertumoren der Cx32-Wildtypiere wiesen entweder eine verminderte bis negative Farbreaktion (siehe Abbildung 3-7A) oder eine unveränderte bis leicht verstärkte Färbung auf (siehe Abbildung 3-7B). Im Promotionsexperiment (Experiment IIIa) waren in der Cx32<sup>Y/+</sup>-Gruppe ohne Phenobarbitalgabe ~60% der Tumoren vom Phänotyp mit unveränderter bis leicht erhöhter Cx32-Expression während die verbleibenden ~40% ein Erscheinungsbild mit geringerer oder negativer Färbereaktion zeigten. Bei der mit Phenobarbital behandelten Gruppe war das Verhältnis umgekehrt: Weniger als ~20% der Tumoren waren positiv/unverändert in der Immunfärbung während die Mehrheit eine verminderte oder negative Färbereaktion zeigte. Derartige Effekte wurden im Experiment IIIb (Inhibitionsstudie) nicht gefunden. Die große Mehrheit der Tumoren zeigte hier eine positive/unveränderte Immunreaktion, sowohl bei den mit Phenobarbital behandelten als auch bei den unbehandelten Mäusen (s. Abb. 3-15 A bis C).



**Abbildung 3-15 A und B:** Cx32-Expression in Lebertumoren. Leberschnitte von Mäusen aus den Experiment IIIa und IIIb wurden immunhistochemisch für Cx32 gefärbt. **A.** Beispiel für einen Tumoranschnitt mit negativer Cx32-Immunreaktion; eingefügt ist die mikroskopische Aufnahme des Tumors bei niedrigerer Vergrößerung. **B.** Beispiel für einen Lebertumor mit positiver Cx32-Immunreaktion; eingefügt ist die mikroskopische Aufnahme des Cx32-gefärbten Tumoranschnitts bei niedrigerer Vergrößerung; ein G-6-Pase gefärbter Serienschchnitt ist zur besseren Orientierung mit dargestellt. Die Bilder wurden mit einem an das Mikroskop angeschlossenen Videokamerasystem aufgenommen; die Länge des Balkens entspricht 50µm. **C.** Häufigkeitsverteilung der Tumoren mit unterschiedlicher Cx32-Immunreaktion im Experiment IIIa und IIIb. Die Zahlen geben die Gesamtzahl der analysierten Tumoren in den entsprechenden Behandlungsgruppen an.

ung; ein G-6-Pase gefärbter Serienschchnitt ist zur besseren Orientierung mit dargestellt. Die Bilder wurden mit einem an das Mikroskop angeschlossenen Videokamerasystem aufgenommen; die Länge des Balkens entspricht 50µm. **C.** Häufigkeitsverteilung der Tumoren mit unterschiedlicher Cx32-Immunreaktion im Experiment IIIa und IIIb. Die Zahlen geben die Gesamtzahl der analysierten Tumoren in den entsprechenden Behandlungsgruppen an.

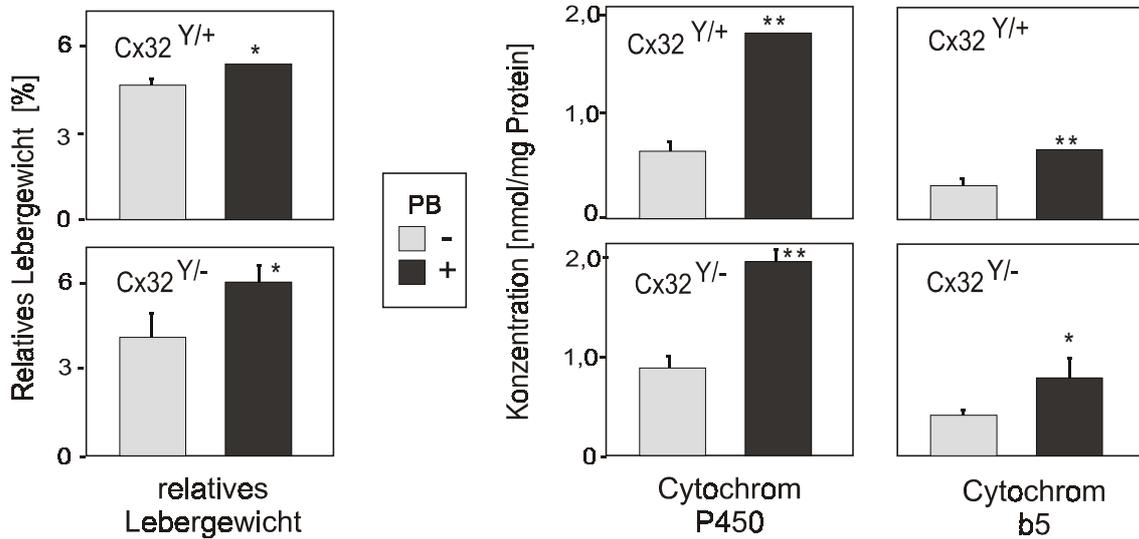
### 3.3.4. Effekt einer Kurzzeit-Phenobarbitalbehandlung auf die Lebergewichte sowie die Lebergehalte mikrosomaler Enzyme

Zu den klassischen Effekten von Phenobarbital zählt die Erhöhung des relativen Lebergewichts sowie die Induktion mikrosomaler fremdstoffmetabolisierender Enzyme. In den Experimenten IIIa und IIIb wurden bereits Daten zum Einfluss von Phenobarbital auf die Körpergewichts- und Lebergewichtsentwicklung bei chronischer Gabe des Barbiturats erhoben (s. Abbildungen 3-9 und 3-13). Die Beurteilung der hier beobachteten Effekte war jedoch durch die Tumorentwicklung in der Leber der behandelten Tiere erschwert. Aus diesem Grund wurde die lebervergrößernde Wirkung von Phenobarbital nochmals in einem separaten Kurzzeitversuch in Cx32<sup>Y/+</sup>- und Cx32<sup>Y/-</sup>-Mäusen untersucht. Darüber hinaus wurden die mikrosomalen Gehalte an Cytochrom P450 und Cytochrom b5 bestimmt. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 3-16 zusammengefasst.

Phenobarbital führte sowohl in Cx32<sup>Y/+</sup>-Mäusen als auch in Cx32<sup>Y/-</sup>-Mäusen zu einer signifikanten Zunahme des relativen Lebergewichtes. Die Phenobarbital-vermittelte Erhöhung dieses Parameters war in Cx32<sup>Y/-</sup>-Mäusen etwa doppelt so hoch wie in Cx32<sup>Y/+</sup>-Mäusen. Ähnlich wurde durch Phenobarbital in Mäusen beider Stämmen der mikrosoma-

## Ergebnisse

le Gehalt an Cytochrom P-450 und Cytochrom b<sub>5</sub> signifikant erhöht; hierbei lagen die Änderungen in der gleichen Größenordnung. Diese Ergebnisse zeigen, dass die physiologische Reaktion auf den Induktor Phenobarbital, die zu Leberhypertrophie und Induktion mikrosomaler Enzyme führt, nicht vom Connexindefekt beeinflusst wird.



**Abbildung 3-16:** Einfluss von Phenobarbital (PB) auf die relativen Lebergewichte sowie die mikrosomalen Gehalte an Cytochrom P450 (CYP450) und Cytochrom b<sub>5</sub> (CYPb5) in Cx32-Wildtyp- und Cx32-Null-Mäusen. Helle Balken stehen für die Mittelwerte aus Tieren ohne PB-Behandlung, dunkle Balken für die Mittelwerte aus Mäusen mit PB-Behandlung; die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen. Die Zahl der untersuchten Tiere betrug: Cx32<sup>Y/+</sup> minus PB, n=3; Cx32<sup>Y/+</sup> plus PB, n=2 (ein Tier konnte wegen eines spontanen Lebertumors nicht berücksichtigt werden); Cx32<sup>Y/-</sup> minus PB, n=3; Cx32<sup>Y/-</sup> plus PB, n=3. \*/\*\*signifikanter Unterschied zu der entsprechenden Kontrollgruppe: \* p < 0.05; \*\* p < 0.01 (Student's t-test).

## 4. Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Rolle von Cx32 bei der chemisch-induzierten Hepatokanzerogenese zu beleuchten. Hierbei bot sich die in der Arbeitsgruppe von Prof. K. Willecke, Humangenetik Bonn, entwickelte Cx32-Null-Maus als äußerst geeignetes Werkzeug zur Untersuchung an. Es wurden drei experimentelle Studien mit unterschiedlichen Fragestellungen durchgeführt, deren Ergebnisse oben dargestellt sind. Diese werden nachfolgend, entsprechend den drei Blöcken, diskutiert.

### 4.1. *Experiment I: Genetischer Hintergrund*

Die Ergebnisse der ersten experimentellen Studie zeigen, dass das Fehlen von funktionellem Cx32 das Wachstum enzymveränderter Foci in der Leber der Maus deutlich beschleunigt. Dies steht in Übereinstimmung mit früheren Arbeiten (Temme *et al.*, 1997) und unterstreicht die Bedeutung des potentiellen Tumorsuppressorproteins bei der negativen Regulation der Hepatokanzerogenese. Im Experiment wurde der Einfluss des Cx32-Gendefekts vor unterschiedlichem genetischen Hintergrund analysiert. Hierzu wurden zunächst Cx32 heterozygote Weibchen mit C3H- bzw. mit C57BL-Mäusen gekreuzt. Anschließend wurde der Kanzerogeneseprozess in den entstandenen F1-Hybriden (jeweils Cx32<sup>Y/+</sup> bzw. Cx32<sup>Y/-</sup>) vergleichend untersucht.

C3H-Mäuse zeichnen sich durch eine hohe, C57BL-Mäuse durch eine niedrige Hepatokanzerogenese-Suszeptibilität aus. Die genetische Basis dieser stammesspezifischen Unterschiede in der Tumorsuszeptibilität ist trotz intensiver Forschung noch nicht eindeutig geklärt. Mehrere Genloci, welche Tumoresistenz oder -suszeptibilität vermitteln, sind auf verschiedenen Chromosomen kartiert worden (Drinkwater und Bennett, 1991; Drinkwater, 1994; Drinkwater und Ginsler, 1986, Dragani *et al.*, 1995; Manenti *et al.*, 1995; Balmain und Nagase, 1998). Durch Kanzerogene wie DEN werden Leberläsionen in den empfindlichen C3H-Mäusen und den resistenten C57BL-Mäusen in etwa gleichem Umfang induziert, weisen aber unterschiedliche Wachstumseigenschaften auf (Drinkwater, 1994; Dragani, 1994), ein Phänomen, das sich auch in diesem Experiment beobachten ließ. Die erhöhte Geschwindigkeit des Tumorwachstums in der Leber von C3H-Mäusen geht mit einer erhöhten DNS-Syntheserate im normalen Lebergewebe im Vergleich zu der in resistenten C57BL-Mäusen einher (Hanigan *et al.*, 1988). Möglicherweise besteht also zwischen der Proliferationsrate im Lebernorgangewebe und der Tumorsuszeptibilität in diesem Organ ein Zusammenhang.

Die Daten dieser Arbeit zeigen nun, dass der Cx32-Gendefekt in der Leber der F1-Hybride beider Stämme zu einer verstärkten kanzerogenen Antwort führt. Das bedeutet zunächst, dass sich der Verlust der tumorsupprimierenden Funktion von Cx32 auch in der „repressiven“ genetischen Umgebung des C57BL-Genoms ausprägt. Gemessen am Volumenanteil enzymveränderten Gewebes in der Leber sogar war bei Vergleich der beiden F1-Stämme der steigernde Effekt des Cx32-Verlusts in den C57BL-Abkömmlingen stärker ausgeprägt. Absolut gesehen war allerdings die Kanzerogeneantwort in den Cx32<sup>Y/-</sup>-C3H-F1-Hybriden – wiederum gemessen am Volumenanteil G-6-Pase-defizienten Gewebes – mit Abstand am stärksten. Da der Cx32-Gendefekt die Leberkrebsentwicklung in Mäusen mit entsprechender Prädisposition weiter verstärkt, stellen Cx32-Null-C3H-Mäuse potentiell ein empfindliches Werkzeug zur Detektion von Leberkrebs-auslösenden Chemikalien dar.

Alle bisher in der Maus bekannten Gene mit Einfluss auf die Hepatokanzerogenese, sei er hemmend oder fördernd, liegen auf Autosomen (s. Übersichtsartikel von Balmain und Nagase, 1998). Cx32 hingegen wird X-chromosomal codiert und nimmt somit als derzeit einziges bekanntes Hepatokanzerogenese-beeinflussendes Gen auf einem Geschlechtschromosom eine Sonderrolle ein.

