

Aus dem Institut für Pathologie
der Medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

**Die Rolle von Syndecan-1 in der lokalen Invasion
kolorektaler Karzinome**

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Doktorgrades
Dr. med.
(doctor medicinae)

an der Medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

vorgelegt von
aus
Magdeburg

Annekatri Wiedemann
Magdeburg
2013

Dokumentationsblatt

Bibliographische Beschreibung

Wiedemann, Annekatriin:

Die Rolle von Syndecan-1 in der lokalen Invasion kolorektaler Karzinome.

2013. 60 Bl.: 18 Abb., 9 Tab., 4 Anl.

Kurzreferat

Das kolorektale Karzinom (KRK) ist der zweithäufigste maligne Tumor in Deutschland. Trotz verbesserter Therapie gibt es weiterhin eine Gruppe an Tumoren, bei denen es zu beschleunigter Progression trotz frühem Tumorstadium kommt. Dafür werden insbesondere veränderte Eigenschaften der Tumorzelle an der Invasionsfront verantwortlich gemacht. Die Rolle des membranständigen Heparansulfat-Proteoglykans Syndecan-1 (Syn-1) im lokalen Tumorinvasions- und Metastasierungsprozess des KRK wurde in dieser Arbeit analysiert. Es erfolgte die Syn-1-Detektion an 177 KRK einschließlich ihrer Invasionsfronten und 32 dazugehörigen Organmetastasen, 107 Fällen korrespondierender unauffälliger Kolonmukosa sowie an 97 kolorektalen Adenomen und 14 Frühkarzinomen. Dabei erbrachte der Vergleich des Tumorzentrums mit der Invasionsfront eine signifikante Reduktion der Syn-1-Expression an der Invasionsfront. In Korrelation mit den klinisch-pathologischen Daten zeigte sich ein signifikanter Unterschied der Syn-1-Expression in Bezug auf Tumorstadium, Invasionstyp und Buddingtyp. Bei Analyse der kolorektalen Adenomzonen von apikal nach basal sowie in Gegenüberstellung mit lokal begrenzten Frühkarzinomen lies sich eine signifikante Syn-1-Reduktion bei höhergradiger Dysplasie und beginnender Invasion nachweisen. Des Weiteren wurde anhand von Kokulturen der Kolonkarzinomzelllinien mit tumorassoziierten Fibroblasten und Makrophagen die Rolle von Syn-1 im Tumorverband analysiert. Mittels Zellkulturassays konnte die Beteiligung von Syn-1 am Adhäsions-, Migrations- und Invasionsprozess des KRK gezeigt werden, so dass Syn-1 als kritischer Mediator der Tumorprogression im Kolonkarzinom angenommen werden kann.

Schlüsselwörter

Kolorektales Karzinom, kolorektales Adenom, Heparansulfat-Proteoglykane, Syndecan-1, Invasion, Immunhistochemie, Zellkulturassay

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	iii
Abkürzungsverzeichnis	vii
Abbildungsverzeichnis	x
Tabellenverzeichnis	xi
1. Einleitung.....	1
1.1. Das kolorektale Karzinom	1
1.1.1. Epidemiologie: Inzidenz, Alters- und Geschlechtsverteilung	1
1.1.2. Ätiologie und Risikogruppen	1
1.1.2.1. Umweltfaktoren.....	1
1.1.2.2. Kolorektale Adenome	2
1.1.2.3. Sporadisches kolorektales Karzinom	2
1.1.2.4. Hereditäre kolorektale Karzinome	2
1.1.2.5. Chronisch entzündliche Darmerkrankungen	3
1.1.3. Prophylaxe, Screening, Klinik	3
1.1.4. Lokalisation und pathohistologische Diagnostik	4
1.1.5. Therapie und Prognose	5
1.2. Heparansulfat-Proteoglycane	6
1.2.1. Struktur und biochemische Eigenschaften der Heparansulfat-Proteoglykane ...	6
1.2.2. Arten, Vorkommen und biologische Funktionen von Syndecanen.....	7
1.3. Syndecan-1	9
1.3.1. Struktur und biochemische Eigenschaften von Syndecan-1.....	9
1.3.2. Vorkommen und biologische Funktion von Syndecan-1.....	10
1.3.3. Funktion von Syndecan-1 im Kolon	11
1.3.4. Rolle von Syndecan-1 bei Metastasierung und an der Invasionsfront	12
1.4. Lokale Tumorinvasion und Metastasierung.....	13
1.5. Fragestellung.....	14

2. Material und Methoden	15
2.1. Material.....	15
2.1.1. Patientenkollektiv.....	15
2.1.1.1. Sporadische kolorektale Karzinome.....	15
2.1.1.2. Kolorektale Adenome und frühinvasive Kolonkarzinome	16
2.1.2. Pathohistologische Klassifikationen	16
2.1.3. Zelllinien	17
2.1.4. Chemikalien und Reagenzien	17
2.2. Methoden	17
2.2.1. Herstellung der Tissue Microarrays (TMA).....	17
2.2.2. Immunhistochemie.....	18
2.2.2.1. Immunhistochemische Detektion von Syndecan-1 in humanem Gewebe	18
2.2.2.2. Beurteilung der immunhistochemischen Färbungen	19
2.2.3. Zellkultur.....	20
2.2.3.1. Monokultur humaner Zelllinien.....	20
2.2.3.2. Kokultur-Kulturansatz und Zelltrennung.....	21
2.2.3.3. Kultur auf Matrigelbeschichtung.....	21
2.2.4. RNA-Analytik	22
2.2.4.1. Präparation von Gesamt-RNA aus Zellen und Frischgewebe	22
2.2.4.2. Reverse Transkription.....	22
2.2.5. DNA-Analytik	23
2.2.5.1. Semiquantitative Polymerase-Kettenreaktion	23
2.2.5.2. Quantitative Polymerase-Kettenreaktion.....	23
2.2.5.3. Agarose-Gelelektrophorese	25
2.2.6. Proteinchemische Methoden	25
2.2.6.1. Proteinextraktion.....	25
2.2.6.2. Proteinquantifizierung.....	25
2.2.6.3. ELISA	26
2.2.7. Funktionelle in-vitro-Untersuchungen (Zellkulturassays).....	26

2.2.7.1.	Hemmung von Syn-1-mRNA mittels siRNA-Transfektion.....	26
2.2.7.2.	Etablierung der siRNA-Transfektion an humanen Kolonzelllinien	26
2.2.7.3.	Adhäsionsassay	27
2.2.7.4.	Migrationsassay.....	27
2.2.7.5.	Invasionsassay	28
2.2.8.	Statistische Auswertung und Fotodokumentation	28
3.	Ergebnisse.....	30
3.1.	Charakterisierung des Untersuchungskollektivs.....	30
3.1.1.	Sporadisches kolorektales Karzinom	30
3.1.2.	Kolorektales Adenom und frühinvasive Kolonkarzinome.....	31
3.2.	Immunhistochemische Expressionsanalysen.....	31
3.2.1.	Validierung der TMAs und der Gesamtpräparate.....	31
3.2.2.	Beurteilung der immunhistochemischen Färbung von Syndecan-1.....	34
3.2.3.	Ergebnisse der immunhistochemischen Analysen	35
3.2.3.1.	Expression der nichttumorösen Kolonmukosa	35
3.2.3.2.	Expression der Organ- und Lymphknotenmetastasen	35
3.2.3.3.	Expression im Kolonkarzinom.....	36
3.2.3.4.	Zonale Expression im Kolonkarzinom.....	39
3.2.3.5.	Syndecan-1-Expression im Kolonkarzinom und Prognose.....	40
3.2.3.6.	Korrelation der immunhistochemischen Expression mit dem mRNA- sowie Proteingehalt von Syndecan-1	41
3.2.3.7.	Kolorektales Adenom.....	42
3.3.	Molekularbiologische Untersuchungsergebnisse (in-vitro-Ergebnisse).....	43
3.3.1.	Charakterisierung der humanen Zelllinien.....	43
3.3.2.	mRNA-Expression von Syndecan-1 in humanen Tumorzelllinien.....	45
3.3.2.1.	mRNA-Expression von Syndecan-1 in Monokultur	45
3.3.2.2.	mRNA-Expression von Syndecan-1 in Kokultur	45
3.3.3.	Einfluss von Matrigel™ auf die Syndecan-1-mRNA-Expression.....	46
3.3.4.	Funktionelle Zellkulturassays.....	46

3.3.4.1.	Adhäsionsassay	46
3.3.4.2.	Migrationsassay.....	47
3.3.4.3.	Invasionsassay	48
4.	Diskussion	50
4.1.	Patientenkollektiv, klinisch-pathologische Daten und Prognosefaktoren	50
4.2.	Syndecan-1 als Schutzenzym vor Tumorinvasion im kolorektalen Karzinom?	51
4.3.	Zellkulturanalysen: Funktion von Syndecan-1 in Kolonkarzinomzelllinien	53
4.4.	Syndecan-1–hässliches Entlein oder schöner Schwan?	58
5.	Zusammenfassung	59
	Literaturverzeichnis.....	61
	Danksagung	80
	Ehrenerklärung	81
	Lebenslauf	82
	Anlagen	83

Abkürzungsverzeichnis

Neben den Abkürzungen der Deutschen Rechtschreibung laut Duden und den SI-Einheiten wurden folgende Abkürzungen verwendet:

ADAM	a disintegrin and a metalloproteinase
APAF-1	apoptosis protease activating factor-1
APC-Gen	adenomatöses polyposis coli-Gen
BMI	Body-Mass-Index
bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumin (Rinderserumalbumin)
CAM	Zelladhäsionsmolekül
CD	cluster of differentiation (Zelloberflächenantigene)
cDNA	copy Desoxyribonukleinsäure
CEA	carcinoembryogenes Antigen
COX	Cyclooxygenase
CS	Chondroitinsulfat
DCC	Deleted in Colorectal Cancer (Onkogen)
DEPC-Wasser	Diethylpyrocarbonat-Wasser, auch RNase-freies Wasser
dH₂O	destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
ECM	extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	epidermal growth factor receptor
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ERK	Extracellular-signal Regulated Kinases
<i>et al.</i>	<i>et alteres</i>
FAP	familiäre adenomatöse Polyposis
FBS	Fetal Bovine Serum
FGF	Fibroblast Growth Factor
FOBT	faecal occult blood testing
GAG	Glykosaminoglykan
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony-stimulating factor
GPI	Glycophosphatidyl-Inositol
HE	Hämatoxylin-Eosin
HEV	Hepatitis-E-Virus

HGF	Hepatocyte Growth Factor
HGIN	high grade intraepitheliale Neoplasie
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HNPCC	hereditäres kolorektales Karzinom
HPV	humanes Papillomvirus
HRP	horse radish peroxidase (Meerrettichperoxidase)
HS	Heparansulfat
HSPG	Heparansulfat-Proteoglycane
HSV	Herpes simplex-Virus
I	Intensität der Färbung
ICAM	Intercellular Adhesion Molecule
Ig	Immunglobulin
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
IFN-γ	Interferon gamma
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
IRS	immunreaktiver Score
kDa	Kilo-Dalton
k-ras	Kirstin-ras (Onkogen)
KRK	Kolorektales Karzinom
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium; Nährmedium zur Bakterienkultivierung
LGIN	low grade intraepitheliale Neoplasie
M	Molarität
MACS	Magnetic Activating Cell Sorting
MAP-Kinase	mitogen-activated protein-Kinase
min-max	Minimum-Maximum
MMP	Matrix-Metalloproteinase
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MW	Mittelwert
p	Kurzer Arm eines Chromosoms
P	Prozentualer Anteil positiv gefärbter Zellen
PBS	phosphate buffered saline (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDZ	stehend für PSD-95, Disc large und Zonula occludens-1 Protein
PG	Proteoglycane
PIP₂	Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphat
PKC-α	Proteinkinase C- α
q	Langer Arm eines Chromosoms

RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
ROC	Receiver Operating Characteristic
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
SDF-1/CXC12	stromal cell-derived factor 1 oder CXC-Motiv-Chemokin 12
siRNA	small interfering RNA
SOC-Medium	SOB (Super Optimal Broth)-Medium unter Zusatz von 20 mM Glucose; Bakteriennährmedium
Syn	Syndecan
Tab.	Tabelle
TACE	tumor-necrosis-factor-alpha-converting enzyme
TBE	Tris/Borat/EDTA-Puffer
TGF-β	Transforming Growth Factor- β
TIMP	Tissue Inhibitors of Metalloproteinases (Gewebeinhibitoren der Metalloproteinasen)
TMA	Tissue Microarray
TNF-α	Tumor Necrosis Factor- α
TNM	Tumorklassifikationssystem (Tumor, Nodes, Metastasis)
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-aminomethan
UICC	Union International Contre Cancer
U/min	Umdrehungen/ Minute
uPAR	Urokinase-Plasminogenaktivator Rezeptor
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
Vol	Volumen
WHO	World Health Organization
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Lokalisation des KRK.	4
Abb. 2.1: Querschnitt eines Transwell-Chambers.	28
Abb. 3.1: Übersichtsscan des TMA mit den Karzinomfällen Nr. 1-37, 4 Einzelstanzen des Karzinomfalles Nr. 32 sowie ein exemplarischer Ausschnitt aus Stanze 2.....	31
Abb. 3.2: Immunhistochemische Reaktion von Syn-1.....	35
Abb. 3.3: Syn-1-Expression im Nichttumorgewebe.....	35
Abb. 3.4: Syn-1-Expression im Tumorepithel einer Lebermetastase (A) bzw. Lymphknotenmetastase (B).	36
Abb. 3.5: Syn-1-Expression der unterschiedlichen Tumorzonen.	39
Abb. 3.6: Graphische Darstellung der Gesamtüberlebenswahrscheinlichkeit.	40
Abb. 3.7: Syn-1-mRNA- (A) sowie Syn-1-Proteingehalt (B) im Tumorzentrum bei geringer und hoher immunhistochemischer Syn-1-Expression.....	41
Abb. 3.8: Syn-1-Expression in den einzelnen Zonen des kolorektalen Adenoms.....	42
Abb. 3.9: Syn-1 in den Zonen des kolorektalen Adenoms.	43
Abb. 3.10: Morphologie der Kolonzelllinien HT-29 (A) und HCT 116 (B).	44
Abb. 3.11: Vergleichende graphische Darstellung der humanen Kolonzelllinien HT-29 und HCT 116 bezüglich ihres Migrations-, Invasions- und Adhäsionsverhaltens in in-vitro-Zellkulturassays.	44
Abb. 3.12: mRNA-Expression von Syn-1 in der Mono- und Kokultur von HT-29 und HCT 116 sowie der Makrophagenlinie THP-1.	45
Abb. 3.13: mRNA-Expression von Syn-1 nach Kultur ohne und mit Matrigel™-Beschichtung in den Zelllinien HT-29 und HCT 116.	46
Abb. 3.14: Adhäsionsverhalten der Kolonkarzinomzellen HT-29 (A) und HCT 116 (B) nach 60 min.....	47
Abb. 3.15: Migrationsverhalten der Zelllinien HT-29 (A) und HCT 116 (B) in Mono- und Kokultur.	48
Abb. 3.16: Invasionsverhalten der Zelllinien HT-29 (A) und HCT 116 (B) in Mono- und Kokultur.	49

Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1: Semiquantitative Auswertung der Syn-1-Proteinexpression.....	19
Tab. 2.2: Primer der PCR.	23
Tab. 3.1: Klinisch-pathologische Daten des Karzinomkollektivs in Bezug auf das Gesamtüberleben.	32
Tab. 3.2: Klinisch-pathologische Daten des Karzinomkollektivs in Bezug auf das krankheitsfreie Überleben.	33
Tab. 3.3: Klinisch-pathologische Daten und immunhistochemische Expression von Syn-1 in den kolorektalen Karzinomen.....	38
Tab. 3.4/ 3.5: Gesamtüberlebenszeit bzw. Krankheitsfreie Überlebenszeit in Abhängigkeit von der immunhistochemischen Expression von Syn-1 in Tumorzentrum und Invasionsfront.	40
Tab. 3.6: Korrelation der immunhistochemischen (IHC) Syn-1-Expression mit dem mRNA- sowie Proteingehalt von Syn-1 im Tumorzentrum.	41
Tab. 3.7: Klinisch-pathologische Daten und immunhistochemische Expression von Syn-1 im kolorektalen Adenom.	42

1. Einleitung

1.1. Das kolorektale Karzinom

1.1.1. Epidemiologie: Inzidenz, Alters- und Geschlechtsverteilung

Das kolorektale Karzinom (KRK) gehört zu den häufigsten tumorösen Erkrankungen weltweit. In Deutschland ist es sogar das zweithäufigste maligne Geschwulst nach dem Bronchialkarzinom beim Mann und dem Mammakarzinom bei der Frau. Die Inzidenz wird in Deutschland für Frauen auf 36.000 und für die männliche Bevölkerung auf 37.000 Neuerkrankungen pro Jahr geschätzt [225]. Im internationalen Vergleich liegt Deutschland damit an erster Stelle der Anzahl an Neuerkrankungen bei den Frauen, bei den Männern an zweiter. Seit den letzten 30 Jahren hat die Inzidenz des KRK in den Industrienationen stetig zugenommen und ist in den letzten 10 Jahren relativ konstant geblieben. Im Gegensatz zur Anzahl der Neuerkrankungen nimmt die Mortalitätsrate für beide Geschlechter aufgrund verbesserter diagnostischer und therapeutischer Interventionen stetig ab. Dennoch ist das KRK in Deutschland unter den malignen Erkrankungen weiterhin die zweithäufigste Todesursache. Obwohl die kumulierte relative 5-Jahres-Überlebensrate bei 60 % liegt, bleibt ein Lebenszeitrisiko von 2,5 - 3 % an einem KRK zu sterben (Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland 2002).

Mit steigendem Alter erhöht sich das Risiko an einem Kolonkarzinom zu erkranken, wobei der Häufigkeitssgipfel zwischen der 7. und 8. Lebensdekade liegt. Im Mittel erkranken die Männer in einem Alter von 69 Jahren, Frauen mit 75 Jahren. Vor dem 40. Lebensjahr kommt das KRK mit unter 10 % relativ selten vor und ist dann bevorzugt mit einer genetischen Prädisposition oder chronisch entzündlichen Darmerkrankungen assoziiert [225].

1.1.2. Ätiologie und Risikogruppen

1.1.2.1. Umweltfaktoren

Faktoren, die die Entstehung des KRK begünstigen, sind unter anderem Lebens- und Ernährungsgewohnheiten wie Bewegungsarmut, ballaststoffarme Kost, vermehrter Genuss von rotem Fleisch, Alkohol- und Nikotinkonsum. Möglicherweise spielen dabei die Bildung von heterozyklischen Aminen während des Kochvorgangs von Fleisch bzw. die Stimulation höherer Level fekaler Gallensäure sowie die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies eine Rolle [41], [142]. Als weiterer Risikofaktor gilt die therapeutische Beckenbestrahlung [200]. Zu den protektiven Faktoren zählen der Konsum von Gemüse, Folsäure, Ballaststoffen sowie die Langzeiteinnahme von nichtsteroidalen Antirheumatika und eine Östrogensatztherapie [152].

1.1.2.2. Kolorektale Adenome

Bei dem kolorektalen Adenom, einer so genannten Vorläuferläsion des KRK, handelt es sich um eine intraepitheliale Neoplasie der Dickdarmschleimhaut. Makroskopisch kommen exophytisch wachsende, flache sowie eingesenkte Formen vor [100]. Histomorphologisch können ein tubuläres, tubulovillöses, villöses und serratiertes Adenom voneinander unterschieden werden. Abhängig vom Grad der Differenzierung wird das kolorektale Adenom nach der aktuellen WHO-Klassifikation (2000) in eine low grade und eine high grade intraepitheliale Neoplasie (LGIN und HGIN) eingeteilt [67]. Die Transformation vom präneoplastischen Adenom zum invasiven Karzinom erfolgt durch die Akkumulation verschiedener genetischer Alterationen nach der Adenom-Karzinom-Sequenz. Das molekularbiologische Modell (nach Vogelstein und Fearon) beschäftigt sich mit der Tumorgenese durch die schrittweise Aktivierung von Onkogenen und die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen [206], [49]. Für Patienten mit histologisch nachgewiesenem kolorektalen Adenom besteht ein erhöhtes Risiko an einem sporadischen KRK zu erkranken: bei multiplen Adenomen ($n \geq 3$) um das 4- bis 6-fache sowie bei Adenomen größer als 1 cm um das 4-fache [17], [2].

1.1.2.3. Sporadisches kolorektales Karzinom

Das sporadische kolorektales Karzinom ist die häufigste Form des KRK. Es weist eine genetische Heterogenität auf. Ihre genomische Instabilität, die zur Akkumulation von Genveränderungen mit folglich zur Zelldedifferenzierung, unkontrolliertem Zellwachstum und klonaler Tumorzellexpansion führt, basiert auf drei eigenständigen molekularen Pathomechanismen: Unterschieden werden hier die Entwicklungswege a) der Adenom-Karzinom-Sequenz mit konsekutiver chromosomaler Instabilität, b) der Mikrosatelliten-Instabilität sowie c) des CpG-Insel-Methylierungs-Phänotyps [82].

1.1.2.4. Hereditäre kolorektale Karzinome

Bei den hereditären kolorektalen Karzinomen handelt es sich um monogen erbliche Krankheiten, welche weniger als 5 % aller KRK ausmachen. Dazu gehören die familiäre adenomatöse Polyposis (FAP), die attenuierte familiäre adenomatöse Polyposis, das hereditäre kolorektales Karzinom ohne Polyposis (HNPCC) sowie hamartomatöse Polyposis-Syndrome wie das Peutz-Jeghers-Syndrom, die juvenile Polyposis coli und das Cowden-Syndrom.

Bei der FAP handelt es sich um eine Keimbahnmutation im APC-Gen auf dem langen Arm des Chromosom 5 (5q21-22) [64], bei der es zur Ausbildung von mehr als 100 kolorektalen

Adenomen kommt. Bleibt die FAP unbehandelt, ist mit einer nahezu 100%igen Entstehung eines KRK zu rechnen [34].

Das HNPCC-Syndrom wird nach anamnestischen Kriterien (Amsterdam-I- und -II-Kriterien, Bethesda-Kriterien) definiert. Dabei besitzen 80-90% der Patienten eine Mikrosatelliteninstabilität der Gene MLH1, MSH2, MSH6 oder PMS2, wobei Mutationsträger ein Lebenszeitrisiko von 60-80% haben ein KRK zu entwickeln [69], [204].

1.1.2.5. Chronisch entzündliche Darmerkrankungen

Patienten mit Colitis ulcerosa besitzen abhängig von Ausdehnung, Manifestationsalter, positiver Familienanamnese für KRK, Dauer der Erkrankung, Grad der Entzündung und dem Vorhandensein von Dysplasien sowie vom Auftreten einer zusätzlichen primär sklerosierenden Cholangitis [194] ein erhöhtes Kolonkarzinomrisiko. So konnte in der 30-Jahre-Analyse des St. Mark's Hospital (Harrow, UK) ein erhöhtes Neoplasie-Risiko bei lang bestehender Colitis ulcerosa mit 2,5%, 7,6% und 10,8% Erkrankungsrisiko nach 20, 30 und 40 Jahren detektiert werden [169].

Auch für Patienten mit Morbus Crohn ist das Risiko erhöht, an einem KRK zu erkranken, vor allem bei erhöhtem Alter zum Zeitpunkt der Erstdiagnose, langer Erkrankungsdauer und langstreckigem Kolonbefall [128], [15], [62].

1.1.3. Prophylaxe, Screening, Klinik

Prophylaxe

Als prophylaktische Lebensgewohnheiten wie regelmäßige körperliche Aktivität, Gewichtsreduktion bei übergewichtigen Personen ($BMI > 25 \text{ kg/m}^2$) [61], [104], Nikotinkarenz [26], [163] sowie Ernährungsempfehlungen wie erhöhte Ballaststoffaufnahme [18], [106], kein täglicher Verzehr von rotem bzw. verarbeitetem Fleisch [140], [219], täglicher Obst- und Gemüseverzehr [44], [195] und eine Limitierung des Alkoholkonsums [147]. Des Weiteren wird eine folsäure- und kalziumreiche Ernährung empfohlen [183], [99], [215].

Screening

Als Sekundärprävention bzw. Diagnostik gilt das Screening der asymptomatischen Bevölkerung (Allgemeinbevölkerung) ab dem 50. Lebensjahr, da ab diesem Alter die Inzidenz des KRK deutlich ansteigt [19]. Als Verfahren werden der jährliche FOBT (=faecal occult blood testing) (Guaiak-Test) bzw. die Koloskopie oder bei Ablehnung derer die Rektosigmoidoskopie in Kombination mit dem FOBT durchgeführt [16], [161]. Im Mittel konnte durch den Guaiak-Test eine 23%ige Senkung der KRK-Mortalität erreicht werden [198], [180]. In Kombination mit einer Polypektomie und dadurch Unterbrechung der

Adenom-Karzinom-Sequenz wird mittels der kompletten Koloskopie die KRK-Inzidenz um 66-90% gesenkt [212], [30]. Damit gilt die Koloskopie als der Goldstandard der Screeninguntersuchungen und Diagnostik des KRK.

Klinik

Häufig sind Patienten vor allem in frühen Erkrankungsstadien asymptomatisch. Als typische Symptome gelten Hämatochezie, Anämie und veränderte Stuhleigenschaften wie Opstipation, Diarrhoe, Tenesmen. Allgemeinsymptome wie Fieber, Nachtschweiß, Gewichtsverlust und Bauchschmerzen können vorkommen [123], [68]. Eine Ileus-Symptomatik oder Darmperforation sind Komplikationen bei fortgeschrittenen Tumorstadien.

1.1.4. Lokalisation und pathohistologische Diagnostik

Lokalisation

Mehr als die Hälfte der KRK finden sich in Rektum und Sigma distal der Flexura coli sinistra. Es zeigte sich allerdings in den letzten Jahrzehnten eine Zunahme der Inzidenz rechtsseitiger Dickdarmkarzinome [35], [158]. 40-60% der KRK sind im Rektum, ungefähr 20% im Colon sigmoideum, 13% im Caecum, 9% im Colon ascendens, 11% im Colon transversum sowie 6% im Colon descendens lokalisiert [175]. Die Verteilung des KRK auf die einzelnen Darmabschnitte ist in Abb. 1.1 dargestellt.

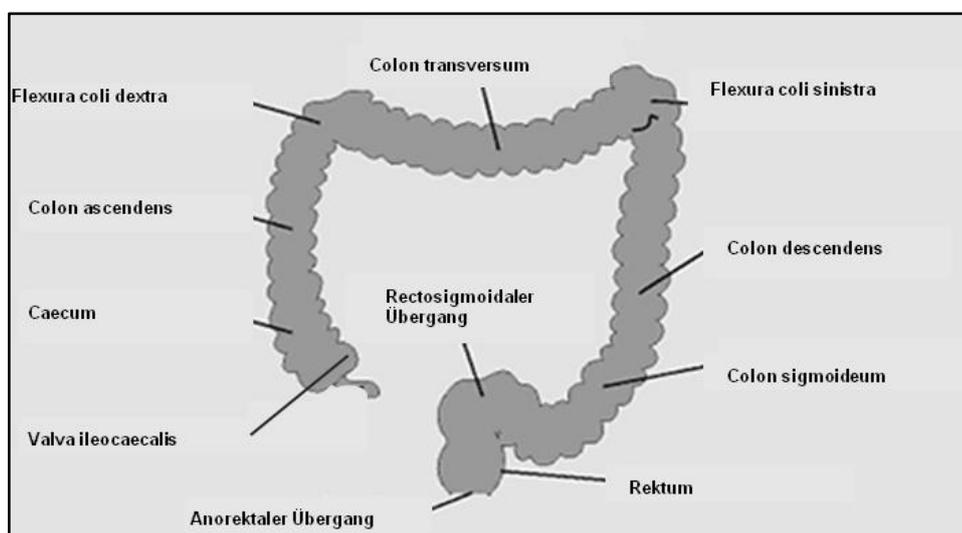


Abb. 1.1: Lokalisation des KRK (Einteilung nach WHO-Richtlinien) [179].