### **4.2. Experiment II: Mosaik-Expression von Cx32**

In Cx32-Wildtyp bzw. Cx32-Null-Mäusen sind alle Hepatozyten des jeweiligen Organs entweder vom einen oder vom anderen Genotyp. Hieraus resultiert ein einheitlicher Cx32-positiver oder Cx32-negativer Phänotyp. Das Ziel der zweiten experimentellen Studie war, zu überprüfen, wie der Hepatokanzerogeneseprozess in einer Leber mit mosaikartiger Expression des Cx32-Proteins verläuft. Hierbei wurde ausgenutzt, dass das Cx32-Gen auf dem X-Chromosom lokalisiert ist und somit in weiblichen Tieren der X-chromosomalen Inaktivierung unterliegt. Da der Inaktivierungsprozess während der frühen Embryonalentwicklung abläuft, jeweils entweder das eine oder das andere X-Chromosom betrifft und bei der Zellteilung stabil an die Tochterzellen vererbt wird, war in weiblichen Cx32<sup>+/-</sup>-Mäusen das mosaikartige Auftreten von Cx32-exprimierenden Hepatozyten (bei Expression des Wildtyp-Allels) und Cx32-defizienten Hepatozyten (bei Expression des Null-Allels) zu erwarten, wie es auch tatsächlich nachgewiesen werden konnte.

Im Lebernorgalgewebe zeigten die immunhistochemischen Färbungen große interindividuelle Schwankungen in den Anteilen Cx32-negativen und Cx32-positiven Gewebes. Im Durchschnitt aller Tiere lag der Anteil des Cx32-positiven Gewebes bei 40% und der des

Cx32-negativen Gewebes bei 60%. Keine bevorzugte Expression des maternalen oder paternalen Allels vorausgesetzt, wäre ein 1/1 Verhältnis zu erwarten gewesen. Die vorliegende Abweichung von diesem theoretischen Wert könnte durch eine bevorzugte Inaktivierung des paternalen Cx32<sup>Y/-</sup>-Allels zustande gekommen sein. Wahrscheinlicher ist allerdings die Möglichkeit, dass nur schwach positiv gefärbte Zellen beim Auswertungsprozess falsch klassifiziert wurden. Allerdings könnten Hepatozyten mit fehlender Cx32-Expression einen Proliferationsvorteil besitzen. Eine frühere Studie (Temme *et al.*, 1997) zeigte in Hepatozyten von weiblichen Cx32-Null-Mäusen einen S-Phase-spezifischen 10-fach höheren 5-Bromdesoxyuridineinbau in DNA im Vergleich zu Daten aus den entsprechenden Wildtyptieren; ein Hinweis auf erhöhte Zellproliferation. Im vorliegenden Experiment mit Cx32<sup>+/-</sup>-Weibchen wurde die Replikation der Hepatozyten nicht direkt bestimmt; dennoch lässt sich ein Proliferationsvorteil bei fehlender Cx32-Expression nicht erkennen. Anderenfalls hätte sich im Lebergewebe ein altersabhängig anwachsender Anteil Cx32-negativer Zellen auf Kosten Cx32-positiver Zellen zeigen müssen. Möglicherweise geht die erhöhte Zellproliferation in Cx32-negativen Hepatozyten mit einer entsprechend erhöhten Zelltodesrate (Apoptoserate) einher. Alternativ ist ein negativ-regulativer Einfluss der Cx32-exprimierenden Zellen auf die Proliferation ihrer Cx32-negativen Nachbarzellen denkbar.

Im Kanzerogeneseexperiment wurden Läsionen dreier verschiedener Phänotypen beobachtet: Kleinere Läsionen zeigten entweder unveränderte bis leicht erhöhte Cx32-Expression (im Vergleich zu Cx32-positiven Hepatozyten im Normalgewebe) oder keine Cx32-Expression. Größere Läsionen zeigten dagegen häufig einen gemischten Phänotyp aus eindeutig Cx32-negativen Hepatozyten und eingesprenkelten Bereichen mit eindeutig Cx32-exprimierenden Hepatozyten. Die ersten beiden Phänotypen können als klonale Nachkommen von Hepatozyten, die entweder das maternale (Cx32<sup>+</sup>) oder paternale (Cx32<sup>-</sup>) Allel exprimieren, betrachtet werden. Die Existenz des Mosaik-Phänotyps hingegen war unerwartet, da verschiedenste Studien gezeigt haben, dass Lebertumoren in Nagern monoklonalen Ursprungs sind (Rabes *et al.*, 1982; Williams *et al.*, 1993; Bauer-Hoffmann *et al.*, 1992). Unter der Voraussetzung, dass ein einmal etabliertes X-chromosomales Inaktivierungsmuster in Hepatozyten an die Nachfolgezellen weitergegeben wird (s.o.), sollte es keine klonal gewachsene Tumoren gemischten Phänotyps geben. Da Cx32-positive Hepatozyten in Tumoren mit mosaikartiger Expression des Connexins eine positive Immunreaktion für den Tumormarker c-Jun zeigten, konnte die Möglichkeit ausgeschlossen werden, dass es sich bei den positiven Hepatozyten um versprengte Normalzellen handelt. Mosaikartige Expression des Cx32-Gens würde auch entstehen, wenn Cx32-positive und Cx32-negative Tumoren zu späteren Phasen nach

ihrer Entstehung verschmelzen würden. Diese Möglichkeit lässt sich für den Einzelfall nicht mit Sicherheit widerlegen; es gibt aber zwei gewichtige Gegenargumente gegen die Annahme, dass diese Entstehungsmöglichkeit mosaikartiger Expression von Cx32 in Tumoren den Regelfall darstellt: 1.) Die Wahrscheinlichkeit einer Verschmelzung zu den frühen Versuchszeitpunkten, bei denen bereits Tumoren mit mosaikartiger Expression beobachtet wurden, ist gering, da die Zahl der Mosaik-Läsionen unter  $100/\text{cm}^3$  Lebergewebe und ihr Anteil am Lebergewebe unter 5% lag. 2.) Das bei einer Verschmelzung von Läsionen zu erwartende histologische Erscheinungsbild wich von dem mehrheitlich vorgefundenem Erscheinungsbild der Läsionen deutlich ab.

Denkbar, aber unbewiesen, ist eine dritte Möglichkeit. Ausgehend von einem klonalen Wachstum ursprünglich homogen-Cx32-negativer Läsionen könnte es während des Wachstums der Läsionen in einem Teil der Hepatozyten zur Reaktivierung des zweiten, normalerweise stillen Cx32-Wildtyp-Allels kommen. Der umgekehrte Fall einer Reaktivierung des Cx32<sup>-</sup>-Allels in Cx32-exprimierenden Hepatozyten wäre ebenso denkbar, aber bei der angewandten Methodik nicht detektierbar. Die 5'-regulativen Sequenzen transkriptionell stiller, X-inaktivierter Gene sind normalerweise hypermethyliert, wohingegen aktive Allele eine Hypomethylierung aufweisen (Tribioli *et al.*, 1992). Globale Hypomethylierung ist ein in Tumorzellen häufig beobachtetes Phänomen (Laird *et al.*, 1996) und kann potentiell zur Reaktivierung X-chromosomal lokalisierter Gene in einer Subpopulation der Tumorzellen führen, was einen mosaikartigen Phänotyp in den betroffenen Läsionen erzeugen würde.

Unter der Annahme, dass Läsionen vom Cx32-Mosaikphänotyp aus ursprünglich Cx32-negativen Läsionen hervorgegangen sind und daher mit den negativen Läsionen gemeinsam betrachtet werden können, wird ein selektiver Proliferationsvorteil für Cx32-negative Tumorzellen erkennbar. Der gemeinsame Volumenanteil Cx32-negativer und Cx32-„gemischter“ Läsionen in der Leber überwog bei weitem den entsprechenden Anteil Cx32-positiver Läsionen. Die Annahme, dass Läsionen mit mosaikartiger Expression aus Cx32-negativen Läsionen hervorgegangen sind, wird durch die Beobachtung gestützt, dass die Summe der Zahl beider Läsionen mit 52% ungefähr der Zahl der Cx32-positiven Läsionen (48%) entspricht. Ein derartiges Verhältnis würde erwartet, wenn alle Läsionen klonal von entweder Cx32-exprimierenden oder Cx32-nicht-exprimierenden normalen Hepatozyten abstammten, diese in einem 1/1 Verhältnis in der Leber vorliegen und die Initiationswahrscheinlichkeit in beiden Hepatozyten-Phänotypen gleich hoch wäre.

Der Verlust der Cx32-Funktion, entweder durch funktionale Disregulation des Gens (zur Übersicht siehe Yamasaki *et al.*, 1996), oder durch *knockout* des Gens (Temme *et al.*,

1997; Moennikes *et al.*, 1999) verstärkt die Tumorgenese in der Leber und zeigt somit die Tumorsuppressorfunktion des Cx32-Proteins. Die Ergebnisse von Experiment II stimmen hiermit überein, indem sie darauf hinweisen, dass neoplastische Klone welche von Cx32-negativen Hepatozyten abstammen, vermutlich schneller wachsen als Klone, die von Cx32-expimierenden Hepatozyten abstammen. Die Analyse des Ki-67-Markierungsindex, ein Maß für Zellproliferation, in Läsionen mit mosaikartiger Cx32-Expression zeigte allerdings keine signifikanten Unterschiede zwischen Cx32-negativen und -positiven Hepatozyten. Dies bedeutet, dass die (Re-)Expression von Cx32 in Hepatozyten der Mosaikläsionen keinen Wachstumsnachteil vermittelt. In den Läsionen mit mosaikartiger Cx32-Expression könnte die GJIC in den Cx32-positiven Zellen durch funktionelle Inaktivierung vermindert sein. Alternativ könnte die häufig inselartige Lage der Cx32-positiven Zellen innerhalb der umliegenden negativen Zellen des Tumors den Empfang wachstumshemmender Signale ausgehend vom Normalgewebe verhindern (siehe Farbtafel B). Unter diesen Bedingungen könnte es zur gleichartigen Promotion der klonalen Expansion der Cx32-positiver und –negativer Tumorzellen in Tumoren mit mosaikartiger Expression von Cx32 kommen, da - bei möglicherweise vorhandener homologer Kommunikation der Tumorzellen untereinander - die heterologe Kommunikation der Tumorzellen zu den umliegenden Normalzellen teilweise oder vollständig unterbrochen ist.

#### **4.3. Experiment III: Phenobarbitalstudie**

Ziel der dritten tierexperimentellen Studie war, den Einfluss von Cx32 während der Promotionsphase der Hepatokanzerogenese näher zu charakterisieren.

Ausgangspunkt war die durch zahlreiche Studien belegte Tatsache, dass Tumorpromotoren die über *gap junctions* vermittelte Kopplung zwischen benachbarten Zellen (GJIC) zu inhibieren vermögen (zur Übersicht s. Fitzgerald und Yamasaki, 1990; Mesnil und Yamasaki, 1993 und Trosko *et al.*, 1982). Zu diesen gehört u.a. das Barbiturat Phenobarbital, welches in der Nagerleber in höherer Dosierung tumorpromovierend wirksam ist und häufig als Modell-Tumorpromotor eingesetzt wird. Weitere wirksame Verbindungen finden sich z.B. in der Gruppe der Organochlor-Insektizide (Krutovskikh *et al.*, 1995). Die überwiegende Zahl an Studien zur Inhibition der GJIC wurde in Zellkultursystemen durchgeführt. In diesen Studien wurden z.B. niedermolekulare Fluoreszenzfarbstoffe in einzelne Zellen mikroinjiziert und die Diffusion in benachbarte Zellen bestimmt. Bei diesen Analysen zeigte sich, dass zahlreiche Tumorpromotoren, wenn auch nicht alle, GJIC blockieren (zur Übersicht s. Swierenga *et al.*, 1992; Budunova *et al.*, 1994). Darüber hin-

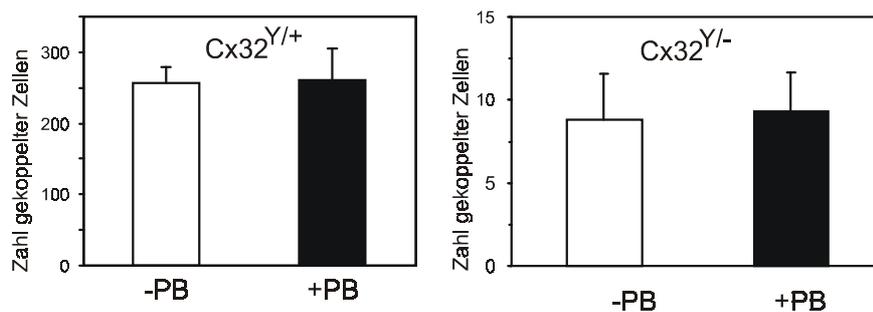
aus gibt es eine limitierte Zahl an Untersuchungen zur Hemmung von GJIC durch Tumorpromotoren *in vivo* (zur Übersicht siehe Yamasaki und Naus, 1996). So konnte unter anderem gezeigt werden, dass die Zahl der durch Immunhistochemie nachweisbaren Cx32-positiven *plaques* in der Rattenleber unter einer Behandlung mit Phenobarbital und anderen Promotoren erniedrigt ist, was vermutlich zu einer Reduktion der GJIC führt (Neveu *et al.*, 1990). Direkte Bestimmungen zur Beeinflussung der GJIC *in vivo* liegen ebenfalls vor (Krutovskikh *et al.*, 1991).

Aus der Beobachtung, dass Tumorpromotoren GJIC hemmen können, entwickelte sich die generelle Hypothese, dass Suppression der interzellulären Kommunikation ein Schlüsselereignis bei der klonalen Expansion potentieller Tumorzellen unter dem Einfluss promovierender Agenzien darstellt (Yamasaki, 1990 und 1995; Yamasaki und Naus, 1996; Trosko und Chang, 1992; Trosko und Ruch, 1998). Die zugrunde liegenden Moleküle, die über *gap junctions* transportiert werden und den Selektionsdruck bei der klonalen Expansion vermitteln, sind nicht bekannt. Grundsätzlich gibt es zwei Möglichkeiten: Entweder sind normale Zellen, die über *gap junctions* mit Tumorzellen oder Tumovorläuferzellen verbunden sind, in der Lage, an ihre Nachbarzellen zellteilungshemmende oder apoptoseinduzierende Signale zu übermitteln und die transformierten Zellen so in ihrer Proliferation zu limitieren. Hemmung der GJIC würde diese Signalkette unterbrechen. Alternativ könnten aus transformierten Zellen über *gap junctions* aberrant gebildete Moleküle in die umgebenden Nachbarzellen diffundieren, die bei Abschalten der GJIC in den Ausgangszellen akkumulieren und so deren Proliferation fördern. Da GJIC an die Anwesenheit funktioneller Connexine gebunden ist, war es naheliegend zu überprüfen, ob der Promotionseffekt von Phenobarbital in der Nagerleber in Cx32-defizienten Mäusen in gleicher oder verminderter Stärke wie in Cx32-Wildtyp Mäusen vorliegt. Diese Hypothese wurde im Experiment IIIa getestet.

Die Ergebnisse der experimentellen Studie zeigen nun eindeutig, dass der Promotionseffekt von PB an die Anwesenheit von Cx32 in der Leber gebunden ist. In Cx32-Wildtyp-Mäusen kam es unter der Behandlung mit Phenobarbital zu einem beschleunigten Wachstum G-6-Pase-defizienter Leberläsionen und einer Erhöhung der Zahl an sichtbaren und zählbaren Tumoren. Darüber hinaus wiesen PB-behandelte Cx32<sup>Y/+</sup>-Mäuse häufig das Erscheinungsbild einer „Polyadenomatosis“ auf, antworteten also sehr stark auf den promovierenden Effekt der PB-Behandlung. Die naheliegende Vermutung wäre, dass der Promotionseffekt durch PB in den Cx32-Wildtyp-Mäusen in einer Hemmung der GJIC zwischen Hepatozyten zu suchen ist; in Cx32-Null-Mäusen könnte ein derartiger Effekt nicht oder nur geringfügig auftreten, da GJIC aufgrund des fehlenden Connexins a priori vermindert sein sollte. In der Tat wurde in der Leber von Cx32-Null-Mäusen bei

elektrophysiologischen Messungen eine um über 80% erniedrigte GJIC nachgewiesen (Valiunas *et al.*; 1999).

Um den Einfluss von PB auf die GJIC in der Leber von Cx32-Wildtyp-Mäusen zu bestimmen, wurde in Zusammenarbeit mit Herrn A. Romualdi aus der Arbeitsgruppe von Prof. Willecke in Bonn eine Kopplungsanalyse durchgeführt. Gemessen wurde in dieser Studie der Transfer eines mikroinjizierten Fluoreszenzfarbstoffs in Leber-Dickschnitten. Die Ergebnisse der Studie zeigten nicht das erwartete Bild: Unter der Behandlung mit PB kam es im Lebergewebe zu keiner Erniedrigung der GJIC zwischen Hepatozyten. Auch in Cx32-Null-Mäusen, welche in Hepatozyten nur noch Cx26 exprimieren, wurde die GJIC durch PB nicht vermindert. (s. Abb. 4-1). Parallel durchgeführte eigene Studien, in denen die Expression von Cx32 durch Immunhistochemie analysiert wurde, ergaben analoge Ergebnisse: So konnte keine Veränderung in der Expression und der intrazellulären Verteilung von Cx32 in Lebern PB-behandelter Wildtypmäuse beobachtet werden.



**Abbildung 4-1:** Farbstofftransfer in normalem Lebergewebe. Alexa Fluor 488 Fluoreszenzfarbstoff wurde iontophoretisch in 250  $\mu\text{m}$  dicke Leberschnitte von unbehandelten und PB-behandelten Mäusen (0.05% im Futter über 2 Wochen, jeweils  $n = 4$ ) injiziert und die GJIC als Farbstoffausbreitung in die Nachbarzellen bestimmt. Säulen und Fehlerbalken repräsentieren Mittelwerte und Standardabweichungen. Zu beachten ist die unterschiedliche Skalierung der Y-Achsen in den Experimenten mit Cx32<sup>Y/+</sup> und Cx32<sup>Y/-</sup>-Mäusen.

Diese Ergebnisse stehen nicht im Einklang mit Befunden an der Rattenleber, in der PB zu einem eingeschränkten Farbstofftransfer über gap junctions und zu einer erniedrigten Cx32-Expression (nachgewiesen durch Immunhistochemie) führt; Studien mit primären Mäusehepatozyten in Kultur zeigten ebenfalls eine teilweise Hemmung der GJIC durch PB (Sugie *et al.*, 1987; Krutovskikh *et al.*, 1995; Ito *et al.*, 1998; Ruch *et al.*, 1987). Der Grund für diese Unterschiede ist nicht bekannt. Möglicherweise spielen Speciesunterschiede sowie in vitro/in vivo-Unterschiede eine Rolle. Letztlich könnte jedoch die Frage der Beeinflussung der GJIC im Lebernormalgewebe von untergeordneter Bedeutung sein: Die normalen Hepatozyten sind ja vermutlich nicht die eigentlichen Zielzellen der

tumorpromovierenden Effekte von PB sondern die präneoplastisch- und neoplastisch veränderte Hepatozytenpopulation.

Während PB im normalen Lebergewebe von Cx32<sup>Y/+</sup>-Mäusen weder die Cx32-Expression noch die GJIC beeinflusste, führte das Barbiturat zu einer signifikanten Erhöhung des Anteils an Tumoren mit geringerer oder fehlender Cx32-Expression. Ähnliche Ergebnisse wurden in einer vergleichbaren Studie mit B6C3F1-Mäusen erhalten (Klaunig *et al.*, 1991). In der vorliegenden Studie war dieser Effekt allerdings nur im Experiment IIIa, in dem PB die Hepatokanzerogenese promovierte, nicht dagegen im Experiment IIIb, in welchem PB den Kanzerogeneseprozess eher inhibierte, nachzuweisen. Diese Befunde deuten zunächst darauf hin, dass eine Verminderung in der Expression von Cx32 (und damit vermutlich in der GJIC) nicht eine grundsätzliche Konsequenz einer PB-Behandlung ist. Umgekehrt ist bemerkenswert, dass eine deutliche Erhöhung in der Zahl an Tumoren mit verminderter/fehlender Cx32-Expression in der Leber von Tieren nur unter den Bedingungen zu beobachten ist, unter denen das Barbiturat als Tumorpromotor wirksam ist. Hierfür gibt es zwei mögliche Erklärungen: 1) Die Absenkung von Cx32 könnte die Folge erhöhter Zellteilungsraten in Tumoren unter Promotionsbedingungen sein. In diese Richtung gehen z.B. Befunde, die zeigen, dass Cx32 in der Leber nach Setzen eines starken Proliferationsreizes, ausgelöst durch partielle Hepatektomie, negativ reguliert wird (Traub *et al.*, 1983; Neveu *et al.*, 1995; Tsuda *et al.*, 1995; Yamasaki *et al.*, 1999). 2.) Die Verminderung in der Expression von Cx32 könnte Ursache einer positiven Selektion für Cx32-negative Tumorzellen sein und zu deren gesteigerter Proliferation direkt oder indirekt beitragen. Grundlage könnte eine Störung der GJIC zwischen den Tumorzellen selbst (homologe Kommunikation) oder eine Störung der GJIC zwischen den Tumorzellen und den umliegenden Normalzellen (heterologe Kommunikation) sein (Yamasaki, 1990 und 1995, Yamaski und Naus, 1996).

Im Prinzip wäre darüber hinaus noch eine dritte Möglichkeit nicht völlig auszuschließen, nämlich, dass Tumorpromotion durch PB und eine Störung der GJIC keine gekoppelten Prozesse darstellen. Da sich Cx32-Null-Mäuse als praktisch resistent gegenüber einer Tumorpromotion durch PB erwiesen, zeigt diese Arbeit zwar klar, dass Cx32 eine zentrale Rolle in der Promotion der Hepatokarzinogenese durch PB spielt. Allerdings wäre denkbar, dass Cx32 nicht nur an der Ausbildung von gap junction und der Vermittlung von GJIC beteiligt ist, sondern weitere Funktionen in der Zelle erfüllt, die für die promovierende Wirkung durch Fremdstoffe von Bedeutung sein könnten. In diesem Zusammenhang ist interessant, dass zumindest Connexin 43 mit dem Zona Occludens Protein-1 (ZO-1), einem weiteren Membran-assoziierten Protein zu interagieren scheint (Day *et al.*, 1998). Ebenso gibt es vorläufige Hinweise für eine Interaktion zwischen Cx32 und E-

Cadherin, einem Zelladhensionsmolekül, dessen Expression in Tumoren häufig gestört ist (H. Yamasaki, persönliche Mitteilung).

Bei der Planung der vorliegenden Studie war die Tatsache zu berücksichtigen, dass Phenobarbital in der Leber der Maus nicht notwendigerweise promovierend wirksam ist. So war bekannt, dass das Barbiturat im Initiations-Promotionsansatz die Hepatokanzergenese in Mäusen nur dann fördert, wenn es chronisch an Tiere verfüttert wird, die im adulten Alter mit DEN behandelt wurden (Lee *et al.*, 1998; Pereira *et al.*, 1986; Diwan *et al.*, 1984). Andererseits inhibiert PB die Tumorbildung in Mäusen, die neonatal mit DEN behandelt wurden (Lee *et al.*, 1998). Im Prinzip wurde dieser inverse Effekt auch in der vorliegenden Arbeit in Cx32-Wildtyp-Mäusen in den Experimenten IIIa und IIIb sichtbar. Der hemmende Effekt von PB auf das Wachstum G-6-Pase-defizienter Läsionen fiel allerdings im vorliegenden Experiment IIIb (Initiation im neonatalen Alter) deutlich geringer aus, als in der Studie von Lee *et al.* (1998) und war nur bei Cx32<sup>Y/-</sup>-Mäusen signifikant. Die Hemmwirkung lag allerdings im Bereich von Ergebnissen aus einer vergleichbaren Studie älteren Datums mit B6C3F1-Mäusen (Weghorst und Klaunig, 1989).

Der Mechanismus diese „paradoxen“ Barbiturateffekts ist nicht geklärt. Lee und Mitautoren (Lee *et al.*, 1998) schlagen vor, dass PB unterschiedlichen Einfluss auf basophile und eosinophile Läsionen in der Leber ausüben könnte: In neonatalen Mäusen erzeugt DEN überwiegend basophile hepatozelluläre Adenome, deren Proliferation durch PB gehemmt wird; bei im adulten Alter mit DEN behandelten Mäusen dominieren hingegen nicht-basophile bzw. eosinophile Läsionen, die in ihrer Proliferation durch PB stimuliert werden, was die bevorzugte Promotion letzterer Läsionen durch das Barbiturat erklären würde. Hierzu passen die Ergebnisse der vorliegenden Studie, mit überwiegend basophilen Läsionen in Experiment IIIb, sowohl in Kontrollen als auch in PB-behandelten Tieren, und dem vorwiegenden Auftreten von Läsionen mit nicht-basophilem/eosinophilem Erscheinungsbildes unter den PB-promovierten Läsionen im Experiment IIIa. Da PB in Cx32-Wildtyp-Mäusen im Experiment IIIa (mit Initiation der neonatalen Mäuse) nicht jedoch im Experiment IIIb (mit Initiation adulter Mäuse) promovierend war, ist zu vermuten, dass der Promotionseffekt auch in der vorliegenden Studie, vermittelt über Cx32, im wesentlichen in nichtbasophilen/eosinophilen Herden zum Tragen kommt.