Makroskopie und Histopathologie

Makroskopisch kann das KRK in schüsselförmig ulzerierte, polypös wachsende und diffus infiltrierende (szirrhöse) Tumore eingeteilt werden [67].

Nach der histologischen WHO-Klassifikation wird zwischen Adeno-, muzinösen Adeno-, Siegelringzell-, kleinzelligen, Plattenepithel-, adenosquamösen, medullären und undifferenzierten Karzinomen unterschieden. Dabei besitzt das Adenokarzinom mit mehr als 90% den höchsten Anteil [67].

Tumorausdehnung, Grading und Staging

Das Tumorstadium bzw. die Tumorausdehnung werden durch die Beurteilung der Tumorgröße (T), des metastatischen Befalls von Lymphknoten (N) oder anderer Organe (=Fernmetastasen, M) nach der aktuellen TNM-Klassifikation der UICC erfasst. Des Weiteren werden die Lymphgefäß- und Veneninvasion [213], die Histologie des Tumorrandes, d.h. der Charakter der Invasionsfront [84], sowie die Fähigkeit des Tumors einzelne Tumorbuds auszubilden klassifiziert [83], [151], [90], [210].

Entsprechend des Anteils drüsiger Strukturen des Karzinoms erfolgt die Einteilung in vier histopathologische Differenzierungsgrade (Grading), wobei G1 für gut differenziert, G2 für mäßig differenziert, G3 für gering differenziert und G4 für undifferenziert steht.

Das präoperative klinische Staging erfolgt laut S3-Leitlinie „Kolorektales Karzinom“ durch die digital-rektale Untersuchung, die komplette Koloskopie mit Biopsie, die Abdomensonografie, einen Röntgen-Thorax in 2 Ebenen sowie durch die CEA-Bestimmung [178].

1.1.5. Therapie und Prognose

Die Therapie des KRK erfolgt abhängig vom UICC-Stadium unter kurativer Zielsetzung als chirurgische Intervention mit adjuvanter bzw. neoadjuvanter Therapie oder als palliativer Ansatz. Je nach anatomischer Lage und Ausbreitung des Tumors wird eine Hemikolektomie rechts bzw. links, eine Transversumresektion, eine Sigmaresektion oder eine restaurative Prokto-Kolektomie durchgeführt. Beim Rektumkarzinom gelten die anteriore Rektumresektion, die abdomino-perineale Rektumextirpation sowie die intersphinkteräre Rektumresektion als gleichwertige Verfahren.

Als prognostisch ungünstige Faktoren gelten neben dem Tumorstadium (TNM), die geringe Tumordifferenzierung, das infiltrative Tumordinvasionsmuster [125], [157], die Gefäßinvasion mit Venen- und/oder Lymphgefäßbeteiligung [31], [110] vorhandener Lymphknotenbefall [162], [29], [185], sowie das Vorliegen einer lokalen Entzündungsreaktion [138], [168], [60]. Weitere Prognosemarker sind bestimmte genetische Alterationen im KRK, welche für eine schlechte Prognose der Patienten sprechen. Dazu zählen der Chromosomenverlust von 17p, 1p, 5q, 8p oder 18q [149], eine verminderte DCC-Genexpression [165], [57], p53-Überexpression [135], reduzierte p27^{Kip1}-Expression [112], hohe Cyclin A-Expression sowie die K-ras-Genmutation [110]. Bei Vorliegen einer hohen Mikrosatelliteninstabilität zeigte sich

für Patienten mit KRK eine bessere Überlebensrate im Vergleich zu mikrosatellitenstabilen Tumoren [150], [13]. Weiterhin gehört zu den Prognosemarkern eine Alteration der Proteine, welche an Signalkaskaden beteiligt sind und im KRK zu Tumorprogression und Bildung von Metastasen führen. Dabei werden Enzyme des Wnt-Signalwegs (β -Catenin, APC, E-Cadherin) [118], des transforming growth factor-(TGF)- β -Signalwegs (mit TGF- β [7], einigen SMAD-Proteinen [1] sowie den TGF- β -Rezeptoren I und II [199]) und der Ras-MAP-Kinase-Signalweg (mit Raf-1 Kinaseinhibitorprotein [132] und receptor for hyaluronic acid mediated motility [223]) unterschieden. Auch die Expression von Enzymen, welche in der Matrixdegradation involviert sind, sowie deren Inhibitoren (Cathepsin-L, Urokinase, tissue-type Plasminogenaktivator, Gewebsinhibitoren von Metalloproteinasen) [75], die Expression von in Apoptose involvierten Genen (wie bcl-2, bax, Survivin, apoptosis protease activating factor ((APAF)-1) [137], [222]), die Expression von Proliferationsmarkern (Ki67) [4], die Expression von Zelloberflächenmolekülen (CD44, ICAM1, Galectin 3) und metabolischen Enzymen (GLUT1 Glucosetransporter, Mangan-Superoxid-Dismutase, thymidylate synthase [4], Ornithindecaboxylase, COX 2 [110]) haben einen prognostischen Wert. Eine wichtige Rolle spielt auch die Überexpression von VEGF (vascular endothelial growth factor) und EGFR (epidermal growth factor receptor), welche jeweils mit einem schlechten Outcome einhergehen [63], [58]. Jedoch werden diese molekularbiologischen Marker bisher für die Prognoseabschätzung in der Routinediagnostik nicht eingesetzt [43], [115].

1.2. Heparansulfat-Proteoglycane

Die Proteoglycane (PG) bilden eine Klasse aus stark glykosylierten Glycoproteinen, welche aus einem „Coreprotein“ bestehen und kovalent an eine unterschiedliche Anzahl an Glykosaminoglykan (GAG)-Ketten gebunden sind. Neben einem wichtigen Bestandteil der extrazellulären Matrix, spielen sie eine Rolle an der Zelloberfläche sowie in intrazellulären sekretorischen Granula. Je nach ihrer GAG-Kette werden sie in Hyaluronsäure- oder Hyaluronan-, Heparansulfat (HS)-, Heparin-, Keratansulfat-, Chondroitinsulfat (CS)- bzw. Dermatansulfat-Proteoglykane untergliedert.

1.2.1. Struktur und biochemische Eigenschaften der Heparansulfat-Proteoglykane

Heparansulfat-Proteoglykane (HSPG) sind Zelloberflächen- und extrazelluläre Matrix (ECM)-Makromoleküle, die ein Kernprotein enthalten, an welches mindestens eine HS-GAG-Kette über Serin an eine konstante Tetrasaccharid-Bindungssequenz kovalent gebunden ist [48]. Die Grundstruktur der HS-Seitenketten besteht aus einer Folge von D-Glucuronsäure- und N-Acetylglucosamin-Resten, welche β 1,4- und α 1,4-glykosidisch konnektiert sind. Aufgrund

der strukturellen Variabilität der HS-Ketten mittels Sulfatierung, Acetylierung oder Epimerisierung des Polymers sowie der Möglichkeit verschiedener Interaktionen über das „Coreprotein“ ergibt sich für die HSPG eine Breite an Interaktionspartnern sowie die Einflussnahme auf viele biologische Prozesse wie Angiogenesis, Entwicklungs-, Wachstums- oder Wundheilungsprozesse [97], [23]. Durch Förderung von festen Zell-Zell- und Zell-extrazellulären Matrixverbindungen hemmen die HSPG die Zellinvasion und dienen der Aufrechterhaltung von Struktur und Aufbau der ECM [171].

Zu den Zelloberflächen-HSPG gehören die Glycosylphosphatidylinositol-(GPI)-verankerten Glypicane, welche in der Regulierung diverser Signalwege, wie Wnt, FGF und Hedgehog involviert sind [51], und die Syndecane, die zu den Typ I Transmembranproteinen zählen [174]. Die Letzteren bestehen aus den vier Mitgliedern Syn-1 bis 4. Aufgebaut sind sie aus einer kurzen Endodomäne, bestehend aus einer stark konservierten C1- und C2-Region sowie der in den einzelnen Syndecanen unterschiedlich gebauten V-Region, einer einheitlichen Transmembranregion sowie einer sehr variablen Ektodomäne. Am Coreprotein sind eine unterschiedliche Anzahl an GAG-Ketten überwiegend HS-kovalent gebunden, welche Interaktionen mit einer Vielzahl von Proteinen wie FGFs, VEGFs, TGF- β und platelet-derived growth factors erlauben [173]. Zusätzlich können bei den Syn-1 und -3 CS-Bindungen vorkommen [197].

1.2.2. Arten, Vorkommen und biologische Funktionen von Syndecanen

Arten und Vorkommen von Syndecanen

In wirbellosen Tieren kommt ausschließlich ein Syndecan vor, welches für die neuronale Entwicklung und Entwicklung von Axonleitungen von Bedeutung ist [166]. Demgegenüber gibt es in Säugetieren vier Mitglieder der Syndecane: Syn-1 bis -4. Mit Ausnahme der Erythrozyten exprimieren alle Zellen mindestens ein Syndecanmitglied [95]. Syn-4 (auch als Amphiglycan oder Ryudocan bezeichnet) kommt in den meisten Geweben, jedoch mit einer geringeren Dichte und häufig in Ko-Expression mit anderen Syndecanen, vor. Syn-1 ist in Epithel- und Plasmazellen, Syn-2 (auch Fibroglycan genannt) in Endothelzellen, Fibroblasten, Neuronen und glatten Muskelzellen exprimiert. Syn-3, oder N-Syndecan genannt, wird hauptsächlich in neuronalen und einigen muskuloskelettalen Geweben gefunden [97].

Biologische Funktionen

Die Syndecane besitzen eine kritische regulatorische Funktion in vielen biologischen Prozessen. Als Zelloberflächen-HSPG spielen die HS-Ketten der Syndecane eine Rolle in

der Interaktion mit Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren, extrazellulären Matrix-Proteinen, Zell-Zell-Adhäsionsmolekülen, Proteaseinhibitoren, Proteinen, welche in den Lipidstoffwechsel und –transport integriert sind und Pathogenen (wie Viren, Protozoen und Bakterien). Eine Veränderung der Syndecan-Expression erfolgt während der Entwicklung sowie in pathologischen Prozessen, wie Wundheilung und neoplastischer Transformation. Den Syndecanen werden die Aufgabe der Kontrolle von Zellproliferation, Differenzierung, Adhäsion, Migration und zytoskelettale und mikrofilamentär zytoskelettale Organisation [70] sowie Beteiligung an der Blutgerinnung zu Teil [221].

Spezifische Funktionen der Syndecane werden durch die Transduktion von Stimuli in zytoplasmatische Signale mittels extrazellulärer Ligandenbindung erzeugt. Dabei interagiert die C1-Region mit Bestandteilen des src/Cortacin-Signalweges sowie mit Tubulin, wodurch es zum Crosstalk zwischen Syndecanen und Mikrotubuli sowie über die Familie der src-Kinasen zu zellulären Prozessen, wie Adhäsion, Streuung, Formation von focal adhesions, Migration und FGF-Rezeptor-Signaling kommt [96], [196]. Die Ektodomäne besitzt in den verschiedenen Syndecanen unterschiedliche Aufgaben. Sie ist einerseits Bindungsstelle für Proteasen und andererseits verantwortlich für Zellinteraktionen sowie Oligomerisierung. Die Transmembrandomäne steuert die Interaktion mit anderen Membranproteinen, die Lokalisierung von verschiedenen Membrankompartimenten sowie die Oligomerisierung von Syndecanen [5], [117]. Die C2-Region kann an die PDZ-Domäne (bestehend aus PSD-95, Discs large und Zonula occludens-1 Protein) spezifischer Proteine binden, welche an der Organisation und dem Aufbau von Proteinkomplexen an der Innenseite der Plasmamembran sowie an der Bindung zum Zytoskelett beteiligt sind. Die Funktion der V-Region ist bisher ausschließlich für Syn-4 bekannt, wo sie für den Aufbau von Syn-4-Tetrameren mit Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphat (PIP₂) und aktivierter Proteinkinase C- α (PKC- α) in „focal adhesions“ verantwortlich ist [160], [214]. Eine Überexpression von Syn-4 führt zu vermehrter Anhäufung von „focal adhesions“ und somit zu verminderter Zellmotilität [116]. Die verschiedenen Interaktionen der Syndecane werden durch Phosphorylierung, induziertes Clustering sowie Shedding der extrazellulären Syn-Domäne reguliert [101].

Shedding

Syndecane haben als Zelloberflächen-PG die Möglichkeit, durch ihre Ektodomäne Einfluss auf die Zellausbreitung in der extrazellulären Matrix und Antwort auf Wachstumsfaktoren und andere biologisch aktive Polypeptide zu nehmen. Durch das schnelle Abspalten löslicher Ektodomänen beeinflussen sie als parakrine bzw. autokrine Effektoren oder als kompetitive Inhibitoren verschiedene Regulationsmechanismen und reduzieren somit die Anzahl an Zelloberflächen-HS. Dieser posttranslationale Mechanismus wird als Shedding bezeichnet. Dies erfolgt über proteolytische Prozesse in der ECM durch verschiedene Matrixproteinasen,

u.a. durch Matrix-Metalloproteinasen (MMPs), Plasmin und Thrombin [177] oder durch ADAM17 (TACE) [154]. Zusätzlich zu den direkten Aktivatoren des Shedding der Syndecane gibt es eine Reihe extrazellulärer Stimuli wie Wachstumsfaktoren [191], Chemokine [21], bakterielle Virulenzfaktoren [28], [146], Heparanase [122], Insulin [209] und Zellstress [52], welche dieses beschleunigen können. Das Shedding ist aktiv in proliferierenden sowie invasiv wachsenden Zellen, wie Tumorzellen. In vivo findet man ein gesteigertes Shedding bei Wundheilungsprozessen sowie bei der Tumorprogression [126]. Eine weitere Regulierung der Syndecan-Aktivität ist durch das Abspalten von HS-Ketten mittels Heparanase möglich [120].

Ko-Rezeptoren

Als Ko-Rezeptoren von Integrinen, welche der Familie der transmembranen Glycoproteine zuzuordnen sind [133], beeinflussen die Syndecane die Zelladhäsion und Migration [141]. Hierzu binden sie an eine zweite Seite des Liganden und verstärken die Ligandenbindungsaffinität. Weitere Verbindungen werden mit Wachstumsfaktor-Rezeptorkinasen und Zelladhäsionsmolekülen wie Fibronectin, Vitronectin, Laminin und Kollagen eingegangen [14]. Als Ko-Rezeptoren sind Syndecane in der Lage Wnt- und Slit-Signaling zu regulieren [3], [87].