## 5. Zusammenfassung

Connexine sind Proteine, die als Multimere Poren (*gap junctions*) zwischen benachbarten Zellen bilden, über die niedermolekulare Stoffe ausgetauscht werden können. In der Leber kommt diese Funktion Connexin32 (Cx32) und 26 zu. In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von Cx32 auf den Hepatokanzerogeneseprozess untersucht. Hierfür stand aus einer Zusammenarbeit mit Prof. Willecke, Inst. f. Genetik der Universität Bonn, eine Cx32-Null-Maus (*Cx32-knockout*) zur Verfügung, die durch gezielte homologe Rekombination generiert worden war. Drei verschiedene Studien unterschiedlicher Zielrichtung wurden durchgeführt. Diese und die dabei erhaltenen Ergebnisse sind nachfolgend beschrieben:

### Experiment I: Genetischer Hintergrund

Mäuse verschiedener Stämme zeichnen sich durch unterschiedliche Lebertumor-Suszeptibilität aus: C57BL-Mäuse sind wenig, C3H-Mäuse hoch suzeptibel. Cx32-Null-Mäuse wurden mit C57BL- bzw. C3H-Mäusen gekreuzt. Cx32<sup>Y/+</sup> und Cx32<sup>Y/-</sup> Männchen (Cx32 ist X-chromosomal lokalisiert) der jeweiligen F1-Generation wurden einmalig mit dem Hepatokanzerogen DEN behandelt und die kanzerogene Antwort in der Leber anhand des Auftretens Glukose-6-Phosphatase (G-6-Pase) defizienter Läsionen quantifiziert. Hierbei zeigten Cx32<sup>Y/-</sup>-Mäuse eine im Vergleich zum jeweiligen Wildtyp deutlich stärkere kanzerogene Antwort, erkennbar insbesondere an der gesteigerten Wachstumsgeschwindigkeit der enzymveränderten Läsionen. Die Befunde zeigen, dass der Cx32-Gendefekt unabhängig vom weiteren genetischen Hintergrund den Kanzerogeneseprozess „promoviert“, wobei, absolut gesehen, die weitaus stärkste Antwort in Cx32-Null-C3H-Mäusen beobachtet wurde. Mäuse dieses Stamms reagieren somit extrem sensitiv auf krebsauslösende Stoffe und sind somit potentiell zur empfindlichen Erfassung kanzerogener Wirkungen geeignet. Cx32 nimmt als derzeit einziges bekanntes Hepatokanzerogenese-beeinflussendes Gen auf einem Geschlechtschromosom eine Sonderstellung unter den Tumorsuszeptibilitäts- und Tumoresistenzgenen ein.

### Experiment II: Mosaik-Expression von Cx32

Aufgrund seiner X-chromosomalen Lokalisation wird Cx32 in der Leber von heterozygoten Cx32<sup>+/-</sup>-Mäusen mosaikartig exprimiert. Dieses aufgrund X-chromosomaler Inaktivie-

lung postulierte mosaikartige Expressionsmuster des Proteins konnte im Lebernorgewebe durch immunhistochemische Färbung nachgewiesen werden, wobei die jeweiligen Gewebsanteile bei etwa 50% lagen und sich mit dem Alter der Tiere nicht signifikant änderten. Im Lebernorgewebe bietet das Fehlen der Cx32-Expression den entsprechenden Hepatozyten somit keinen selektiven Wachstumsvorteil.

Cx32<sup>+/-</sup>-Mäuse wurden einmalig mit DEN behandelt und der Phänotyp sowie das Wachstumsverhalten der induzierten präneoplastisch- und neoplastisch-veränderten Läsionen bestimmt. Drei Phänotypen traten auf: Kleinere Läsionen waren häufig homogen Cx32-negativ oder Cx32-positiv: Vermutlich sind diese beiden Phänotypen klonale Abkömmlinge Cx32-exprimierender und Cx32-negativer Hepatozyten. Größere Läsionen zeigten dagegen häufig inselartig-angeordnete Cx32-positive Hepatozyten innerhalb einer Cx32-negativen Zellpopulation. Möglicherweise resultiert die (Re-)Expression von Cx32 in Hepatozyten der Läsionen mit mosaikartiger Expression von Cx32 aus einer X-chromosomalen Reaktivierung des Gens. Interessanterweise wiesen Cx32-positive Hepatozyten in „Mosaikläsionen“ keine gesteigerten DNA-Markierungsindices auf, was darauf hindeutet, dass die Expression von Cx32 in Hepatozyten dieser Läsionen keinen negativen Einfluss auf ihre Proliferationsgeschwindigkeit ausübt.

### Experiment III: Phenobarbitalstudie

Zahlreiche tumorpromovierende Stoffe führen in Zellkultursystemen zu einer Unterbrechung der Zell-Zell-Kommunikation über *gap junctions*. Prinzipiell könnte dies Ursache aber auch Folge der Promotionswirkung sein. Cx32<sup>Y/+</sup>- und Cx32<sup>Y/-</sup>-Mäuse wurden im Alter von 6 Wochen einmalig mit DEN behandelt; anschließend wurden Versuchsgruppen chronisch mit dem „klassischen“ Tumorpromotor Phenobarbital im Futter weiterbehandelt oder auf Kontrolldiät gehalten. Die Ergebnisse zeigen eindeutig, dass funktionales Cx32 zwingend notwendig für die durch Phenobarbital induzierte Promotion der Hepatokarzinogenese ist: Nur in Cx32<sup>Y/+</sup>- Wildtyp-Mäusen konnte eine Promotionswirkung nachgewiesen werden, nicht dagegen in Cx32-Null-Mäusen. Die durch Phenobarbital erzeugte Leberhypertrophie und Induktion mikrosomaler Enzyme war dagegen von dem Cx32-Genotyp unabhängig. Dies widerlegt die häufig in der Literatur vertretende Meinung, dass Induktion von Organwachstum und promovierende Wirkung zwangsweise gekoppelte Prozesse darstellen. Im normalen Lebergewebe von Cx32<sup>Y/+</sup>-Mäusen führte Phenobarbital zu keiner signifikanten Erniedrigung in der Expression und Lokalisation von Cx32. Allerdings führte die Behandlung mit Phenobarbital in der Leber von Cx32-Wildtyp-Mäusen zu einem signifikant erhöhten Anteil an neoplastisch-veränderten Läsio-

## Zusammenfassung

nen mit erniedrigter oder fehlender Cx32-Expression, was Ursache der Promotionswirkung sein könnte.

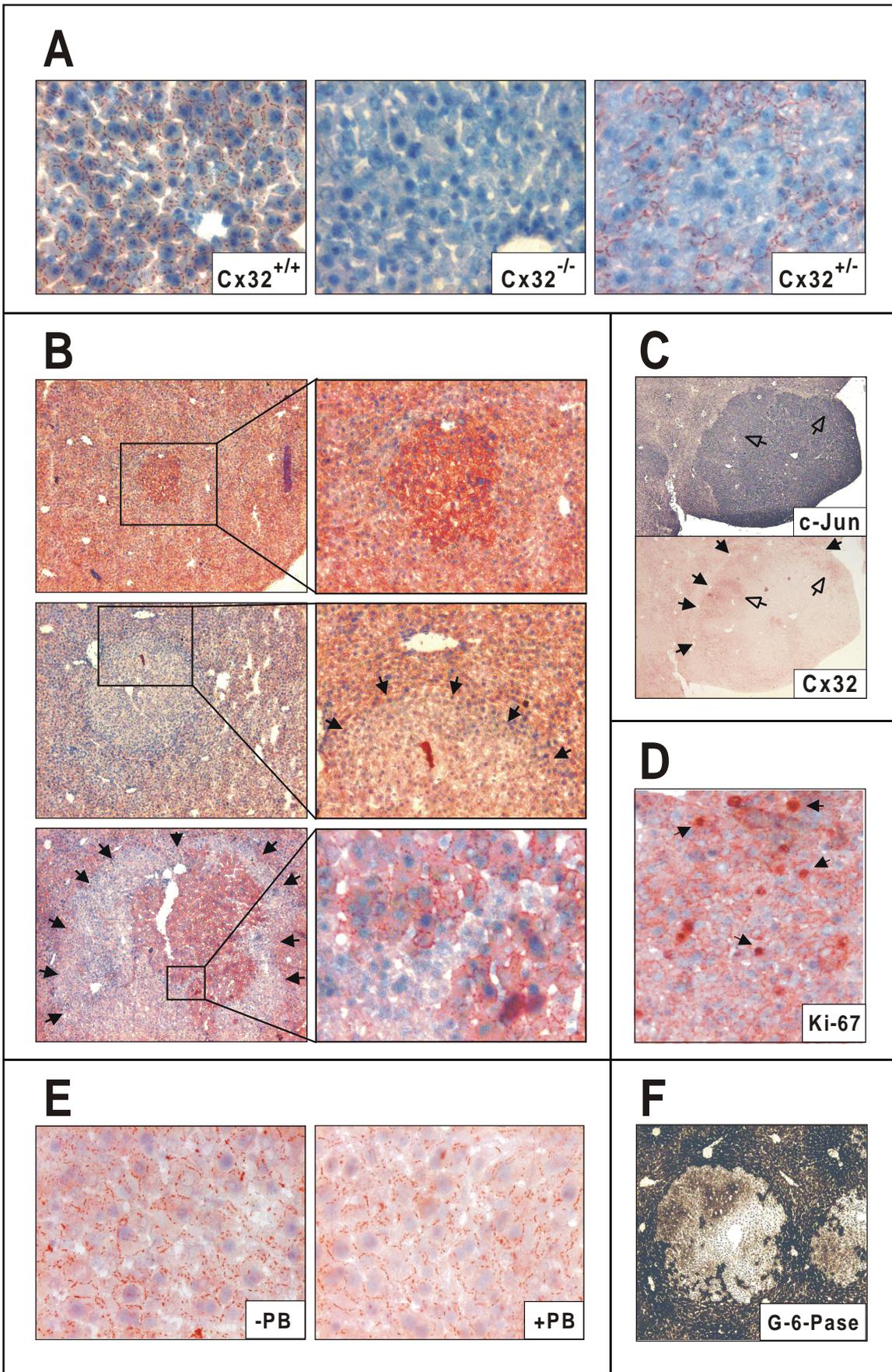
In neonatal mit DEN-behandelten Mäusen führt die Nachbehandlung mit Phenobarbital paradoxerweise zu einer Verminderung der kanzerogenen Antwort in der Leber. Dies wurde auch in diesem Experiment beobachtet, wobei der Effekt unabhängig vom Cx32-Genotyp der Tiere war. Cx32 ist demnach nicht für die inhibitorische Aktivität von Phenobarbital notwendig, sehrwohl jedoch für die Promotionswirkung.

Mit einem entsprechenden experimentellen Design wären das verwendete Mausmodell ein probates Werkzeug, um kanzerogene Substanzen nach ihrem bevorzugten Wirkungsmechanismus, also Tumorinitiation oder –promotion, zu klassifizieren: Krebsauslösende Stoffe (wie DEN) sind in Cx32-Null-Mäusen, tumorpromovierende Stoffe (wie Phenobarbital) dagegen in Cx32-Wildtyp-Mäusen stärker wirksam.

## Farbtafel

Farbabbildungen histochemischer Nachweise von Cx32, c-Jun, Ki-67 und G-6-Pase.

**A** Normales Lebergewebe. Unterschiedliche Cx32-Expression in der Leber weiblicher Cx32<sup>+/+</sup>, Cx32<sup>-/-</sup>, and Cx32<sup>+/-</sup>-Mäuse. Von links nach rechts: Cx32-Expression in den Hepatozyten einer Wildtyp-Maus; Ausbleiben einer positiven Cx32-Nachweisreaktion in Cx32-Null-Mäusen und mosaikartige Cx32-Expression in Mäusen mit WT- und Null-Allel. **B** Lebertumoren. Die Lebertumoren in Cx32-Mosaikmäusen zeigten 3 Phänotypen: homogene Cx32-Expression (oben), Cx32-Defizienz (mitte) oder eine Mischung aus beidem (unten). Die Pfeile deuten die Tumorränder an. Auf der rechten Seite ist jeweils eine Ausschnittsvergrößerung gegeben. **C** Immunhistochemischer Nachweis von Cx32 und c-Jun in zwei aufeinanderfolgenden Serienschnitten von einer Leber aus einer Cx32<sup>+/-</sup>-Maus. Die gefüllten Pfeile deuten auf die Tumorgrenze, die offenen Pfeile zeigen Cx32-positive Areale im Parallelschnitt an. **D** Detektion von Cx32 und Ki-67 in einer immunhistochemischen Doppelfärbung. Neben den membranständigen Cx32-„Bälkchen“ sind Ki-67-positive Kerne (z.T. mit Pfeilen gekennzeichnet) zu sehen. **E** Normales Lebergewebe einer PB-behandelten (PB+) und einer Kontroll-Maus (PB-), beide Cx32<sup>+/+</sup>: Kein Unterschied in der Cx32-Expression ersichtlich. **F** Enzymhistochemischer Glucose-6-Phosphatase-Nachweis an einem Leberschnitt. Deutlich sind zwei enzymveränderte Herde (hell, negativ) im umgebenden Normalgewebe (dunkel, positiv) zu erkennen. Die Bilder wurden bei unterschiedlichen Vergrößerungen mit einer an das Mikroskop gekoppelten CCD-Kamera aufgenommen.