1.3. Syndecan-1

1.3.1. Struktur und biochemische Eigenschaften von Syndecan-1

Nach Spaltung des Signalpeptids besteht Syn-1 aus 288 Aminosäuren und besitzt ein Molekulargewicht von 30 kDa. Dabei beinhaltet das Kernprotein 232 Aminosäuren als Ektodomäne, welche mit Carbohydratketten, welche aus negativ geladenen CS und HS bestehen, modifiziert sind. Die HS-Polymerisation wird an Serin 37, 45 und 47 initiiert. CS kann an Serin 207 und 217 gebunden werden [220]. Ein 21 Aminosäuren-beinhaltenes Transmembran-Segment verbindet die extrazelluläre mit der zytoplasmatischen Domäne, welche aus 35 Aminosäuren besteht und vier konservierte Tyrosinreste und einen konservierten Serinrest besitzt [207]. Eine Seite zur Phosphorylierung befindet sich am Tyrosin 309 [97]. Die HS-Ketten sind unter anderem in der Lage an FGF, VEGF, HGF, glial cell derived neurotropic factor, Midkine, Pleiotrophin, Wnt, Noggin, Fibronectin, Laminin, Kollagen und Thrombospondin zu binden, wohingegen CS an Midkine und Pleiotrophin bindet. Die Syn-1-Ektodomäne kann mittels proteolytischer Spaltung von der Zelloberfläche abgetrennt werden (Shedding) [52]. Verantwortlich für das Shedding von Syn-1 sind unter anderem die Matrixmetalloproteinasen MMP-7 [109], MMP-9 [21], MMP-14 (membrane type I MMP (MT1 MMP)) und MT3 MMP [47] sowie Heparanase [148].

1.3.2. Vorkommen und biologische Funktion von Syndecan-1

Syn-1 kommt auf allen epithelialen, endothelialen und vaskulären glatten Muskelzellen sowie Plasmazellen vor. Als membrangebundenes HSPG nimmt es an Zellproliferation, -migration und Zell-Matrix-Interaktionen teil [131]. Syn-1 bindet sich an viele Faktoren, welche die nichtinfektiöse Inflammation vermitteln und regulieren [9]. So spielt Syn-1 im Leukozyten-Recruitment eine wichtige Rolle. In verschiedenen Tiermodellen mit Syn-1-knock-out-Mäusen konnte in diversen Erkrankungen wie der allergischen Kontaktdermatitis [93], der Kolitis [53], dem Myokardinfarkt [203], der Allergen-induzierten Lungenentzündung [216] und der Anti-glomerulären-Basalmembran-Nephritis [167] eine gesteigerte Leukozytenadhäsion und -migration gezeigt werden [193]. Im Komplex mit chemotaktischen Zytokinen, Chemokine genannt, bildet Syn-1 einen chemotaktischen Gradient für die Neutrophilenmigration an Epithel und Endothel nach dem Shedding durch Proteasen [109], [127]. Ein anhaltender Entzündungsprozess kann zur Entstehung von Erkrankungen führen. Syn-1-Shedding begrenzt die Inflammation oder mildert sie mittels Modulation von HS-gebundenen proinflammatorischen Faktoren ab [193]. So konnte in einem „endotoxic shock“ Mausmodell gezeigt werden, dass Syn-1-Shedding die Aufhebung der Neutrophilen-Inflammation mittels Beseitigung von CXC-Chemokinen von der Zelloberfläche fördert [74]. Syn-1 nimmt am Matrix-Remodeling von verletztem Gewebe teil. Fehlt Syn-1 im Mausmodell, kommt es zur Dysorganisation der Matrix nach abgelaufenem Herzinfarkt mit folgender Gewebedilatation [203]. Demgegenüber scheint Syn-1 in Angiotensin-II-induzierter kardialer Fibrose [176] sowie in der idiopathischen Lungenfibrose den fibroblastischen Umbau zu fördern, jedoch vorwiegend die durch oxidativen Stress abgepaltene Ektodomäne [98]. Auch eine Beteiligung an der Wundheilung ist für Syn-1 belegt. So kann es die Keratinozytenproliferation regulieren [46], [187]. Des Weiteren ist Syn-1 für die Regulierung der Protein-Leckage im Darmepithel [20], der Proliferation der glatten Muskelzellen bei Gefäßverletzungen [56] und des Lipoprotein-Metabolismus [186] verantwortlich.

Eine weitere wichtige Funktion besitzt Syn-1 in der Tumorbiologie [80], indem es verschiedene Schlüsselprozesse der Tumorgenese, wie Tumorzellproliferation, Apoptosis, Angiogenese und Metastasierung [193] moduliert. Integrine gelten als Schlüsselregulatoren von Zelladhäsion, Proliferation und Migration. Syn-1 kooperiert mit Integrinen, indem es als Mediator für die zellulären Prozesse der Integrine fungiert [133], [208]. So kann es die Aktivität und das *Signaling* von $\alpha\beta3$ - und $\alpha\beta5$ -Integrinen durch die Bindung von α -Liganden wie Vitronectin potenzieren [11] und die dynamische Verankerung zwischen der ECM und dem Zytoskelett gemeinsam mit den Integrinen formen [193].

Eine weitere bedeutsame Rolle von Syn-1 liegt in der Pathogenese von Infektionskrankheiten. So ist es an der Anheftung und dem Eintritt der Pathogene an/in die

Wirtszelle beteiligt und in der Lage Wirtsabwehrmechanismen zu hemmen. Die Anheftung bzw. der Eintritt von Viren wie HEV [88], HPV [182], HSV [6] und HIV [172] sowie dem Bakterium *Neisseria gonorrhoeae* [54] in Epithelzellen wird durch Syn-1 gefördert. In Syn-1-knock-out-Mäusen konnte gezeigt werden, dass diese resistenter gegenüber mikrobiologischen Lungeninfektionen, wie bei Infektion mit *Pseudomonas aeruginosa*, waren. Dies ist am ehesten auf das Fehlen von Syn-1-Shedding sowie die Abwesenheit von HS-Ketten an epithelialen Oberflächen zurückzuführen [145]. Auch bei Infektion mit *Staphylococcus aureus* nach Hornhautverletzung konnte bei Syn-1-knock-out-Mäusen eine verbesserte Wirtsabwehr nachgewiesen werden [73].

Via Glycosaminoglycan-Wachstumsfaktor-Interaktionen dient Syn-1 als wichtiger Ko-Rezeptor für Rezeptoren von Tyrosinkinase und einigen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren [220]. Weiterhin spielen Wachstumsfaktoren eine wichtige Rolle in der Regulierung der Syn-Expression. So erhöht TGF- β 2 in epithelialen Zellen Syn-4 und erniedrigt Syn-1 [42].

1.3.3. Funktion von Syndecan-1 im Kolon

Syn-1 scheint in chronisch entzündlichen Darmerkrankungen die intestinale epitheliale Wundheilung zu unterstützen sowie die Leukozytenadhäsion an endotheliale Zellen zu hemmen. So konnte in mit Dextransodiumsulfat behandelten Syn-1-knock-out-Mäusen nach Förderung der Kolitisinduktion ein prolongiertes Leukozyten-Recruitment im Vergleich zum Wildtyp gefunden werden [53]. Des Weiteren ist bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen Syn-1 im Epithel, welches dem entzündetem Gewebe aufliegt, reduziert [38] mit folglich verminderter Darmschleimhautreparatur [37]. Tumorentwicklung im Kolon geht mit dem Verlust der normalen Zell-Zell- und Zell-Matrix-Adhäsion und veränderten Mustern der Expression von Zelladhäsionsmolekülen (CAMs) einher. So konnte eine Reduktion der Syn-1-Expression abhängig vom Adenom- und Tumorgrading bzw. Tumorstadium sowie beim Übergang vom Adenom zum Karzinom gezeigt werden [39], [119]. Reduzierte Syn-1-Level korrelieren mit der Inzidenz von lokalen Metastasen sowie einer verminderten Überlebensrate [55]. Auch eine erhöhte Expression im lokalen Tumorstroma wurde beschrieben [131], jedoch bisher ohne Nachweis für ein schlechteres klinisches Outcome [119], [72]. In Zellkulturmodellen zeigte sich, dass eine maligne Transformation der Kolonkarzinomzelllinie Caco-2 mit einem Verlust von Syn-1 einhergeht [107].

1.3.4. Rolle von Syndecan-1 bei Metastasierung und an der Invasionsfront

Das invasive und metastatische Potential von Tumorzellen ist auf die Aktivierung einer Anzahl an ECM-Liganden, welche Proliferation, dynamisches zytoskelettales Remodeling, Apoptosis und Genexpression kontrollieren, angewiesen. Diese besitzen viele Adhäsionsrezeptorbindungsseiten, welche u. a. von PG und Integrinen erkannt werden. Eine veränderte Expression von Syndecanen beeinflusst Prozesse von Tumoraufreten, Progression und Metastasierung. Reduzierte Syn-1-Spiegel sind an der Zelloberfläche von Kolon-, Lungen- und Mammakarzinomen sowie beim hepatozellulären Karzinom und Karzinomen des Kopf- und Halsbereiches mit erhöhter Tumormetastasierung beschrieben [171]. Demgegenüber steht, dass eine erhöhte Syn-1-Expression in Pankreas-, Magen- und Mammakarzinom für eine erhöhte Tumoraggressivität und ein schlechteres klinisches Outcome stehen [33], [211], [8]. Erhöhte Serumspiegel von *sheddetem* Syn-1 zeigten ebenfalls eine schlechte Prognose bei Patienten mit Lungenkarzinom [86] und multiplen Myelom [181].

Syn-1 reguliert Mediatoren, wie Onkogene oder Wachstumsfaktoren, welche für das Tumorzellüberleben und die Proliferation verantwortlich sind. So sind Syn-1-knock-out-Mäuse gegen die Wnt-1-induzierte Brustkrebsentwicklung geschützt [3]. Mittels Shedding von Syn-1 von Stroma-Fibroblasten wird das Tumorzellwachstum im Mammakarzinom durch die Aktivierung von FGF2- und SDF1-Signaling stimuliert [190]. Auch die Apoptose von Tumorzellen ist Syn-1 in der Lage zu regulieren. Die Induktion der Apoptosis durch die Syn-1-Ektodomäne konnte in MCF-7-Brustkrebszellen [192] und kultivierten Tumorzellen der Prostata [78] nachgewiesen werden. Die Inhibierung von Syn-1 in Myelomzellen induziert einen Wachstumsstopp und Apoptosis [94].

Als Zelloberflächen-PG unterstützt Syn-1 die Zelladhäsion zur ECM und verzögert die Tumorzellmigration. So fördert es als Korezeptor die Integrin $\alpha 2\beta 1$ -vermittelte Adhäsion zu Kollagen [208]. In Plattenepithelkarzinomen von Kopf und Hals zeigen die Zellen, welche eine hohe Syn-1-Expression vorweisen, eine schwächere Migration und geringere Invasivität in Kollagen-I-Matrizes im Vergleich zu Zellen mit geringerer Syn-1-Expression [81]. Über das Heparanase-induzierte vermehrte Shedding von Syn-1 in Malignen Myelom-Zellen werden über den ERK-Signalweg die zwei Proteasen MMP-9 und urokinase-type plasminogen activator hochreguliert. Folge ist eine vermehrte endotheliale Invasion sowie eine gesteigerte Angiogenese dieser Tumorzellen [155], [156]. Auch die Spaltung von Syn-1 mittels MMP-14 fördert die Zellmigration [189]. Ähnlich verhält es sich bei MCF-7-Brustkrebszellen. Membrangebundenes Syn-1 hemmt die Invasion in Matrigel, während abgespaltenes Syn-1 diese fördert [139]. Im Mammakarzinom zeigt eine erhöhte stromale Syn-1-Expression in

Fibroblasten eine veränderte Fibronectinproduktion und ECM-Organisation mit folglich erhöhter Tumorzellmotilität [217].

Syn-1 ist in der Lage an proangiogenetische Faktoren wie FGF-2 und VEGF zu binden und diese endothelialen Zellen zu präsentieren, woraufhin es zu einer endothelialen Invasion und Budding kommt [156]. Des Weiteren reguliert die Syn-1-Ektodomäne die $\alpha v \beta 3$ und $\alpha v \beta 5$ Integrin-vermittelte Anheftung und Ausbreitung von menschlichen Brustkrebszellen und B82L-Fibroblasten. Durch Blockierung dieser Verbindung mit Synstatin kommt es zur Suppression der Angiogenese, so dass Syn-1 als kritischer Mediator der Tumorprogression angenommen werden kann [11], [129].

1.4. Lokale Tumorinvasion und Metastasierung

Die Ausbreitung eines Tumors lokal bzw. mittels Metastasierung ist in mehrere Schritte eingeteilt und abhängig von der Interaktion der Tumorzellen mit ihrer „microenvironment“ (bestehend aus den Umgebungszellen des Tumors und der von diesen Zellen produzierten ECM). Dabei bildet die ECM mit Strukturproteinen wie Laminin und Kollagen eine physikalische Barriere für die Tumormetastasierung abhängig von Struktur und biochemischen Eigenschaften der ECM (wie Faserdicke oder Gittergröße) [22], [71]. Es kommt zunächst zur Anheftung der Tumorzellen an die ECM mittels verschiedener Adhäsionsmoleküle. Anschließend wird durch die Sezernierung diverser Enzyme, welche Proteine (z.B. durch MMPs) und Polysaccharide (z.B. durch Heparanase) als Bestandteil der Basalmembran zerstören, die ECM degradiert. Daraufhin können die Tumorzellen in die defekte Basalmembran sowie das darunterliegende Stromagewebe migrieren. Nachfolgend penetrieren die malignen Zellen einzellwandige Kapillare und Lymphgefäße (Intravasation) und zirkulieren im Blut. Es folgt die Extravasation und die Bildung einer metastatischen Tumorzellkolonie mittels verschiedener Rezeptoren, Adhäsionsmoleküle und degradierender Enzyme von Tumor- und Stromazellen. Die integrinvermittelte Adhäsion, die Ausbildung von focal adhesions sowie die epitheliale-mesenchymale Transition von Tumorzellen fördern den Prozess der Migration. Hierbei können sich die Tumorzellen im Kollektiv oder unter Verlust der intrazellulären Verbindungen einzeln fortbewegen. Dieser Begriff wird als epitheliale-mesenchymale Transition bezeichnet [202] und stellt den Übergang vom expansiven zum infiltrativen Tumortyp dar. Eine direkte Korrelation zwischen der Produktion von Heparanase und Tumorinvasivität konnte gezeigt werden [205]. So bestätigte sich auch im KRK und in Pankreastumoren, dass eine erhöhte Heparanaseexpression mit einer Transformation vom benignen zum malignen Tumor gekoppelt ist [159], [79].

Neben der ECM spielen die reaktiven nichtneoplastischen Zellen eine wichtige Rolle in der Tumorzellmigration und Invasion. Zu diesen Zellen gehören endotheliale Zellen, Karzinom-

assoziierte Fibroblasten, mesenchymale Stammzellen und eine Vielfalt an Immunzellen, wie Lymphozyten und Tumor-assoziierte Makrophagen [202]. Hervorzuheben sind hierbei die Tumor-assoziierten Makrophagen, welche für Tumorzellmigration, -invasion und Metastasierung benötigt werden [32] und die Karzinom-assoziierten Fibroblasten, welche durch TGF- β induziert werden [89], [170] und Proteine sezernieren, die die Tumorzellinvasivität, Angiogenese und das Gewebe-Remodeling stimulieren [184]. Diese komplexen Interaktionen der Tumorzellen mit ihrer "microenvironment" zeigen verschiedenste Mechanismen, welche in Tumorstadium und Metastasierung involviert sind und die Effizienz der Tumorzellinvasion beeinflussen.

1.5. Fragestellung

Syn-1 spielt eine wichtige Rolle in der epithelialen Homeostasis, Proliferation und Migration. Vorbeschrieben ist eine verminderte Expression von Syn-1 im KRK im Vergleich zum Adenom und Normalgewebe, wobei eine reduzierte Syn-1-Expression auch mit der Inzidenz von lokalen Metastasen korreliert [55]. Inwieweit Syn-1-induzierte Signalwege sowie Syn-1 selbst einen Schutz vor lokaler Tumordinvasion und Metastasierung des KRK spielen bzw. inwieweit der Verlust von Syn-1 auf Protein- bzw. mRNA-Ebene eine Tumordinfiltration fördern, ist bisher unbeantwortet. Ziel dieser Arbeit stellt die Beleuchtung der Syn-1-Expression an der Invasionsfront als Schauplatz der epithelial-mesenchymalen Transition dar. In vorrausgegangenen Untersuchungen wurden u.a. erhöhte Level von Syn-1 im lokalen Tumorstroma beschrieben [131]. Demzufolge lag das Interesse in der Untersuchung der Syn-1-Expression durch Zellen des Tumorverbandes (Tumorzellen oder tumorassoziierte Zellen, wie Fibroblasten oder Makrophagen) anhand von in-vitro-Modellen. Folgende Fragestellungen standen im Fokus der vorliegenden Arbeit:

1. Inwieweit korreliert die Expression von Syn-1 in Tumorzentrum, Invasionsfront und in Tumorbuds des KRK mit den klinisch-pathologischen Daten und können Unterschiede zum kolorektalen Adenom bzw. unauffälliger Schleimhaut gefunden werden?
2. Zeigen sich Unterschiede im Syn-1-Level auf Protein- bzw. mRNA-Ebene des KRK im Vergleich zu den immunhistochemischen Ergebnissen?
3. Welche Zellen des Tumorverbandes (Tumorzellen oder tumorassoziierte Zellen) tragen zur Expression von Syn-1 in der Zellkultur mit humanen Kolonkarzinomzellreihen bei, und welchen Einfluss hat die Expression auf Adhäsion, Migration und Invasion?

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Patientenkollektiv

2.1.1.1. Sporadische kolorektale Karzinome

In die Untersuchung eingeschlossen wurden 177 Patienten, bei denen im Zeitraum von 1995 – 2006 ein sporadisches Karzinom des Kolorektums diagnostiziert und an der chirurgischen Klinik der Otto-von-Guericke Universität Magdeburg reseziert worden ist. Das Kollektiv umfasste dabei 102 (57,6%) männliche und 75 (42,4%) weibliche Patienten mit einem mittleren Alter von $67,3 \pm 10,7$ Jahren (min-max: 40-90 Jahre). Fälle, bei denen eine chronisch-entzündliche Darmerkrankung, hereditäre Syndrome mit gehäuftem Auftreten von Kolonkarzinomen (wie FAP, HNPCC), eine maligne Zweiterkrankung oder eine Mikrosatelliteninstabilität vorlagen, wurden nicht in die Studie eingeschlossen. Die patientenbezogenen Daten wurden von den Kliniken und Ambulanzen der Viszeralchirurgie und Inneren Medizin sowie dem Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Magdeburg in Form von Krankenakten, Arztbriefen bzw. histopathologischen Befunden zur Verfügung gestellt. Eine Einverständniserklärung der Patienten lag schriftlich vor. Die Genehmigung der Untersuchungen erfolgte durch die zuständige Ethikkommission.

Die kolorektalen Tumorresektate wurden auf Crash-Eis in das pathologische Institut der Universität Magdeburg gesandt. Innerhalb von 20 Minuten post operationem wurde das Resektat von einem Pathologen des Instituts begutachtet und entsprechend der Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Pathologie e.V. für die pathologische Diagnostik aufgearbeitet. Repräsentative Gewebeproben aus dem Tumor sowie makroskopisch unauffälliger Dickdarmschleimhaut in einem Mindestabstand von 10 cm zum Karzinom wurden entnommen. Direkt im Anschluss erfolgte nach dem Schockfrieren in flüssigem Stickstoff die Asservierung der Proben bei -80°C , um zu einem späteren Zeitpunkt der RNA- und DNA-Präparation zur Verfügung zu stehen. Das restliche Gewebe wurde formalinfixiert (4%), nach Prozessierung im Gewebeeinfiltrationsautomat (Leica ASP-300) in Paraffin eingebettet (Paraffinausgießstation (Leica EG1160)) und stand folglich in Form von Paraffinblöcken zur Verfügung.

Von diesen Patienten stand außerdem formalin-fixiertes, paraffin-eingebettes Gewebe von 12 ausgewählten Leber- und 20 Lymphknotenmetastasen zur Untersuchung bereit.

2.1.1.2. Kolorektale Adenome und frühinvasive Kolonkarzinome

In diesen Teil der Studie wurden kolorektale Adenome von 97 Patienten (56 männlich, 41 weiblich, Alter: $65,7 \pm 11,3$ (min-max: 43-89 Jahre)) eingeschlossen. Untersucht wurden 59 (60,8%) low grade und 38 (39,2%) Adenome mit high grade Dysplasien. Die Proben aus dem Zeitraum 2004 – 2008 stammten aus der Abteilung für Viszeralchirurgie bzw. Gastroenterologie der Universitätsklinik Magdeburg. Reseziert wurden die Adenome über endoskopische Laser- oder Schlingenabtragung oder transanale endoskopische Mikrochirurgie. Zusätzlich wurden 14 frühinvasive Kolonkarzinome (pT1N0) von 5 männlichen und 9 weiblichen Patienten mit einem Durchschnittsalter von $65,5 \pm 11,0$ Jahren untersucht. Die Aufarbeitung und Einbettung der Proben erfolgte wie bei dem Karzinomkollektiv (Vgl. Kapitel 2.1.1.1).

2.1.2. Pathohistologische Klassifikationen

TNM-Tumorklassifikation

Die Tumorstadieneinteilung der Karzinome erfolgte auf Grundlage der sechsten Auflage der TNM/UICC-Klassifikation [213]. Die Beurteilung der lokalen Invasionstiefe der Tumoren (pT_x) fand an transmuralen Hämatoxylin-Eosin-gefärbten Paraffinschnitten durch eine Pathologin (D.J.) des Institutes statt. Weiterhin wurden die Anzahl regionärer Lymphknoten (pN_x), die Fernmetastasierung (M_x), sowie die Infiltration von Nerven (Pn), Lymph- oder Blutgefäßen (pL bzw. pV) erfasst (Vgl. Tabelle 3.1, Kapitel 3.1.1).

Histologie und Grading

Die vorliegende Arbeit umfasste ausschließlich die Untersuchung des Adenokarzinoms als Subtyp des KRK. Die Karzinome wurden entsprechend ihres histologischen Malignitätsgrades in gut differenziert (G1), mäßig differenziert (G2) und gering differenziert (G3) eingeteilt. Unberücksichtigt blieben undifferenzierte (G4) Karzinome. Die Adenome wurden nach WHO-Kriterien gemäß dem Dysplasiegrad in geringgradige (low grade intraepitheliale Neoplasie=LGIN) bzw. hochgradige Dysplasien (high grade intraepitheliale Neoplasie=HGIN) graduiert.

Klassifikation des Invasionsstyps

Nach den Kriterien von Jass et al. [84] erfolgte die Klassifikation des Invasionsstyps für alle Karzinome an HE-gefärbten Schnittpräparaten gemeinsam mit einer Pathologin (D.J.), die ausgedehnte Anteile der Invasionsfront enthielten. Hierbei fand eine Einteilung in einen *expansiven Typ* für glatt begrenzte Fronten und einen *infiltrativen Typ* für diffuses und/oder strahlenartiges Wachstum der Tumore in das angrenzende Gewebe statt. Weiterhin wurde

das *tumor budding*-Phänomen nach den Kriterien von Morodomi et al. [134] in den *non-budding-Typ* und den *budding-Typ* unterteilt, wobei bei Letzterem mindestens ein Tumorbud vorliegen musste.

2.1.3. Zelllinien

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit kamen die etablierten humanen Kolonkarzinomzelllinien HCT 116 (als aggressive Zelllinie) und HT-29 (mit gering invasiven Eigenschaften) sowie die Makrophagenzelllinie THP-1, welche von einer akuten monozytären Leukämie abstammt, und 175BR als humane Hautfibroblastenzelllinie zur Anwendung. Bezugsquelle für die Kolonzelllinien sowie THP-1 war ATCC® (Rockville, USA). 175BR stammte von HPA (Health Protection Agency Culture Collections, Salisbury, UK).

2.1.4. Chemikalien und Reagenzien

Die verwendeten Reagenzien werden im Methodenteil entsprechend der Herstellerbezeichnung benannt. Detaillierte Angaben zu den Chemikalien, Kits, Gebrauchsmaterialien und benutzten Geräten finden sich im Anhang unter Anlage I.

2.2. Methoden

2.2.1. Herstellung der Tissue Microarrays (TMA)

Aufgrund der Möglichkeit, mit der TMA-Technik kostengünstig, effizient und materialsparend zu arbeiten, kam diese Methode zur Vorbereitung der Schnitte für die immunhistochemische Auswertung der KRK zum Einsatz. Hierzu wurden repräsentative Regionen des Tumorzentrums und histologisch unauffälliger Dickdarmschleimhaut (=Nichttumor) auf HE-gefärbten Schnitten gekennzeichnet. Aus den dazugehörigen Gewebeblöcken (Donorblock) wurden mit Hilfe des Manual Tissue Arrayer MTA 1 Gewebezylinder von 0,6 mm Durchmesser aus den zuvor ausgewählten Regionen ausgestanzt und in einen Paraffinleerblock (Rezipientblock) zum TMA zusammengeführt. Dazu erfolgte zuvor die Entnahme von Paraffin-Zylindern aus dem Leerblock, an dessen Stelle die Gewebezylinder eingefügt wurden. Das entsprechende Protokoll für die Anordnung der Stanzen stammte von der Software TMA Designer (Version 1.1., Alphelys, Frankreich). Für die bessere Einbindung der Gewebezylinder in den Paraffinblock erfolgte eine zehnminütige Erwärmung bei 60°C. Nach anschließender Herstellung von 3 µm dicken Schnitten (Mikrotom RM 2155) konnten diese auf Polylysin-beschichtete Objektträger (Super Frost Plus Menzel Gläser) aufgetragen werden. Der so entstandene TMA wurde mittels HE-Färbung auf Vollständigkeit und Gewebequalität überprüft und stand folgend der weiterführenden immunhistochemischen Detektion zur Verfügung.

Um einer möglichen Gewebheterogenität und Fixierungsartefakten gerecht zu werden, wurden für jeden Fall 4 Stenzen Tumor- und Nichttumorgewebe entnommen. Insgesamt befanden sich auf jedem Array 10 Zeilen mit je 15 Stenzen, wobei zur späteren Orientierung auf dem Schnitt die erste Stanze mit Plazentagewebe aufgefüllt wurde und auf diese eine Leerstanze folgte. Folglich enthielt jeder Array 148 Kolongewebestanden von 37 Fällen.

2.2.2. Immunhistochemie

2.2.2.1. Immunhistochemische Detektion von Syndecan-1 in humanem Gewebe

Die immunhistochemischen Untersuchungen wurden an je 5 TMAs mit Nichttumor- und Tumorgewebe, transmuralen Schnittpräparaten von 175 Karzinomen mit repräsentativen Anteilen der Invasionsfront, 32 ausgewählten Organmetastasen sowie 97 transmuralen Adenompräparaten und 14 Frühkarzinomen durchgeführt.

Der immunhistochemische Nachweis des Proteins Syn-1 (CD138) erfolgte vollautomatisch mittels des *ultraView*TM Universal DAB Detection Kits am BenchMark[®] XT Färbeautomaten. Das Detektionskit bedient sich einer indirekten biotinfreien, auf Multimere basierenden Methode, welche spezifisch an das Antigen gebundene Antikörper durch Ablagerung eines braunen Präzipitats darstellt. Hierdurch konnten die antigenen Strukturen in den Kolongeweben topografisch dargestellt und anschließend lichtmikroskopisch ausgewertet werden.