## 6. Literaturverzeichnis

**Bager, Y., Kenne, K., Krutovskikh, V., Mesnil, M., Traub, O., und Wärngård, L.**

(1994)

Alteration in the expression of gap junction proteins in rat liver after treatment with the tumor promoter 3,4,5,3',4'-pentachlorobiphenyl.

Carcinogenesis, **15**: 2439-2443.

**Bai, S., Spray, D.C. und Burk, R.D.** (1993)

Identification of proximal and distal regulatory elements of the rat connexin32 gene.

Biochim. Biophys. Acta Gene Struct. Expression **1216**: 197-204.

**Bai, S., Schoenfeld, A., Pietrangelo, A. und Burk, R.D.** (1995)

Identification and characterization of essential an element and its DNA binding protein.

Mol. Cell Biol. **15**: 1439-1445.

**Balmain, A. und Nagase, H.** (1998)

Cancer resistance genes in mice: models for the study of tumor modifiers.

Trends Genet., **14**: 139-144.

**Bauer-Hofmann R, Klimek F, Buchmann A, Müller O, Bannasch P, Schwarz M.**

(1992)

Role of mutations at codon 61 of the c-Ha-ras gene during diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis in C3H/He mice.

Mol Carcinogenesis; **6**:60-67.

**Beer, D.G., Neveu, M.J., Paul, D.L., Rapp, U.R., und Pitot, H.C.** (1988)

Expression of the c-raf protooncogene, gamma-glutamyltranspeptidase, and gap junction protein in rat liver neoplasms.

Cancer Res., **48**: 1610-1617.

**Bennett, M.V.L., Barrio, L.C., Bargiello, T. A., Spray, D.C., Hertzberg, E., und Saez,**

**J.C.** (1991)

Gap junctions: new tools, new answers, new questions.

Neuron **6**: 305-320.

**Berenblum, I.** (1941a)

The cocarcinogenic action of Croton resin.

Cancer Res. **1**: 44-48.

**Berenblum, I.** (1941b)

The mechanism of carcinogenesis.

Cancer Res. **1**: 807-814.

**Berenblum, I. und Shubik, P.** (1947)

A new quantitative approach to the study of stages of chemical carcinogenesis in the mouse skin.

Br. J. Cancer **1**: 383-391.

**Beyer, E.C. und Steinberg, T.H.** (1991)

Evidence that the gap junction protein connexin-43 the ATP-induced pore of mouse macrophages.

J. Biol. Chem. **266**: 7971-7974.

**Beyer, E.C., Kistler, J., Paul, D.L., und Goodenough, D.A.** (1989)

Antisera directed against connexin43 peptides react with a 43-kDa protein localized to gap junction in myocardium and other tissues.

J. Cell Biol. **108**: 595-605.

**Boutwell, R.K.** (1974)

the function and mechanism of promoters of carcinogenesis:

Crit. Rev. Toxicol. **2**: 419-443.

**Bruzzone, R., White, T.W., und Paul, D.L.** (1996)

Connections with connexins: the molecular basis of direct intercellular signaling.

Eur. J. Biochem., **238**: 1-27.

**Buchmann A, Kuhlmann W, Schwarz M, Kunz W, Wolf CR, Moll E, Friedberg T, Oesch F.** (1985)

Regulation and expression of four cytochrome P-450 isoenzymes, NADPH-cytochrome P-450 reductase, the glutathione transferases B and C and microsomal epoxide hydrolase in preneoplastic and neoplastic lesions in rat liver.

Carcinogenesis **6**: 513-521.

**Buchmann A., Ziegler S., Wolf A., Robertson L.W., Durham S.K., und Schwarz, M.** (1991)

Effects of polychlorinated biphenyls in rat liver: correlation between primary subcellular effects and promoting activity.

Toxicol. Appl. Pharmacol. **111**: 454-468.

**Budunova, I.V., und Williams, G.M.** (1994)

Cell culture assays for chemicals with tumor-promoting or tumor-inhibiting activity based on the modulation of intercellular communication.

Cell. Biol. Toxicol. **10**: 71-116.

**Bursch,W., Oberhammer,E. und Schulte-Hermann, R.** (1992)

Cell death by apoptosis and its protective role against disease.

TIPS **13**: 245-251.

**Campbell, H.A., Pitot H.C., Potter V.R., und Laishes, B.A.** (1982)

Application of quantitative stereology to the evaluation of enzyme-altered foci in rat liver.

Cancer Res., **42**: 465-472.

**Campbell, H., Yuan-Ding Xu, Hanigan, M. und Pitot,H.** (1986)

Application of quantitative stereology to the evaluation of phenotypically heterogeneous enzyme altered foci in the rat liver.

J. Natl. Cancer Inst. **76**: 751-767.

**Cerrutti, P.A.** (1985)

Pro-oxidant state and tumor promotion.

Science **228**: 375-381.

**Condorelli, D.F., Parenti, R., Spinella, F., Salinaio, A.T., Belluardo, N., et al.** (1998)

Cloning of a new gap junction gene (Cx36) highly expressed in mammalian brain neurons.

Eur. J. Neurosci. **10**: 1202-1208.

**de Feijter, A.W., Trosko, J.E., Krizman, D.B., Lebovitz, R.M. and Lieberman M. W.** (1992)

Correlation of increased levels of Ha-ras T24 protein with extent loss of gap junction function in rat liver epithelial cells.

Mol. Carcinogenesis **5**: 205-212.

**Day, W.E., Bowen, J.A., Barhoumi, R., Bazer, F.W. und Burghardt, R.C.** (1998)

Endometrial connexin expression in the mare and pig: evidence for suppression of cell-cell communication in uterine luminal epithelium.

Anat. Rec. **251**: 277-285.

**Dermietzel R, Leibstein A, Frixen U, Janssen-Timmen U, Traub O, Willecke K.** (1984)

Gap junctions in several tissues share antigenic determinants with liver gap junctions.

EMBO J; **3**:2261-2270.

**Diwan, B.A., Rice, J.M., Ward, J.M., Ohshima, M., und Lynch, P.H. (1984)**

Inhibition by PB and lack of effect of amobarbital on the development of liver tumors induced by N-nitrosodiethylamine in juvenile B6C3F1 mice.

Cancer Lett., **23**: 223-234.

**Dragani, T.A., Manenti, G., Gariboldi, M., De Gregorio, L. und Pienotti, M.A. (1995)**

Genetics of liver tumor susceptibility in mice.

Toxicol. Lett., **82/83**: 613-619.

**Drinkwater, N.R. (1994)**

Genetic control of hepatocarcinogenesis in C3H mice

Drug. Metab. Rev., **26**: 201-208.

**Drinkwater, N.R. und Bennet, L.M. (1991)**

Genetic control of carcinogenesis in experimental animals.

Prog. Exp. Tumor Res.; **33**: 1-20.

**Drinkwater, N.R. und Ginsler, J.J. (1986)**

Genetic control of hepatocarcinogenesis in C57BL/6J and C3H/HeJ inbred mice.

Carcinogenesis; **7**: 1701-1707.

**Estabrook, R.W., und Werringloer, J. (1978)**

The measurement of difference spectra: application to the cytochromes of microsomes.

*In*: S.P. Colowick, and N.O. Kaplan (eds), Methods in Enzymology, Volume LII, pp. 212-220. New York, San Francisco, London: Academic Press.

**Emerit, I., und Cerutti, P.A. (1982)**

Tumor promotor phorbol 12-myristate 13-acetate induces a clastogenic factor in human lymphocytes.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA **79**: 7509-7513.

**Farber, E. und Cameron, R. (1980)**

The sequential analysis of cancer development.

Adv. Cancer res. **31**: 125-226.

**Fitzgerald, D.J. und Yamasaki, H. (1990)**

Tumor promotion: models and assay systems.

Teratog Carcinog Mutagen **10**: 89-102

**Fearon, E.R. und Vogelstein, B. (1990)**

A genetic model for colorectal tumorigenesis.

Cell **61**: 759-767.

**Friedewald, W.F. und Rous, P.** (1944)

The initiating and promoting elements in tumor promotion.

J. Exp. Med. **80**: 101-125.

**Gerlach C, Golding M, Larue L, Alison MR, Gerdes** (1967)

J. Ki-67 immunoexpression is a robust marker of proliferative cells in the rat.

Lab Invest; **77**:697-698.

**Gimmlich, R.L., Kumar, N.M. und Gilula, N.B.** (1988)

Sequenc and developmental expression of mRNA coding for gap junction protein in Xenopus.

J. Cell Biol. **107**: 1065-1073.

**Goodenough,D.A., Goliger, J.A.und Paul,D.L.** (1996)

Connexins, connexons and intercellular communication.

Annu. Rev. Biochem. **65**: 475-502

**Hanigan, M.H., Kemp, C.J., Ginsler, J.J. und Drinkwater, N.R.** (1988)

Rapid growth of preneoplastic lesions in hepatocarcinogen-sensitive C3H/HeJ male mice relative to C57BL/6J male mice.

Carcinogenesis **9**: 885-890.

**Hayashi,T. Nomata,K. Chang,C.C., Ruch,R.J., und Trosko,J.E.** (1998)

Cooperative effects of v-myc and c-Ha-ras oncogenes on gap junctional intercellular communication and tumorigenicity inrat liver epithel cells.

Cancer Lett. **128**: 145-154.

**Hennemann, H., Kozjek, G., Dahl, E., Nicholson, B. und Willecke, K.** (1992)

Molecular cloning of mouse connexins26 and -32: Similar genomic organization but distinct promoter sequences of two gap junction genes.

Eur. J. Cell Biol. **25**: 81-89.

**Itahana K., Tanaka, T., Moikazu, Y., Komatu, S., Ishida, N., und Takeya, T.** (1998)

Isolation and charactrisation of a novel connexin gene, Cx-60, in porcine ovarian follicles

Endocrinology **139**: 320-329

**Ito, S., Tsuda, M., Yoshitake, A., Yanai, T., und Masegi, T.** (1998)

Effect of PB on hepatic gap junction intercellular communication in rats.

Toxicol. Pathol. **26**: 253-259.

**Janssen-Timmen, U., Traub O., Dermietzel R., Rabes H.M., und Willecke, K.** (1986)  
Reduced number of gap junctions in rat hepatocarcinomas detected by monoclonal antibody.

Carcinogenesis **7**: 1475-1482.

**Jiang, J.X. und Goodenough, D.A.** (1996)

Heteromeric connexons in lens gap junction channels.

Proc. Natl. Accad. Sci. USA **93**: 287-291.

**Jou, Y.S., Layhe, B., Matesic, D.F., Chang, C.C. De Feijter, A.W., Lockwood, L., Welsch, C.W., Klaunig, J.E. und Trosko, J.E.** (1995)

Inhibition of gap junctional intercellular communication and malignant transformation of rat liver epithelial cells by neu oncogene.

Carcinogenesis, **16**: 311-317.

**Kalimi, G.H. und Lo, C.W.** (1988)

Communication compartments in the gastrulating mouse embryo.

J. Cell Biol. **107**: 241-255.

**Klaunig, J.E.** (1991)

Alterations in intercellular communication during the stage of promotion. Gap junctions and hepatic tumor promotion.

Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, **198**: 688-692.

**Knippers, R.** (1997)

Molekulare Genetik

Stuttgart New York, Georg Thieme Verlag, 448-449

**Konig, N. und Zampighi, G.** (1995)

Purification of bovine lens cell-to-cell channels composed of connexin44 and connexin50.

J. Cell Sci. **108**: 3091-3098.

**Krutovskikh VA, Mazzoleni G, Mironov N, Omori Y, Aguelon AM, Mesnil M, Berger F, Partensky C, Yamasaki H.** (1994)

Altered homologous and heterologous gap-junctional intercellular communication in primary human liver tumors associated with aberrant protein localization but not gene mutation of connexin32.

Int J Cancer; **56**: 87-94.

- Krutovskikh, V.A., Mesnil, M., Mazzoleni, G., and Yamasaki, H.** (1995)  
Inhibition of rat liver gap junction intercellular communication by tumor promoting agents in vivo-association with aberrant localisation of connexin proteins.  
Lab. Invest., **72**: 571-577.
- Krutovskikh, V.A., Oyamada, M., und Yamasaki, H.** (1991)  
Sequential changes of gap-junctional intercellular communications during multistage rat liver carcinogenesis: direct measurement of communication in vivo.  
Carcinogenesis, **12**: 1701-1706.
- Kumar, N.M., und Gilula N.B.** (1986)  
Cloning and characterization of human and rat liver cDNAs coding for gap junction protein.  
J. Cell Biol. **103**: 767-776.
- Kumar, N.M., und Gilula N.B.** (1996)  
The gap junction communication channel.  
Cell, **84**: 381-388.
- Laird PW, Jaenisch R.** (1996)  
The role of DNA methylation in cancer genetic and epigenetics.  
Annu Rev Genet; **30**:441-464.
- Lawrence, T.S., Beers, W.H., und Gilula** (1978)  
Transmission of hormonal stimulation by cell-cell communication.  
Nature **272**: 501-506.
- Lee, G.-H., Oosa, T., und Osanai, M.** (1998)  
Mechanism of the paradoxical, inhibitory effect of PB on hepatocarcinogenesis initiated in infant B6C3F1 mice with diethylnitrosamine.  
Cancer Res., **58**: 1665-1669.
- Loewenstein, W.R.** (1981)  
Junctional intercellular communication: the cell-cell membrane channel.  
Physiol. Rev. **61**: 829-913.
- Lubet, R.A., Nims, R.W., Rice, J.M., und Diwan, B.A.** (1989)  
Induction of cytochrome P<sub>450b</sub> and its relationship to liver tumor promotion.  
J. Am. Coll. Toxicol., **8**: 259-268.
- Malumbres, M., Manges, R., Ferrer, N., Lu, S., Pellicer, A.** (1997)  
Isolation of high molecular weight DNA for reliable genotyping of transgenic mice  
BioTechniques, **22** :1114-1119.

**Manenti, G., Binelli, G., Gariboldi, M., Canzian, F., De Gregorio, L., Favella, F.S., Dragani, T.A. und Pierotti, M.A. (1994)**

Multiple loci affect genetic predisposition to hepatocarcinogenesis in mice.

Genomics, **23**: 118-124.

**Mesnil, M. und Yamasaki, H. (1993)**

Cell-cell communication and growth control of normal and cancer cells: evidence and hypothesis.

Mol Carcinog **7**: 14-17.

**Moennikes, O., Buchmann, A., Ott, T., Willecke, K., und Schwarz, M. (1999)**

The effect of connexin32 null mutation on hepatocarcinogenesis in different mouse strains.

Carcinogenesis, **20**: 1379-1382.

**Moolgavkar, S.H. (1983)**

Model of human carcinogenesis: action of environmental agents:

Environ. Health Perspect. **50**: 285-291.

**Moolgavkar, S.H. und Knudson, A.G. (1981)**

Mutation and cancer: a model for human carcinogenesis

J. Natl. Cancer Inst. **66**: 1037-1052.

**Mottram, J.C. (1944)**

A developing factor in experimental blastogenesis.

J. Pathol. Bacteriol. **56**: 181-187.

**Murray, S.A. und Fletcher, W.H. (1984)**

Hormone-induced intercellular signal transfer dissociates cyclic amp-dependent protein kinase.

J. Cell Biol. **98**: 1710-1719.

**Nakano H, Hatayama I, Satoh K, Suzuki S, Sato K, Tsuchida S. (1994)**

c-Jun expression in single cells and preneoplastic foci induced by diethylnitrosamine in B6C3F1 mice: comparison with the expression of pi-class glutathione S-transferase.

Carcinogenesis; **15**:1853-1857.

**Nelles, E., Buetzler C., Jung D., Temme A., Gabriel H.D., Dahl U., Traub O., Stuem-  
pel F., Jungermann K., Zielasek J., Toyka K.V., Dermietzel R., und Willecke, K.  
(1996)**

Defective propagation of signals generated by sympathetic nerve stimulation in the liver of connexin32-deficient mice.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **93**: 9565-9570.

**Neuhaus, I.M., Dahl, G. und Werner, R. (1995)**

Use of alternate promoters for tissue-specific expression of the gene coding for connexin32

Gene **158**: 257-262.

**Neveu, M.J., Hully J.R., Babcock K.L., Hertzberg E.L., Nicholson B.J., Paul D.L., und Pitot, H.C. (1994)**

Multiple mechanisms are responsible for altered expression of gap junction genes during oncogenesis in rat liver.

J. Cell Sci., **107**: 83-95.

**Neveu, M.J., Hully, J.R., Babcock, K.L., Vaughan, J., Hertzberg, E.L., Nicholson, B.J., Paul, D.L. und Pitot, H.C. (1995)**

Proliferation associated differences in the spatial and temporal expression of gap junction genes in rat liver.

Hepatology, **22**(1): 202-212.

**Neveu, M.J., Hully, J.R., Paul, D.L. und Pitot, H.C. (1990)**

Reversible alteration in the expression of the gap junctional protein connexin 32 during promotion in rat liver cells and its role during cell proliferation.

Cancer Commun. **2**: 21-31.

**Nicholson B, Dermietzel R, Teplow D, Traub O, Willecke K, Revel J-P. (1987)**

Two homologous protein components of hepatic gap junctions.

Nature; **329**:732-734.

**O'Brien, J., Buzzone, R., White, T.W., al-Ubaidi, M.R. und Ripps, H. (1998)**

Cloning and expression of two related connexins from the perch retina define a distinct subgroup of the connexin family.

J. Neurosci. **18**: 7625-7637.

**O'Brien, J., al-Ubaidi, M.R. und Ripps, H (1996)**

Connexin 35: a gap junctional protein expressed prereferentially in the skate retina:

Mol. Biol. Cell **7**: 233-243.

**Paul, D.L. (1986)**

Molecular cloning of cDNA for rat liver gap junction protein:

J. Cell Biol. **103**: 123-134.

**Paul, D.L., Ebihara, L., Takemoto, L.J., Swenson, K.I. und Goodenough, D.A. (1991)**

Connexin46, a novel lens gap junction protein, induces voltage gated currents in non-junctional plasma membrane of *Xenopus* oocytes

J. Cell Biol. **115**: 1077-1089.

**Pereira, M., Klaunig, J.E., Herren-Freund, S.L., und Ruch, R.J.** (1986)

Effect of PB on the development of liver tumors in juvenile and adult mice.  
J. Natl. Cancer Inst., **77**: 449-452.

**Perkins, G., Goodenough, D.A., und Sosinsky, G.** (1997)

Three-dimensional structure of the gap junction connexon.  
Biophys. J. **72**: 533-544

**Pott, P.** (1775)

Chirurgical observations relative to the cataract, the polypus of the nose, the cancer of the scrotum, the different kinds of ruptures and mortification of the toes and feet.  
Natl. Cancer Inst. Monogr. **10**:7-13.

**Rabes HM, Bücher T, Hartmann A, Linke I, Dünwald M.** (1982)

Clonal growth of carcinogen-induced enzyme deficient preneoplastic cell population in mouse liver.  
Cancer Res; **42**:3220-3227.

**Redmond, D.E.** (1970)

Tobacco and cancer: The first clinical report, 1761  
N. Engl. J. Med. **282**: 18-23.

**Risek, B., Guthrie, S., Kumar, N. und Gilula, N.B.** (1990)

Modulation of gap junction transcript and protein expression during pregnancy in the rat.  
J. Cell Biol. **110**: 269-282.

**Rojkind, M., Novikoff, P., Greenwel, P., Rubin, J., Rojas-Valencia, L., Carvalho, A., Stockert, R., Spray, D., Hertzberg, E. und Wolkoff, A.** (1995)

Characterization and functional studies on rat liver fat-storing cell line and freshly isolated hepatocyte coculture system.  
Am. J. Path. **146(6)**: 1508-1520.

**Rose, B., Mehta P.P. und Loewenstein, W.R.** (1993)

Gap-junction protein gene suppresses tumorigenicity.  
Carcinogenesis, **14**: 1073-1075.

**Rous, P. und Kidd, J.G.** (1941)

Conditional neoplasms and subthreshold neoplastic states. A study of the tar tumors of rabbits.  
J. Exp. Med. **73**: 365-390.

**Ruch, R.J., Klaunig, J.E., und Pereira, M.A. (1987)**

Inhibition of intercellular communication between mouse hepatocytes by tumor promoters.

Toxicol. Appl. Pharmacol., **87**: 111-120.

**Saiki, R.K., Gelfund, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. und Ehrlich, H. A. (1988)**

Primer-directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase.

Science, **239**: 487-491.

**Schröter, C., Parzefall, W., Schröter, H., und Schulte-Hermann, R. (1987)**

Dose-response on the effects of  $\alpha$ -,  $\beta$ -, and  $\gamma$ -hexachlorocyclohexane on putative pre-neoplastic foci, monooxygenases, and growth in rat liver.

Cancer Res. **47**: 80-88.

**Schulte-Hermann, R. (1985)**

Tumour promotion in the liver.

Arch. Toxicol. **57**: 147-158.

**Schwarz, M. und Bock, K. W. (1998)**

Mechanismen der Entstehung fremdstoffbedingter Krebsformen. In: Ganten, D. und Ruckpaul, K., Hrsg., Handbuch der Molekularen Medizin, Band 2, Tumorerkrankungen Berlin, Heidelberg; Springer Verlag

**Schwarz, M., Buchmann A., Schulte M., Pearson D., und Kunz, W. (1989)**

Heterogeneity of enzyme-altered foci in rat liver.

Toxicol. Lett., **49**: 297-317.

**Scribner, J. und Süß, R. (1978)**

Tumor initiation and promotion

Int. Rev. Exp. Path. **18**: 137-198.

**Sohl, G.; Gillen, C., Bosse, F., Gleichmann, M., Müller, H.W. und Willecke, K. (1996)**

A second alternative transcript of the gap junction gene connexin32 is expressed in murine Schwann cells and modulated in injured sciatic nerve.

Eur. J. Cell Biol. **69**: 267-2.

**Spray, D.C., Chanson, M., Moreno, A.L., Dermietzel, R. und Meda, P. (1991)**

Distinctive gap junction channel types connect WB cells, a clonal cell line derived from rat liver.

Am. J. Physiol. **260**: C513-C527.

**Stinchcombe, S., Buchmann, A., Bock, K.W., und Schwarz, M.** (1995)

Inhibition of apoptosis during 2,3,7,8-tetrachlordibenzo-p-dioxin-mediated tumor promotion in rat liver.

Carcinogenesis **16**: 1271-1275.

**Stutenkemper, R., Geisse, S., Schwarz, H.J., Look, J., Traub, O., Nicholson, B.J. und Willecke, K.** (1992)

The hepatocyte-specific phenotype of murine liver cells correlates with high expression of connexin32 and connexin26 but very low expression of connexin43.

Exp. Cell Res. **201**: 43-54.

**Sugie, S., Mori, H., und Takahashi, M.** (1987)

Effect of in vivo exposure to liver tumor promoters PB and DDT on the gap junctions of rat hepatocytes: a quantitative freeze-fracture analysis.

Carcinogenesis **8**: 45-51.

**Swierenga, S.H., und Yamasaki H.** (1992)

Performance of tests for cell transformation and gap-junctional intercellular communication for detecting nongenotoxic carcinogenic activity. *In*: H. Vainio, P. Maggee, D.

McGregor, D. and A.J. McMichael (eds.), Mechanisms of carcinogenesis in risk identification pp. 165-193. Lyon: IARC Scientific Publications No. 116.

**Tateno, C. Ito, S., Tanaka, M., Oyamada, M., und Yoshitake, H.** (1994)

Effect of DDT on hepatic gap junctional intercellular communication in rats.

Carcinogenesis **15**: 517-521.

**Temme, A., Buchmann A., Gabriel H.D., Nelles E., Schwarz M., und Willecke, K.** (1997)

High incidence of spontaneous and chemically induced liver tumors in mice deficient for connexin32.

Curr. Biol. **7**: 713-716.

**Traub, O., Drüge, P.M., Willecke, K.** (1983)

Degradation and resynthesis of gap junction protein in plasma membranes of regenerating liver after partial hepatectomy or cholestasis.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA **80**: 755-759.

**Traub, O., Look, J., Dermietzel, R., Brummer, F., Hülser, D. und Willecke, K.** (1989)

Comparative characterization of the 21-kD and 26-kD gap junction proteins in murine liver and cultured hepatocytes.

J. Cell Biol. **1058**: 1039-1051.

**Tribioli C, Tamanini F, Patrosso C, Milanesi L, Pergolizzi R, Maestrini E, Rivella S, Bione S, Mancini M, et al. (1992)**

Methylation and sequence analysis around EagI sites: identification of 28 new CpG islands in XQ24-XQ28.

Nucl Acid Res; **20**: 727- 733.

**Trosko J.E. und Chang C-C (1992)**

Chemical and Oncogene Modulation of Gap Junctional Intercellular Communication.

Raven Press, New York, N.Y.

**Trosko J.E. Chang C-C, Madhukar BV, Dupont E.**

Intercellular communication: a paradigm for the interpretation of the initiation/promotion/progression model of carcinogenesis. In: Arcos JC, ed. Chemical Induction of Cancer. Boston, Basel, Berlin: Birkhäuser, 1995: 205-225.

**Trosko, J.E. und Goodman, J.A. (1994)**

Intercellular communication may facilitate apoptosis. Implications for tumor promotion.

Molec. Carcinoge. **11**: 8-11.

**Trosko, J.E. und Ruch, R.J. (1998)**

Cell-Cell communication in carcinogenesis.

Frontiers in Bioscience, **3**: 208-236.