Die immunhistochemische Untersuchung der Gewebe wurde an 3 µm-Schnitten der TMAs bzw. der Paraffinblöcke der übrigen Präparate durchgeführt. Die Schritte der Entparaffinisierung, Antigendemaskierung und Färbung nach Färbeprotokoll erfolgten vollständig unter standardisierten Bedingungen auf dem Automaten. Dabei fand als Primärantikörper der monoclonale mouse anti-human CD138 Antikörper, Clone MI15 (Code No. M 7228, DakoCytomation Denmark A/S) in der Verdünnung 1:50 Anwendung. Die Inkubationszeit betrug dabei 30 min. Als enzymmarkierter Sekundärantikörper diente das *ultraView*TM Universal HRP Multimer, ein Cocktail aus HRP-markierten Antikörpern gegen Maus-IgG, Maus-IgM und Kaninchen-Antikörper. Als chromogenes Substrat wurde folgend das *ultraView*TM Universal DAB Chromogen verwendet, welches 3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid enthält. Am Ende der automatisierten Prozedur wurden die Schnitte mit Hämatoxylin gegengefärbt, in warmem Leitungswasser gebläut und in wasserlöslicher Glycerolgelatine eingedeckt.

2.2.2.2. Beurteilung der immunhistochemischen Färbungen

Bewertet wurde die Syn-1-Expression der epithelialen Zellen der Kolonschleimhaut, des Karzinoms und der Adenome. Als interne Positivkontrolle dienten Plasmazellen. Es erfolgte eine semiquantitative Auswertung der immunhistochemisch gefärbten Schnitte am Olympus BH-2 Lichtmikroskops (Olympus Optical Co.) bei 200- bzw. 400-facher Vergrößerung entsprechend des in Tab. 2.1 angegebenen Scores.

Zytoplasmatische Intensität (I)	Prozentualer Anteil positiv gefärbter Zellen (P)	Membranöse Intensität
0= keine Färbung	0= 0% positive Zellen	0= keine Färbung
1= schwache Färbung	0,5= 0,5% positive Zellen	1= schwache Färbung in Membranabschnitten
2= mittelstarke Färbung	1= 10% positive Zellen	2= schwache-mäßige komplette Färbung
3= starke Färbung	2= 20% positive Zellen	3= starke komplette Membranfärbung
	...	
	10= 100% positive Zellen	

Tab. 2.1: Semiquantitative Auswertung der Syn-1-Proteinexpression.

Zum einen erfolgte die Bestimmung der Intensität der Färbung (I) von 0=keine Färbung bis 3=starke Färbung. Als weiterer Faktor floss der prozentuale Anteil positiv gefärbter Zellen (P) in die Berechnung mit ein. Daraus wurde ein immunreaktiver Score (IRS) nach folgender Formel ($IRS = I \times P$) berechnet. Zusätzlich erfolgte die Erfassung der membranösen Expression von Syn-1 und die Addition von IRS und Membranscore zu einem Gesamtscore. Für die TMAs wurde die Syn-1-Proteinexpression für jede Stanze einzeln bewertet. Der jeweilige Mittelwert (MW) für die Intensität und die Prozentzahl aus den 4 zu einer Probe gehörenden Gewebstanzen ging dann in die Berechnung des IRS ein ($IRS = MW I \times MW P$). Zur immunhistochemischen Auswertung der transmuralen Präparate und Organmetastasen wurden je drei Blickfelder in 200-facher Vergrößerung herangezogen und aus den daraus resultierenden Mittelwerten für Farbtintensität und Anzahl gefärbter Zellen der IRS berechnet. An den transmuralen Präparaten erfolgte die Auswertung für die Invasionszone und die Tumorzellbuds getrennt.

Zur Auswertung der Adenome erfolgte eine Zonierung in die Adenombasis (1), das Adenomzentrum (2) und oberflächliche Adenomabschnitte (3). Zur Beurteilung wurden je 3 repräsentative Blickfelder pro Zone herangezogen und ein Durchschnittsscore aus jeweils Intensität (I) und prozentualem Anteil positiver Zellen (P) errechnet. Auch hier erfolgte zusätzlich die Bewertung der Membranfärbung.

2.2.3. Zellkultur

2.2.3.1. Monokultur humaner Zelllinien

Kultivierung von Tumorzellmonokulturen (HT-29, HCT 116)

Die in flüssigem Stickstoff bei -170°C und unter Zusatz von 5% DMSO aufbewahrten humanen Kolonzellreihen wurden bei 37°C zügig aufgetaut. Anschließend erfolgte die standardmäßige Anzucht der Tumorzellen in 75 cm^2 Zellkulturflaschen mit 20 ml RPMI 1640 Nährmedium (PAA) unter Anreicherung von 10% hitzeinaktiviertem FBS (30 min bei 56°C , Biochrom KG) und 5% einer Penicillin-Streptomycin-Lösung (PAA). Die Inkubation der Zellen erfolgte im Brutschrank bei 37°C , 5% CO_2 und 95% relativer Luftfeuchtigkeit.

Unter regelmäßiger mikroskopischer Kontrolle des Wachstums der Zellmonolayer wurde das Kulturmedium alle 3-4 Tage gewechselt. Erreichten die Tumorzellen eine Wachstumsdichte von 80–90%, konnten sie geerntet und mittels „Passagieren“ subkultiviert, das heißt verdünnt rekultiviert werden. Hierzu wurde das Medium vorsichtig abgenommen, mit Dulbecco's PBS (1x) (PAA) gewaschen und für 1 min mit 5 ml einer Trypsin-EDTA-Lösung (PAA) inkubiert. Nach Entfernung dieser Lösung folgte eine fünfminütige Inkubation bei 37°C . Unter anschließender Zugabe von 5 ml RPMI 1640 konnten die Zellen vollständig von der Kulturflasche gelöst und im Verhältnis 1:2 bis 1:5 auf neue Kulturgefäße umgesetzt werden. Bei Bedarf erfolgte die Bestimmung der Zellzahl im Coulter Counter ZII mit je 0,5 ml Tumorzellen und 9,5 ml isotoner Salzlösung. Für die Kokultur wurde ein Ansatz von 2 ml der gelösten Tumorzellen in einer auf 10^5 Zellen verdünnten Lösung verwendet. Es folgte eine standardisierte Weiterkultivierung der Kolonzellreihen bis zum Ernten.

Kultivierung von Fibroblasten-Monokulturen (175BR)

Die Aufzucht der Fibroblasten erfolgte in 75 cm^2 Kulturflaschen mit 20 ml Quantum333-Nährmedium (PAA). Wie bereits bei den Tumorzellmonokulturen fand eine regelmäßige Kontrolle und Nährmedienwechsel aller 3-4 Tage bis zum Ernten der Zellen statt. Die trypsinisierten Zellen wurden mit 5 ml Quantum333 von der Unterlage gespült, gegebenenfalls im Coulter Counter ZII gezählt und im Verhältnis 1:2 auf neue Kulturflaschen umgesetzt.

Kultivierung von Makrophagen-Monokulturen (THP-1)

Die aufgetauten THP-1 wurden als Suspensionskultur in 20 ml RPMI 1640 Nährmedium angezogen. Unter regelmäßiger mikroskopischer Kontrolle erfolgte eine Subkultivierung der Makrophagen bei einer Zelldichte von 80-90% mittels Abnahme von 5 ml Zell-Medium-Gemisch in eine neue Kulturflasche unter Zugabe von 15 ml frischen RPMI 1640

Nährmedium. Auch hier erfolgte gegebenenfalls das Zählen der Zellen im Coulter Counter ZII.

2.2.3.2. Kokultur-Kulturansatz und Zelltrennung

Die Kolonkarzinomzellen wurden mit der Makrophagenzelllinie THP-1 indirekt und mit der Fibroblastenzelllinie 175BR direkt kokultiviert. Als Vergleichsproben dienten die jeweiligen Monokulturen, ebenfalls auf Kulturschalen mit RPMI1640 Nährmedium gezüchtet.

Für den Ansatz der Kokulturen wurden in 100mm-Ø-Kulturschalen je 4 ml der auf 1×10^5 Zellen/ml mit RPMI1640 Nährmedium verdünnten Tumorzellen (HT-29, HCT 116) gegeben und unter Zugabe von 1 ml THP-1 für 48 h im Brutschrank inkubiert und anschließend geerntet. Hierzu wurden die im Nährmedium schwimmenden THP-1 abpipettiert und in 1 ml TriFast™ aufgenommen. Auf die am Boden der Kulturschale haftenden Tumorzellen wurde für 1 min je 1 ml TriFast™ gegeben. Daraufhin wurden die Zellen mittels Zellschaber vom Gefäß gelöst, abpipettiert, zentrifugiert und in 1,5 ml Tubes überführt.

Die Zelltrennung erfolgte durch Magnetic Activating Cell Sorting (MACS). Dabei wurden MACS Microbeads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) konjugiert mit monoklonalen Maus-Antikörpern gegen die humanen Antigene CD326 (EpCAM), CD14 und das Fibroblastenspezifische Antigen zur Markierung der Kolonkarzinomtumorzellen, der THP-1 bzw. 175BR eingesetzt. Des Weiteren wurden LS-Säulen (Kapazität 1×10^8 Zellen) sowie die automatisierte Variante der MACS-Sortierung, der AutoMACS, (alles Miltenyi Biotec, Deutschland) verwendet. Aus der Zellmischung wurden zuerst die Tumorzellen, dann die Makrophagen und im letzten Separationsschritt die Fibroblasten isoliert.

2.2.3.3. Kultur auf Matrigelbeschichtung

Der Kulturansatz für die Matrigelversuche fand auf 6-Well-Platten statt. Zunächst wurde das Matrigel auf Eis aufgetaut und 2 ml des 1:100 verdünnten Matrigel-Medium-Gemischs (5 µl Matrigel auf 500 µl RPMI1640-Medium) pro Well auf die Platten gegeben. Es folgte nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur (RT) das Abnehmen des Matrigel-Medium-Gemisches. Folglich wurden je 2 ml der auf 1×10^5 /ml verdünnten Tumorzellen (HT-29, HCT 116) auf die Platten gegeben und für 24 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Anschließend erfolgten standardmäßig das Ernten und die Weiterverarbeitung der Zellen wie unter 2.2.3.2 beschrieben. Parallel dazu wurden Kontrollen der Tumorzelllinien ohne Beschichtung der Gefäße auf 6-Well-Platten angesetzt.

2.2.4. RNA-Analytik

2.2.4.1. Präparation von Gesamt-RNA aus Zellen und Frischgewebe

Mit Hilfe des peqGOLD TriFast™-Reagenz von peqLab wurde die Gesamt-RNA aus den kultivierten Tumorzellreihen, den getrennten Kokulturen und aus kryoasserviertem Gewebe von 39 Kolonkarzinomen des Kollektivs isoliert.

Für die Zellpräparation wurde auf die 100mm-Ø-Kulturschalen je 1 ml TriFast™ gegeben, anschließend das Lysat mehrmals mit der Pipette auf- und abgesogen und in ein Reaktionsgefäß überführt. Je Kolonkarzinom wurden 50-100 µg Gewebe mit 1 ml TriFast™ homogenisiert. Nach einer Inkubationszeit von 5 min bei RT musste 0,2 ml Chloroform pro ml Lysat/Gewebehomogenat zugegeben werden. Das Gemisch wurde 15 Sekunden stark geschüttelt, dann bei RT 5 min inkubiert und anschließend 5 min bei 12000 U/min und 4°C zentrifugiert. Nach Phasentrennung wurde die obere farblose, wässrige Phase, in welcher sich RNA anreicherte, vorsichtig in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 0,5 ml Isopropanol pro ml TriFast™ präzipitiert. Nach anschließender zehnmütiger Inkubation bei RT und Zentrifugation (10 min, 12000 U/min, 4°C) wurde das erhaltene RNA-Pellet mit 1 ml 75%-igem Ethanol zweimal gewaschen und anschließend wieder zentrifugiert (10 min, 12000 U/min, 4°C). Nach Abnahme des Überstandes und Lufttrocknen des Pellets bei RT für 20 bis 30 min erfolgte im Anschluss die Aufnahme des RNA-Pellets in eine entsprechende Menge RNase-freien Wassers (DEPC-Wasser). Um die RNA vollständig zu lösen, wurde sie für 10 min bei 64°C im Thermoblock inkubiert. Daraufhin erfolgte im Photometer die Konzentrationsmessung von Gesamt-RNA in den einzelnen Proben. Die Lagerung der isolierten RNA erfolgte bei -80°C.

Alle Arbeiten mit RNA wurden unter RNase- freien Bedingungen durchgeführt.

2.2.4.2. Reverse Transkription

Die Umschreibung der extrahierten zellulären RNA in cDNA erfolgte mittels des Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Sample Kits von Roche unter Verwendung einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase. Der Ansatz wurde mit 2 µg/µl RNA pro Probe, sowie 1 µl Oligo(dT)₁₈ (50 pmol/µl) auf 11,4 µl mit DEPC-Wasser aufgefüllt, für 10 min bei 65 °C vorinkubiert, anschließend auf Eis abgekühlt und mit 8,6 µl des in Anlage II befindlichen Reaktionsansatzes pro Probe ergänzt (Gesamtvolumen: 20 µl). Die cDNA-Synthese wurde über 30 min bei 55°C im Thermocycler durchgeführt. Die Reaktion konnte durch Hitzeinaktivierung (5 min, 85°C) und anschließender Abkühlung auf 4°C terminiert werden. Für die nachfolgende semiquantitative Polymerase-Kettenreaktion (PCR) kamen 1 µl, für die quantitative PCR 2 µl des Reaktionsansatzes zum Einsatz.

2.2.5. DNA-Analytik

2.2.5.1. Semiquantitative Polymerase-Kettenreaktion

Die spezifische cDNA-Amplifikation für das Heparansulfat-Proteoglykan Syn-1 erfolgte mit dem peqGOLD Taq-DNA-Polymerase Kit von PeqLab. Die Reagenzien eines 50 µl Ansatzes finden sich in Anlage III. Als spezifische Oligonukleotid-Primer wurden die in Tab. 2.2 von BioTeZ Berlin-Buch eingesetzt. Als Negativkontrolle wurde eine Probe ohne cDNA mitgeführt. Die In-vitro-Vermehrung erfolgte mittels eines Thermocyclers in 3 Schritten mit insgesamt 28 Zyklen:

- | | | |
|-----------------------------------------------------|-------------------|-----|
| 1. Denaturierung der DNA | (4 min bei 94°C) | |
| Denaturierung | (1 min bei 94°C) | └─┘ |
| 2. Primerannealing | (1 min bei 58°C) | 28x |
| Elongation | (1 min bei 72°C) | └─┘ |
| 3. finale Elongation mit der <i>Taq</i> -Polymerase | (10 min bei 72°C) | |
| 4. Kühlen | (auf 4°C) | |

Dabei betrug die spezifische Annealingtemperatur für Syn-1 58°C. Der Nachweis der PCR-Produkte erfolgte anschließend mittels Agarose-Gelelektrophorese (Vgl. Kapitel 2.2.5.3).