**Trosko, J.E., Yotti, L.P., Warren, S.T., Tsushimoto, G. und Chang, C. (1982)**

Inhibition of cell-cell-communication by tumour promoters. In: Hecker, E., Fusenig, NE., Kunz, W., Marks, F. und Thielmann, H.W. (Hrsg.) Carcinogenesis – a comprehensive survey, vol. 7. Raven Press, New York, 565-585.

**Tsuda H., Asamoto, M., Baba, H., Iwahori, Y., Matsumoto, K., Iwase, T., Nishida, Y., Nago, S., Hakoi, K. und Yamaguchi, S., et al. (1995)**

Cell proliferation and advancement of hepatocarcinogenesis in the rat are associated with a decrease in connexin32 expression.

Carcinogenesis, **16**(1): 101-105.

**Valiunas, V., Niessen, H., Willecke, K., und Weingart, R. (1999)**

Electrophysiological properties of gap junction channels in hepatocytes isolated from connexin32-deficient and wild-type mice.

Pflügers Arch., **437**: 846-856.

**Varshavsky, A. (1981)**

Phorbol ester dramatically induces incidence of Methotrexate-resistant mouse cells:

Possible mechanisms and relevance to tumor promotion.

Cell **25**: 561-572.

**Vesselinovitch, S.D., Rao, K.V.N., und Mihailovitch, N.** (1979)

Neoplastic response of mouse tissues during perinatal age periods and its significance in chemical carcinogenesis.

J. Natl. Inst. Monogr., **51**: 239-250.

**Wachstein, M., und Meisel, E.** (1957)

Histochemistry of hepatic phosphatases at a physiological pH.

Am. J. Clin. Pathol., **27**: 13-23.

**Weghorst, C.M., und Klaunig, J.E.** (1989)

PB promotion in diethylnitrosamine-initiated infant B6C3F1 mice: influence of gender.

Carcinogenesis, **10**: 609-612.

**White, T.W., Bruzzone, R. und Paul, D.L.** (1995)

The connexin family of intercellular channels forming proteins.

Kidney Int. **48**:1148-1157.

**Willecke W, Jungbluth S, Dahl E, Hennemann H, Heynkes R, Grzeschik K-H.** (1990)

Six genes of the human connexin gene family coding for gap junctional proteins are assigned to four different human chromosomes.

Eur J Cell Biol; **53**:275-280.

**Williams ED, Wareham KA, Wowell, S.** (1993)

Direct evidence for the single cell origin of mouse liver cell tumours.

Br J Cancer; **47**:723-726.

**Yamasaki H.** (1995)

Non-genotoxic mechanisms of carcinogenesis: studies of cell transformation and gap junctional intercellular communication.

Toxicol Lett; **77**:55-61.

**Yamasaki, H.** (1990)

Gap junctional intercellular communication and carcinogenesis.

Carcinogenesis, **11**: 1051-1058.

**Yamasaki, H., und Naus, C.C.** (1996)

Role of connexin genes in growth control.

Carcinogenesis, **17**: 1199-1213.

**Yamasaki, H., Krutovskikh, V., Mesnil, M., Tanaka, T., Zaidan-Dagli, M.L. und Omori, Y.** (1999)

Role of connexin (gap junction) genes in cell growth control and carcinogenesis.

C. R. Acad. Sci. III **322**(2-3): 151-159.

**Yoshizaki G., und Patino, R.** (1995)

Molecular cloning, tissue distribution and hormonal control in the ovary of Cx41 mRNA, a novel xenopus connexin gene transcript.

Mol. Reprod. Dev. **42**: 7-18.

**Zahng, J-T, und Nicholson, B. J.** (1989)

Sequence and tissue distribution of a second protein in hepatic gap junctions, Cx26, as deduced from its cDNA.

J. Cell Biol. **109**: 3391-33401.

## 7. Anhang

Ausführlichere Angaben, insbesondere zu im Ergebnisteil als Grafiken präsentierten Versuchsauswertungen.

### Experiment I

Daten aus der MOSYS-Auswertung der G-6-Pase-negativen Läsionen.

Größenklassenverteilung, Mittelwerte der Versuchsgruppen für die jeweilige Zahl der Läsionen je cm<sup>3</sup>.

Obergrenzen der Durchmesserklassen steigen logarithmisch von Größenklasse 1 (GK01), antilog 2,0 (100 µm), GK02, antilog 2,1 (126µm) bis GK17, antilog 3,6 (3981 mm).

16 Wochen nach DEN

Stamm	C3H	C3H	C57BL	C57BL
Cx32-Genotyp	KO	WT	KO	WT
Tierzahl	8	7	6	7
GK01	37,22	281,51	47,75	88,54
GK02	378,00	132,37	186,60	124,50
GK03	326,86	406,56	269,47	171,14
GK04	343,62	184,59	260,48	56,20
GK05	179,34	210,64	239,83	58,37
GK06	146,90	171,23	115,23	50,17
GK07	222,48	18,94	110,10	0,00
GK08	113,50	26,91	41,25	7,74
GK09	118,52	7,89	18,35	0,00
GK10	42,12	3,01	3,67	0,00
GK11	7,26	2,90	0,00	0,00
GK12	0,00	2,04	0,00	0,00
GK13	2,38	0,00	0,00	0,00
GK14	0,00	0,00	0,00	0,00

Stamm	C3H	C3H	C57BL	C57BL
GK15	0,00	0,00	0,00	0,00
GK16	0,00	0,00	0,00	0,00
GK17	0,00	0,00	0,00	0,00

## 21 Wochen nach DEN

Stamm	C3H	C3H	C57BL	C57BL
Cx32-Genotyp	KO	WT	KO	WT
Tierzahl	4	6	4	7
GK01	6,00	0,00	31,35	0,00
GK02	116,75	138,03	56,50	65,74
GK03	99,45	107,73	98,20	161,86
GK04	212,05	262,88	206,53	63,50
GK05	201,48	142,40	160,93	83,53
GK06	235,23	102,05	167,75	64,80
GK07	158,23	58,97	144,45	75,86
GK08	252,73	41,28	138,85	7,83
GK09	60,00	25,10	83,65	12,77
GK10	100,08	32,52	46,43	0,00
GK11	67,40	10,78	20,40	0,00
GK12	8,65	7,13	6,53	0,00
GK13	12,65	0,00	0,00	0,00
GK14	0,00	0,00	0,00	0,00
GK15	0,00	0,00	1,83	0,00
GK16	0,00	0,00	0,00	0,00
GK17	0,00	0,00	0,00	0,00

## Anhang

26 Wochen nach DEN

Stamm	C3H	C3H	C57BL	C57BL
Cx32-Genotyp	KO	WT	KO	WT
Tierzahl	5	6	6	10
GK01	0,00	0,00	20,27	5,41
GK02	30,16	98,02	37,95	65,99
GK03	21,80	170,85	246,15	201,33
GK04	97,56	241,92	209,62	164,84
GK05	118,04	229,27	184,63	187,79
GK06	91,82	220,27	173,93	63,75
GK07	115,38	80,72	69,83	89,37
GK08	71,94	79,52	73,00	54,47
GK09	86,94	88,75	64,28	21,48
GK10	51,74	52,57	73,95	9,18
GK11	82,64	18,28	65,00	10,76
GK12	60,16	14,58	17,90	4,36
GK13	45,34	0,00	4,98	0,85
GK14	19,88	1,30	2,83	0,83
GK15	9,42	0,00	0,77	0,58
GK16	2,90	0,00	0,85	0,00
GK17	0,68	0,00	0,00	0,00

### Experiment I

Daten aus der MOSYS-Auswertung der G-6-Pase-negativen Läsionen.

Zahl der Läsionen je cm<sup>3</sup> Lebergewebe (nach Fullman und Saltykov) und Volumenanteil der Läsionen am Lebervolumen Mittelwerte (%-Vol.). Aufgeführt sind die Mittelwerte für die jeweiligen Versuchsgruppen.

Tierzahl	Stamm	Cx32-Genotyp	Wochen nach DEN	Inseln	%-Vol,	Fullman	Saltykov
5	C3H	KO	16	38	5,1	1504	1501
7	C3H	WT	16	19	1,2	1009	1016
6	C57BL	KO	16	20	1,3	943	946
7	C57BL	WT	16	5	0,2	339	340

Tierzahl	Stamm	Cx32-Genotyp	Wochen nach DEN	Inseln	%-Vol,	Fullman	Saltykov
4	C3H	KO	21	48	11,9	1168	1176
6	C3H	WT	21	20	2,9	595	591
4	C57BL	KO	21	34	6,2	905	891
7	C57BL	WT	21	9	0,6	359	350

Tierzahl	Stamm	Cx32-Genotyp	Wochen nach DEN	Inseln	%-Vol,	Fullman	Saltykov
5	C3H	KO	26	59	41,7	690	680
6	C3H	WT	26	34	6,1	919	907
6	C57BL	KO	26	41	11,8	928	925
10	C57BL	WT	26	22	2,9	619	615

## Experiment II

Daten aus der MOSYS-Auswertung der G-6-Pase-negativen Läsionen unter Berücksichtigung des Cx32-Phänotypes, geordnet nach Zeitpunkten.

Größenklassenverteilung.

24 Wochen

Radius der Größenklassen in $\mu\text{m}$	50	79	125	199	315	499	791	1253	1986
n/cm <sup>3</sup> , Cx32-negativ	28	27,6	40	37,6	17,3	0	0	0	0
n/cm <sup>3</sup> , Cx32-positiv	69,1	30,2	115,2	77,8	30,5	0	0	0	0
n/cm <sup>3</sup> , Cx32-gemischt	0	0	0	81,2	39,4	0	0	0	0

## Anhang

### 31 Wochen

Radius der Größenklassen in $\mu\text{m}$	50	79	125	199	315	499	791	1253	1986
n/cm <sup>3</sup> , Cx32-negativ	0	70,3	45,1	6	22,5	15,3	0	0	0
n/cm <sup>3</sup> , Cx32-positiv	7,7	118,3	108,7	15,1	23	14,7	4,8	0	0
n/cm <sup>3</sup> , Cx32-gemischt	0	36	0	28,3	13,1	26,9	0	0	0

### 42 Wochen

Radius der Größenklassen in $\mu\text{m}$	50	79	125	199	315	499	791	1253	1986
n/cm <sup>3</sup> , Cx32-negativ	0	4,6	0	38,5	18,3	7,1	3	1	0
n/cm <sup>3</sup> , Cx32-positiv	0	0	26,6	28,9	22,8	35,9	12,9	1,5	0
n/cm <sup>3</sup> , Cx32-gemischt	0	10,2	0	17,6	10,1	21,2	45,4	11,3	1,6

## Experiment II

Daten aus der MOSYS-Auswertung der G-6-Pase-negativen Läsionen unter Berücksichtigung des Cx32-Phänotypes.

Zahl der Anschnitte (Ansch), Zahl der Läsionen je cm<sup>3</sup> (n/cm<sup>3</sup>; nach Saltykov) und Anteil der Läsionen am Lebergewebe (rel. Vol.).

Zeit		Cx+			Cx-			Cx+/-		
Wochen	Tier	Ansch	n/cm <sup>3</sup>	rel. Vol [%]	Ansch	n/cm <sup>3</sup>	rel. Vol [%]	Ansch	n/cm <sup>3</sup>	rel. Vol [%]
24	CS15	3	64	0,21%	2	73	0,05%	5	79	0,83%
	CS16	8	288	0,49%	4	118	0,37%	4	87	0,34%
	CS17	11	395	0,92%	2	111	0,14%	2	49	0,15%
	CS18	4	118	0,36%	4	93	0,43%	4	75	0,76%
	su	26	865		12	395		15	290	
	MW	6,50	216,25	0,50	3,00	98,75	0,25	3,75	72,50	0,52

Zeit		Cx+			Cx-			Cx+/-		
	SD	3,70	152,68	0,31	1,15	20,14	0,18	1,26	16,44	0,33
31	CS19	6	179	1,60%	3	106	0,22%	3	29	1,66%
	CS20	5	236	0,74%	1	23	0,14%	4	83	0,88%
	CS21	3	512	0,27%	2	121	1,47%	1	36	0,86%
	CS22	5	167	0,57%	3	91	0,65%	3	99	0,46%
	su	19	1094		9	341		11	247	
	MW	4,75	273,50	0,80	2,25	85,25	0,62	2,75	61,75	0,97
	SD	1,26	161,82	0,57	0,96	43,27	0,61	1,26	34,52	0,50
42	CS23	14	179	5,51%	1	21	0,06%	9	60	10,31%
	CS24	9	65	9,93%	5	63	2,70%	12	69	14,37%
	CS25	8	106	4,45%	3	99	0,30%	16	177	25,54%
	CS26	13	136	7,16%	3	33	1,28%	17	92	28,90%
	CS27	5	78	1,15%	1	20	0,06%	8	43	6,82%
	CS28	5	121	1,01%	2	29	0,51%	8	90	9,15%
	CS29	2	31	1,03%	6	139	1,32%	20	206	19,26%
	CS30	8	108	4,00%	2	31	0,58%	6	42	6,95%
	CS31	1	15	0,69%	4	127	1,84%	3	36	4,12%
	su	65	839		27	562		99	815	
	MW	7,22	93,22	3,88	3,00	62,44	0,96	11,00	90,56	13,94
	SD	4,47	51,67	3,25	1,73	47,25	0,90	5,63	61,03	8,80

Summe su, Mittelwert MW und Standardabweichung SD.

## Experiment II

Daten zum Vergleich der Häufigkeit Ki-67-positiver Zellkerne in Cx32-positiven und Cx32-negativen Arealen von Läsionen mit gemischtem Cx32-Phänotyp.

Anhang

Flächen [mm<sup>2</sup>] im Schnitt aus Flächen auf dem Tablett berechnet.

Vergrößerung: 347-fach.

$$F_{\text{Schnitt}} = F_{\text{Tablett}} / (347 \times 347).$$

Tier	Cx32-negative Areale					Cx32-positive Areale				
	Fläche Tablett	Fläche Schnitt	Kerne	Kerne/ Fläche	Mw K/F	Fläche Tablett	Fläche Schnitt	Kerne	Kerne/ Fläche	Mw K/F
COX27	6449	0,05356	5	93,4						
	5737	0,04765	9	188,9		1821	0,01512	2	132,2	
	14300	0,11876	8	67,4	116,5					
	10024	0,08325	2	24,0		1375	0,01142	1	87,6	
	4052	0,03365	6	178,3		18604	0,15451	9	58,2	72,9
	2260	0,01877	4	213,1	138,5					
	8583	0,07128	3	42,1		11306	0,09390	18	191,7	
	6551	0,05441	1	18,4						
	23357	0,19398	10	51,6						
	15773	0,13100	9	68,7	45,2					
	28299	0,23502	14	59,6		22717	0,18867	0	0,0	
	20194	0,16771	18	107,3		6813	0,05658	0	0,0	0,0
	6191	0,05142	3	58,3	75,1					
	19719	0,16377	11	67,2		3675	0,03052	1	32,8	
	5643	0,04687	1	21,3	44,3					
	12304	0,10219	3	29,4		23516	0,19530	5	25,6	
	7020	0,05830	3	51,5		2771	0,02301	6	260,7	143,2
	8646	0,07181	6	83,6	54,8					
COX23	18603	0,15450	7	45,3		15592	0,12949	7	54,1	
	861	0,00715	1	139,8	92,6					
	4183	0,03474	1	28,8		22102	0,18356	1	5,4	
	6069	0,05040	5	99,2		37155	0,30857	3	9,7	
	2102	0,01746	1	57,3		20604	0,17112	4	23,4	
	1279	0,01062	0	0,0		54947	0,45634	11	24,1	
	2025	0,01682	0	0,0		34100	0,28320	5	17,7	
	3662	0,03041	1	32,9		20107	0,16699	6	35,9	

Tier	Fläche Tablett	Fläche Schnitt	Kerne	Kerne/ Fläche	Mw K/F	Fläche Tablett	Fläche Schnitt	Kerne	Kerne/ Fläche	Mw K/F
	1165	0,00968	0	0,0	31,2	18386	0,15270	12	78,6	27,8
COX26	40833	0,33912	16	47,2		11488	0,09541	11	115,3	
	11508	0,09557	2	20,9						
	10296	0,08551	5	58,5	42,2					
COX24	32665	0,27128	5	18,4		14798	0,12290	2	16,3	
	63796	0,52983	8	15,1						
	15444	0,12826	4	31,2						
	39882	0,33122	8	24,2						
	70950	0,58924	7	11,9	20,1					
COX26	24880	0,20663	8	38,7		1552	0,01289	1	77,6	
	21693	0,18016	8	44,4		1417	0,01177	0	0,0	
	3908	0,03246	1	30,8		5792	0,04810	3	62,4	
	2961	0,02459	1	40,7		4627	0,03843	1	26,0	
	1502	0,01247	2	160,3		20905	0,17362	18	103,7	
	7501	0,06230	1	16,1		5027	0,04175	1	24,0	48,9
	4287	0,03560	0	0,0						
	24517	0,20361	9	44,2	46,9					
	11236	0,09332	7	75,0		9921	0,08239	10	121,4	
	8642	0,07177	10	139,3		1599	0,01328	0	0,0	
	53435	0,44378	24	54,1		5431	0,04510	6	133,0	
	5635	0,04680	5	106,8		29468	0,24473	9	36,8	
	21543	0,17892	8	44,7		9601	0,07974	1	12,5	60,7
	13675	0,11357	5	44,0						
	6630	0,05506	7	127,1	84,4					
	4132	0,03432	3	87,4		18142	0,15067	14	92,9	
	18470	0,15339	17	110,8		2739	0,02275	3	131,9	112,4
	12440	0,10331	9	87,1						
	5947	0,04939	1	20,2	76,4					
	3344	0,02777	0	0,0		19008	0,15786	5	31,7	
	4185	0,03476	0	0,0		16145	0,13408	6	44,7	
	5964	0,04953	1	20,2		12618	0,10479	1	9,5	
	3868	0,03212	0	0,0		11190	0,09293	5	53,8	

Anhang

Tier	Fläche Tablett	Fläche Schnitt	Kerne	Kerne/ Fläche	Mw K/F	Fläche Tablett	Fläche Schnitt	Kerne	Kerne/ Fläche	Mw K/F
	4471	0,03713	9	242,4		7706	0,06400	4	62,5	40,5
	1114	0,00925	0	0,0						
	1476	0,01226	4	326,3						
	1507	0,01252	3	239,7	103,6					
COX29	1722	0,01430	0	0,0		57103	0,47424	10	21,1	
	743	0,00617	1	162,1	81,0	11726	0,09738	1	10,3	
						36110	0,29989	13	43,3	
						4360	0,03621	4	110,5	46,3
COX27	15528	0,12896	1	7,8		3127	0,02597	3	115,5	
	8104	0,06730	4	59,4		3609	0,02997	1	33,4	
	11924	0,09903	2	20,2		2412	0,02003	0	0,0	
	6871	0,05706	2	35,0		2062	0,01712	1	58,4	
	11886	0,09871	7	70,9		1527	0,01268	3	236,6	88,8
	3258	0,02706	2	73,9	44,5					
COX26	29112	0,24178	16	66,2		1986	0,01649	1	60,6	
	39337	0,32669	10	30,6		14333	0,11904	8	67,2	
	23586	0,19588	22	112,3		18836	0,15643	2	12,8	
	31485	0,26148	13	49,7		1036	0,00860	2	232,4	
	5797	0,04814	1	20,8	55,9	2059	0,01710	2	117,0	
						3047	0,02531	6	237,1	
						7171	0,05956	7	117,5	
						5862	0,04868	1	20,5	108,2
COX29	23621	0,19617	10	51,0		9892	0,08215	4	48,7	
	21890	0,18180	6	33,0		3494	0,02902	5	172,3	
	1779	0,01477	3	203,1		6604	0,05485	2	36,5	
	5978	0,04965	3	60,4	86,9	8275	0,06872	4	58,2	78,9

Mittelwert und Standardabweichung der Ki-67-positiven Kerne pro mm<sup>2</sup> in Cx32-negativen Läsionsarealen: 69 ± 31.

Mittelwert und Standardabweichung der Ki-67-positiven Kerne pro mm<sup>2</sup> in Cx32-positiven Läsionsarealen: 76 ± 50.

**Experiment IIIa**

Effekt von PB auf die Tumormultiplizität. Die Daten resultieren aus der Gesamtzahl der makroskopisch sichtbaren Tumoren je Größenklasse, geteilt durch die Zahl der Tiere je Gruppe.

Tumorgrößen- klasse (mm)#	Cx32 <sup>Y/+</sup>		x-fache Änderung	Cx32 <sup>Y/-</sup>		x-fache Änderung
	minus PB n=17	plus PB n=9		minus PB n=15	plus PB n=14	
0 bis 2	1.88	2.33	1.2	3.47	7.71	2.2
3 bis 6	1.06	0.89	0.8	1.00	1.79	1.8
7 bis 9	0.12	0.78	6.6	0.33	0.21	0.6
≥ 1	0.12	0.67	5.7	0.33	0.29	0.9

# Mäuse mit Polyadenomatosis wurden von der Analyse ausgeschlossen, da eine Quantifizierung nicht möglich war.

**Experiment IIIa**

Effekt von PB auf die Zahl und den Volumenanteil G-6-Pase-defizienter Läsionen in der Leber.

Daten aus der MOSYS-Auswertung der G-6-Pase-negativen Läsionen; Mittelwerte und Standardabweichungen der jeweiligen Versuchsgruppen.

Zahl der Läsionen je cm<sup>3</sup> (Zahl/cm<sup>3</sup>; nach Saltykov) und Anteil der Läsionen am Lebergewebe; PB: Phenobarbitalbehandlung.

			G6Pase-defiziente Läsionen	
Genotyp Cx32	PB	Tierzahl	Zahl/cm <sup>3</sup>	Volumenanteil an der Leber (%)
Y/+	-	16	161 +/- 104	6.4 +/- 5.7
Y/+	+	15	332* +/- 135	31.6* +/- 18.1

## Anhang

			G6Pase-defiziente Läsionen	
Y/-	-	13	184 +/- 179	14.6 +/- 19.2
Y/-	+	15	304 <sup>**</sup> +/- 122	14.2 +/- 6.9

\*/\*\*signifikanter Unterschied zu Mäusen ohne PB-Behandlung: \* p=0.0003; \*\* p<0.02 (Wilcoxon Rank Sum Test)

### Experiment IIIb

Effekt von PB auf die Zahl und den Volumenanteil G-6-Pase-defizienter Läsionen in der Leber.

Daten aus der MOSYS-Auswertung der G-6-Pase-negativen Läsionen; Mittelwerte und Standardabweichungen der jeweiligen Versuchsgruppen.

Zahl der Läsionen je cm<sup>3</sup> (Zahl/cm<sup>3</sup>; nach Saltykov) und Anteil der Läsionen am Lebergewebe; PB: Phenobarbitalbehandlung.

			G-6-Pase-defiziente Läsionen	
Genotyp Cx32	PB	Tierzahl	Zahl/cm <sup>3</sup>	Volumenanteil an der Leber (%)
Y/+	-	10	768 +/- 350	15.6 +/- 9.4
Y/+	+	12	888 +/- 297	12.4 +/- 5.6
Y/-	-	18	898 +/- 371	49.8 +/- 14.3
Y/-	+	16	759 +/- 254	26.7 <sup>*</sup> +/- 16.1

\*signifikanter Unterschied zu Cx32<sup>Y/-</sup>-Mäusen ohne PB-Behandlung (p=0.0007; Wilcoxon Rank Sum Test)

**Experiment IIIc**

Effekt von PB auf das relative Lebergewicht und fremdstoffmetabolisierende Enzyme in der Leber (Cytochrom P-450 und Cytochromb5).

Mittelwerte und Standardabweichungen für die Versuchsgruppen.

Genotyp	PB	Tierzahl	Rel. Lebergew. (%)	CYP450 (nmol/mg protein)	CYPb5 (nmol/mg protein)
Cx32					
Y/+	-	3	4.9 +/- 0.25	0.67 +/-0.10	0.34 +/-0.07
Y/+	+	2 <sup>a</sup>	5.6* (5.7, 5.5)	1.82** (1.63, 2.0)	0.70** (0.66, 0.74)
Y/-	-	3	4.3 +/- 0.86	0.88 +/- 0.12	0.41 +/- 0.05
Y/-	+	3	6.3* +/- 0.60	1.92** +/- 0.13	0.78* +/- 0.21

<sup>a</sup> ein Tier konnte wegen eines spontanen Lebertumors nicht in die Auswertung einbezogen werden.  
 \*/\*\*signifikante Unterschiede zu den jeweiligen Kontrollgruppen: \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$  (Student's *t*-Test).

## **Akademische Lehrer**

Ammon	Meder-Kindler
Anderer	Metzner
Baumgarten	Minas
Bick	Müller
Bisswanger	Münzel
Bock	Oberhammer
Boeddeker	Oelkrug
Bohley	Pfeifer
Boos	Prüß
Breyer-Pfaff	Radu
Broecker	Reinecke
Buchmann	Reininger
Eisele	Reuter
Frank	Riepe
Fröhlich	Schrenk
Gauglitz	Schwarz
Gebhardt	Stegmeyer
Goldschmidt	Sucrow
Grote	vom Ende
Günzel	Warnecke
Hagemann	Wegmann
Hagenmaier	Werringloer
Hamprecht	Weser
Haupt	Wettler
Hempel	Wiesinger
Jäger	Wolf
Kaiserling	
Kettrup	
Kissling	
Koch	
Konig	
Krause	
Lendermann	
Lorenz	
Marsmann	
Mecke	