Primer	Primer-Richtung	Primer-Sequenz	Produktgröße
18S rRNA	sense	5'-CGG CTA CCA CAT CCA AGG-3'	186bp
	antisense	5'-GCT GGA ATT ACC GCG GCT-3'	
Syn-1	sense	5'-CCC CGT TTC TGG TGG TCT-3'	159bp
	antisense	5'-TCC CAG CAT TCA CTT CTC AC-3'	

Tab. 2.2: Primer der PCR.

2.2.5.2. Quantitative Polymerase-Kettenreaktion

Isolierung von Plasmid-DNA

Um ein Syn-1-Plasmid bzw. ein 18S-Plasmid zu erstellen, fand das TOPO TA Cloning® Kit (Invitrogen) Einsatz. Dieses Reaktionssystem ermöglichte in einem Schritt das direkte Einbringen von mittels *Taq*-Polymerase amplifizierten PCR-Produkten in einen Plasmidvektor. Hierzu fand mittels des Enzyms DNA-Topoisomerase I eine Klonierung des gewünschten DNA-Abschnittes im TOPO®-Vektor statt. Dazu wurde für die Ligation 4 µl des

PCR-Produktes (Vgl. Kapitel 2.2.5.1) auf Eis aufgetaut, nach Zugabe von 2 µl des Ligationsansatzes vorsichtig durchmischt, für 5 min bei RT inkubiert und anschließend wieder auf Eis gegeben. Es folgte das Überführen des pCR[®]2.1-TOPO[®]-Konstruktes in OneShot[®] kompetente *E. coli*-Zellen (TOP10). Dazu wurden 2 µl der Ligationsreaktion in eine den Vektor enthaltende Kulturflasche gegeben, vorsichtig durchmischt, für 30 min auf Eis inkubiert und anschließend, nach 30 s Hitzeschock im 42°C Wasserbad, zu 250 µl vorgewärmtem SOC-Medium (37°C) gegeben. Es folgte eine einstündige Inkubation bei 37°C auf dem Schüttler (200 U/min). Von diesem Transformationsansatz wurden 50 µl auf einer, für die Selektion mit Ampicillin beimpften, vorgewärmten LB-Kulturplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Separation rekombinanter Vektoren erfolgte mittels Blau-Weiß-Screening, wozu die Nährplatten 1 h vor dem Ausplattieren der *E. coli* mit 40 µl X-Gal-Lösung und IPTG-Lösung (0,1M) bestrichen wurden. Von den so selektierten Kolonien überführte man jeweils eine Kolonie in ein mit Nährmedium versetztes 15ml-Tube, inkubierte es über Nacht bei 37°C um anschließend die Plasmidpräparation durchzuführen.

Um die gewonnene Plasmid-DNA aus den *E. coli*-Kulturen zu isolieren, wurde das QIAprep Spin Miniprep Kit eingesetzt, welches auf die Methode der alkalischen Lyse von Birnboim und Doly (1979) basiert. Die Präparation erfolgte nach Herstellerangaben.

Quantitative Real-time-PCR am LightCycler[®]

Der LightCycler[®] ermöglichte eine schnelle Echtzeit-Analyse der PCR-Amplifikation mittels Microvolumen-Fluorimeter unter Einsatz des in dieser Arbeit verwendeten Fluorophors SYBR[®] Green I, ein sequenzunabhängiger interkalierender Farbstoff. Das Fluoreszenzsignal wurde bei 530 nm erfasst und stieg proportional zur erhaltenen Menge des PCR-Produktes. Um die Spezifität dieses PCR-Produktes zu bestimmen, wurde im Anschluss eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt.

Unter Verwendung des Syber Green Kits von Quantace kamen die Reagenzien aus Anlage IV mit einem Gesamtvolumen von 20 µl sowie die in Tab. 2.2 angegebenen Primer zum Einsatz. Die Schmelztemperatur wurde auf 65°C festgelegt. Die Amplifikation erfolgte in 35 Zyklen. Als Positivkontrolle und zur exakten Quantifizierung der cDNA-Moleküle jeder Probe wurde das spezifisch hergestellte Plasmid in einer festgelegten Verdünnung (10^{-3}) bei jedem Lauf mitgeführt. Als Leerwert diente eine Probe ohne cDNA. Um die mRNA-Menge der einzelnen Proben untereinander vergleichen zu können, musste zunächst die Gesamt-mRNA-Menge mittels eines Housekeeping-Gens bestimmt werden. Dabei erfolgte in einem Parallelansatz die Amplifikation von 18S rRNA (BioTeZ, Berlin), um anschließend unter Bildung des Quotienten aus Anzahl der zu analysierenden cDNA und mRNA-Anzahl des Housekeeping-Gens die einzelnen Proben vergleichen zu können. Die Mengen exprimierter

mRNA wurden in artifizielle Einheiten (a.u.) angegeben und stellen die Ratio von Syndecan- und 18S rRNA-Transkriptmenge dar. Zur Überprüfung der PCR-Produkte wurden die DNA-Fragmente in einem 2%igen Agarosegel (Kapitel 2.2.5.3.) elektrophoretisch aufgetrennt (15 µl PCR-Produkt/5 µl Probenpuffer).

2.2.5.3. Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der cDNA-Fragmente erfolgte für 18S rRNA und Syn-1 mit einem 2%igen Agarosegel. Hierzu wurden 2 g Agarose auf 100 ml Gesamtvolumen mit TBE gelöst und 3 min in der Mikrowelle bei 600 W aufgeköcht. Unter Zusatz von 5 µl des Fluoreszenzfarbstoffes Ethidiumbromid (0,5 µg/ml) wurde das abgekühlte Gel in die Gelkammer gegossen. Als Gel- und Laufpuffer diente 1xTBE (5xTBE (pH 8,3): 54 g Tris, 27,5 g Borsäure (Na-Salz), 20 ml 0,5M EDTA, ad 1l dH₂O). Die Auftragung der Proben erfolgte nach Zusatz von 5 µl DNA-Probenpuffer (50% Glycerol, 1 mM EDTA, 0,4% Bromphenolblau). Zusätzlich wurde pro Gel ein Standardmarker (5 µl HyperLadder™ IV) mitgeführt. Der Elektrophoreselauf fand bei 50-100 V für 60 min statt. Anschließend konnten die Banden densitometrisch ausgewertet werden.

2.2.6. Proteinchemische Methoden

2.2.6.1. Proteinextraktion

Die Proteinbestimmung erfolgte an Tumorfriischgewebe des KRK. Hierfür wurden exemplarisch 22 Fälle mit geringer und 17 Fälle mit hoher immunhistochemischer Expression im Tumorzentrum auf den Proteingehalt untersucht. Hierfür wurden 50-100 µg des kryoasservierten Gewebes mit 5 Vol eiskaltem Lysispuffer versetzt und für 10 s mit dem Ultraturrax homogenisiert. Es folgte für 60 min die Inkubation auf Eis. Anschließend wurde das Lysat 10 min bei 10.000 U/min (4°C) abzentrifugiert. Die Überstände wurden aliquotiert und bei -80°C gelagert.

2.2.6.2. Proteinquantifizierung

Die Bestimmung des Gesamtproteingehaltes der Gewebeextrakte erfolgte colorimetrisch nach der Methode nach Lowry unter Verwendung des DC Protein Assay (Bio-Rad). Dafür wurde auf eine Mikrotiterplatte zu 5 µl Probe bzw. Standard (BSA) je 25 µl Reagenz A (alkalische Kupfertartatlösung) und 200 µl Reagenz B (Folin Reagenz) gegeben und unter Schütteln 15 min inkubiert. Anschließend wurde die Absorption der Proben bei 750 nm im Photometer bestimmt. Anhand der Eichkurve der mitgeführten BSA- Standard- Verdünnungsreihe (0-3 mg/ml) ließen sich die Konzentrationen der Proteinextrakte ablesen.

2.2.6.3. ELISA

Der Gehalt an Syndecan-1-Protein der Karzinomproben wurde mit dem sCD138 (Syndecan-1) ELISA KIT (Cell Science, Inc., Canton, MA, USA) quantitativ bestimmt. Das Test-Kit enthielt mit dem primären Antikörper vorbeschichtete Mikrotiterwells sowie einen Standard des jeweiligen Proteins zur Herstellung einer Standardverdünnungsreihe (8-256ng/ml). Als Negativkontrolle diente der Kit-eigene als Leerwert mitgeführte Standardverdünnungspuffer. Der Antigennachweis wurde entsprechend der Herstellerangaben auf dem ELISA-Shaker durchgeführt. Die Absorption wurde bei 750 nm am ELISA-Reader gemessen. Die Quantifizierung erfolgte durch Auftragen der Messdaten der Tumorproben gegen die eingesetzten Standard-Konzentrationen. Die berechneten Proteinkonzentrationen wurden in ng/ml bzw. pg/ml Gesamtprotein angegeben.

2.2.7. Funktionelle in-vitro-Untersuchungen (Zellkulturassays)

2.2.7.1. Hemmung von Syn-1-mRNA mittels siRNA-Transfektion

Um den Einfluss von Syn-1 auf die Adhäsion, Migration und Invasion der Tumorzellen zu untersuchen, erfolgte die Inhibierung der Syn-1-Expression mittels Antisense-Oligonukleotidsequenz-Technik mit small interfering RNA (siRNA) gegen Syn-1 (sc-36587, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg). Hierzu wurden die HT-29- und HCT 116-Zellkulturen in je 35-mm-Ø-Zellkulturschalen verpflanzt und zunächst für 24 h in antibiotikafreies und FBS-reduziertes Medium (GIBCO™ Opti-MEM I, Invitrogen) gegeben, um eine zusätzliche Schädigung der Zellen zu vermeiden. Unter Verwendung des Lipofectamine™2000 Transfektions-Kits (Invitrogen, Groningen, Niederlande) wurden die Tumorzellen standardisiert nach Herstellerangaben mit der spezifischen siRNA transfiziert. Die Kulturen wurden für weitere 24 h bei 37°C inkubiert und standen anschließend den funktionellen Zellkulturassays zur Verfügung.

2.2.7.2. Etablierung der siRNA-Transfektion an humanen Kolonzelllinien

Zur Untersuchung des Einflusses von Syn-1 auf die Adhäsion, Migration und Invasion der Tumorzellen HT-29 und HCT 116 wurde die mRNA-Expression mittels gegen Syn-1 gerichteter siRNA ausgeschaltet. Zur Etablierung der siRNA-Transfektion wurden die Tumorzellen auf 35mm-Ø-Platten mit Lipofectamin in ansteigenden siRNA-Konzentrationen (10, 20 und 50 nM) und unterschiedlichen Transfektionszeiten (24 h und 48 h) unter standardisierten Bedingungen behandelt. Bei einer siRNA-Konzentration von 20 nM und eine Transfektionszeit von 48 h zeigte sich sowohl für HCT 116 und HT-29 die stärkste mRNA-

Reduktion von Syn-1 (Einzelergebnisse nicht gezeigt). Darauf aufbauend kamen die etablierten Konzentrationen und Inkubationszeiten für die Transfektion von Syn-1 in den in-vitro-Assays zur Anwendung.

2.2.7.3. Adhäsionsassay

Mit dem Adhäsionsassay wurde die Fähigkeit der Tumorzellen bestimmt, in welchem Maße sie sich an die Oberfläche bestimmter Matrixproteine anheften können. Zum Einsatz kamen 96-Well-Mikrotiterplatten, welche in einem Zweifachansatz entweder ohne Zusatz belassen, oder 2 h vor Versuchsbeginn mit 100 μ l Matrigel (10 μ g/ml), sowie 2 Tage vor Versuchsbeginn mit 100 μ l Fibroblasten pro Well beschichtet wurden. Es folgte die Abnahme des verbliebenen Überstandes. Um den Einfluss von Syn-1 auf die Adhäsion der Tumorzelllinien HT-29 und HCT 116 bestimmen zu können, labelte man diese Zelllinien in einem Parallelversuch mit siRNA gegen das Proteoglykan Syn-1 für 24 h bei 37°C (Vgl. Kapitel 2.2.7.1). In Vorbereitung auf den Assay wurden die Tumorzellen zunächst für 1 h bei 37 °C mit 25 μ l/Kulturplatte Calcein-AM (5 μ l auf 1 ml DMSO) fluoreszenz-gelabelt, anschließend dreifach mit PBS gewaschen, standardisiert geerntet, in 5 ml Medium aufgenommen und daraufhin je 100 μ l der HT-29-, HCT 116-Kulturen und ihre jeweils mit siRNA gegen Syn-1 behandelten Ansätze auf die Wells gegeben. Nach 30 bzw. 60 min erfolgte die Fluoreszenzmessung bei einer Wellenlänge von 494 bis 520 nm im Spektralfluorometer SPECTRAmax® GEMINI. Hierzu wurde zunächst die Gesamtanzahl der im Well befindlichen Zellen gemessen, anschließend der Überstand abgenommen, dreimalig mit PBS gespült und erneut die nun ausschließlich adherierten Zellen bestimmt.

2.2.7.4. Migrationsassay

Mit dem Migrationsassay wurde die Fähigkeit der Tumorzellen erfasst, durch eine semipermeable Membran zu wandern. Dafür kamen Transwell-Chamber, bestehend aus zwei Kammern getrennt durch einen Polycarbonfilter der Porengröße 8 μ m, zum Einsatz. In einem Parallelansatz fanden gegen Syn-1 gerichtete siRNA-gelabelte Zellen Anwendung (Vgl. Kapitel 2.2.7.1). In die untere Kammer des Gefäßes wurden im ersten Schritt je nach Reaktionsansatz entweder 500 μ l RPMI1640 oder verdünnte THP-1-Suspensionszellen (1×10^5) gegeben. Die Zellmonolayer wurden mit Trypsin/EDTA-Lösung geerntet, im Coulter Counter ZII gezählt, um anschließend in die obere Kammer (300 μ l pro Well in einer Zelldichte von 1×10^5) in die obere Kammer des Transwell-Chambers überführt zu werden. Die Kulturdauer betrug 24 h. Hiernach war es möglich, die migrierten Zellen an der Unterseite des Filters zu ernten. Hierzu wurden die Filter zunächst 3fach mit PBS-Lösung gewaschen, mit Trypsin-EDTA-Lösung für 5 min inkubiert und die gelösten Zellen mit 500 μ l

PBS-Lösung von der Filterunterseite abgespült. Daraufhin erfolgte im Coulter Counter ZII nach Zugabe von 9,5 ml isotonischer Salzlösung die Zellzahlmessung. Als Kontrolle diente hierbei eine 48-Well-Platte zur Bestimmung des Verhältnisses migrierter Zellen zur Gesamtzellzahl. Alle Reaktionsansätze wurden dreifach durchgeführt.

2.2.7.5. Invasionsassay

Mit dem Invasionsassay wurde eine Situation geschaffen, welche das in-vivo-Verhalten der Tumorzellen an der Basalmembran nachbildete. Als Kulturgefäß fand ein mit einem Polycarbonatfilter versetzter 24-Well-Transwell-Chamber® Einsatz (siehe Abb. 2.1). Der Filter wurde in diesem Versuch jedoch 2 h vor Versuchsbeginn mit Matrigel® beschichtet. Dieses enthielt mit Laminin, Kollagen IV und Proteoglykanen Hauptbestandteile der Basalmembran. In das obere Kompartiment wurden pro Well 300 µl verdünnte Zellsuspension gegeben, entweder die eigenständige HT-29-/HCT 116-Kultur mit 1×10^5 Zellen oder mit Zusatz der Stromazellen 175BR (1×10^5) oder THP-1 (1×10^5). In das untere Kompartiment wurde 500 µl RPMI1640-Kulturmedium gefüllt. Der weitere Kulturansatz, das Ernten sowie Zählen der invasiven Zellen erfolgte wie beim Migrationsassay (Vgl. Kapitel 2.2.7.3). Auch hier wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt.

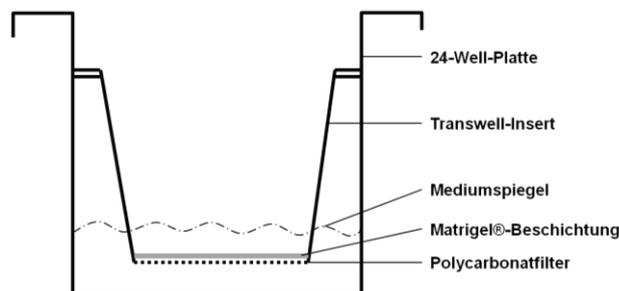


Abb. 2.1: Querschnitt eines Transwell-Chambers.

2.2.8. Statistische Auswertung und Fotodokumentation

Die statistische Auswertung erfolgte mit freundlicher Unterstützung von Frau Dipl.-Ök. B. Peters, Biomathematikerin am Institut für Biometrie und medizinische Informatik der medizinischen Fakultät Magdeburg. Zur Prüfung der Häufigkeitsverteilung sowie der Unabhängigkeit kategorisierter Variablen kamen der Chi-Quadratstest nach Pearson und der exakte Test nach Fischer zum Einsatz. Zur Detektion von Mittelwertunterschieden zwischen den Merkmalen wurden der Paardifferenzen-t-Test für abhängige und der Standard-t-Test für unabhängige Stichproben eingesetzt. Um die Überlebenswahrscheinlichkeit zu berechnen kam die Methode nach Kaplan-Meier zur Anwendung. Mittels ROC-Analyse erfolgte die Schwellenwertermittlung für den IRS bezüglich der immunhistochemischen Expression von Syn-1.

Als Signifikanzniveau bei den statistischen Tests wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha=0,05$ angenommen, womit alle p-Werte $<0,05$ als signifikant galten. Hochsignifikante Ergebnisse lagen bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p<0,001$ vor.

Die Darstellung von Boxplots erfolgte unter Angabe der Mediane, der 75%- und der 25%-Perzentilen ohne Berücksichtigung der Ausreißer. Die in den Tabellen angegebenen Werte entsprechen den Mittelwerten (MW) \pm Standardabweichungen (SD).

Bei der Datenbearbeitung und statistischen Analyse kamen Microsoft Office Excel 2003 SP2 und die SPSS- Software (SPSS-Incorporation, Version 17.0 für Windows, Chicago, USA) zum Einsatz.

Die Fotodokumentation erfolgte lichtmikroskopisch in 40-, 100-, 200- und 400-facher Vergrößerung mittels der INFINITY Kamera und wurden mittels der INFINITY ANALYZE Software (Lumenera Corporation, Ottawa, Kanada) bearbeitet.

3. Ergebnisse

3.1. Charakterisierung des Untersuchungskollektivs

3.1.1. Sporadisches kolorektales Karzinom

Das Gesamtkollektiv für das sporadische KRK umfasste 177 Patienten, von denen 102 (57,6%) männlich und 75 (42,4%) weiblich waren. Das Durchschnittsalter zum Operationszeitpunkt lag bei $67,3 \pm 10,7$ Jahren (min-max: 40-90 Jahre). 72 Fälle (40,7%) konnten dabei dem proximalen (bis zur linken Kolonflexur reichend), 105 Fälle (59,3%) dem distalen (einschließlich des kolorektalen Übergangs) Kolonabschnitt zugeordnet werden. Weitere klinisch-pathologische Daten der 177 Patienten sind in den Tab. 3.1 und 3.2 ersichtlich.

Klinische und morphologische Prognosefaktoren

Ein Follow-up in Hinblick auf Überleben, Lokalrezidiv oder Spätmetastasierung erfolgte in jährlichen Abständen über einen Gesamtzeitraum bis zu 133 Monaten (durchschnittliche Nachbeobachtungszeit: 43,5 Monate). Insgesamt verstarben von 108 Patienten (61%) im Untersuchungszeitraum, so dass für 69 Patienten (39%) das Follow-up zum Zeitpunkt der Erstellung der Dissertation noch nicht abgeschlossen war. 25 Patienten (14,1%) erkrankten an einem Lokalrezidiv, 100 Patienten (56,5%) wiesen eine Spätmetastasierung in Leber, Lunge, Hirn oder Peritoneum auf. Zusammenfassend erlitten 116 Patienten (65,5%) ein Rezidiv und/oder eine Spätmetastase.

Bezüglich der **klinischen-pathologischen Faktoren** waren eine fortgeschrittene Tumorausdehnung/Tumorstadium, das Vorhandensein von Lymphknoten- und/oder Fernmetastasen, eine Lymph-, Venen- oder Nerveninfiltration sowie eine Spätmetastasierung mit einem signifikant schlechteren **Gesamtüberleben** assoziiert (Kaplan-Meier-Analyse, Tab. 3.1). Für die Analyse des **krankheitsfreien Überlebens** wurden alle Patienten mit R0-Resektion und ohne Metastasierung (n=123) sowie alle Patienten mit zeitgleicher Entfernung der Metastase zum Zeitpunkt der Tumorresektion (n=12) berücksichtigt (Gesamtkollektiv: 135 Patienten). Ein fortgeschrittenes Tumorstadium und/oder lokales Tumorwachstum, eine Lymphknoten- und/oder Fernmetastasierung sowie eine Lymphgefäß- oder Veneninfiltration korrelierten mit einem signifikant kürzeren krankheitsfreien Überleben (Tab. 3.2).

Die **morphologischen Parameter der Invasionsfront** korrelierten ebenfalls mit dem Gesamt- und krankheitsfreien Überleben. In Fällen mit Karzinomen mit einer Invasionsfront vom infiltrativen Typ und/oder bei positivem Tumorzellbudding bestätigte die Kaplan-Meier-Analyse eine signifikant kürzere Gesamt- und krankheitsfreie Überlebenszeit als bei

Patienten mit Karzinomen mit einer Invasionsfront vom expansiven Typ und/oder Fehlen von Tumorzellbuds (Tab. 3.1 + 3.2).

3.1.2. Kolorektales Adenom und frühinvasive Kolonkarzinome

Das Kollektiv der kolorektalen Adenome setzte sich aus 97 Patienten zusammen, wobei das mittlere Alter zum Zeitpunkt der Operation $65,7 \pm 11,3$ Jahre (min-max: 43-89 Jahre) betrug und die Geschlechter auf 41 (42,3%) weibliche und 56 (57,7%) männliche Personen verteilt waren. Die weiteren klinisch-pathologischen Daten zu Adenomtyp, Dysplasiegrad und Adenomlokalisierung sind der Tab. 3.7 im Kapitel 3.2.3.2 zu entnehmen. Zusätzlich wurden 14 frühinvasive Kolonkarzinome (pT1N0) von 5 männlichen und 9 weiblichen Patienten mit einem Durchschnittsalter von $65,5 \pm 11,0$ Jahren untersucht.

3.2. Immunhistochemische Expressionsanalysen

3.2.1. Validierung der TMAs und der Gesamtpräparate

Bezüglich der Morphologie und der Syn-1-Expression des Kolongewebes zeigte sich ein homogenes Verteilungsmuster innerhalb der vier Stanzten eines Patientenfalls, so dass die Einzelstanzen exemplarisch für das gesamte Tumorzentrum stehen. In der Abb. 3.1 ist ein Tumor mit den vier dazugehörigen Stanzten sowie ein TMA exemplarisch dargestellt.

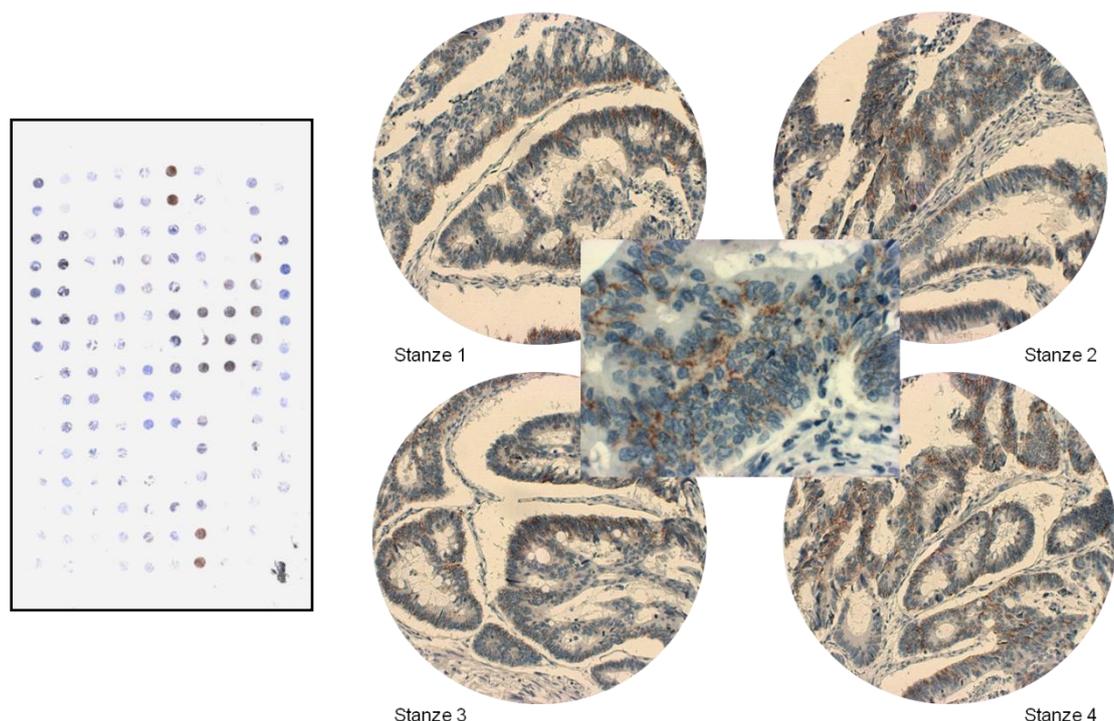


Abb. 3.1: Übersichtsscan des TMA mit den Karzinomfällen Nr. 1-37, 4 Einzelstanzen des Karzinomfalles Nr. 32 sowie ein exemplarischer Ausschnitt aus Stanze 2 (Syn-1, x100, x400).

Klinisch-pathologische Faktoren	n (%)	5- Jahres- Überleben (%)	10- Jahres- Überleben (%)	Gesamtüberleben			p
				MW	Standard- fehler	95%-CI	
Geschlecht	177						
Männlich	102 (57,6)	40,5	25,1	60,1	5,22	49,8-70,3	0,819
Weiblich	75 (42,4)	48,4	26,4	60,6	6,17	48,5-72,7	
Tumorklassifikation	177						
Tumorausdehnung (T)							
pT1	8 (4,5)	50,0	50,0	73,6	18,4	37,8-109,8	<0,001
pT2	33 (18,6)	72,7	56,0	94,7	7,89	79,3-110,2	
pT3	96 (54,2)	39,4	18,2	53,7	5,23	43,4-64,0	
pT4	40 (22,6)	28,4	13,5	41,7	7,50	27,1-56,4	
Lymphknotenbefall (N)	177						
pN0	91 (51,4)	59,3	36,8	78,8	5,83	67,4-90,3	<0,001
pN1	42 (23,7)	35,9	13,5	48,7	7,20	34,5-62,7	
pN2	44 (24,9)	19,6	10,5	33,7	6,27	21,4-46,0	
Fernmetastasen (M)	177						
M0	123 (69,5)	59,3	37,7	78,8	4,98	69,0-88,7	<0,001
M1	54 (30,5)	6,7	2,2	20,9	3,32	14,5-27,4	
Veneninfiltration (V)	172						
V0	97 (54,8)	66,2	44,0	86,1	5,53	75,2-96,9	<0,001
V1	75 (42,4)	14,9	0	29,1	3,44	22,4-35,9	
Lymphgefäßinfiltration (L)	171						
L0	81 (47,8)	67,5	45,0	88,5	6,18	76,4-110,6	<0,001
L1	90 (52,6)	25,7	11,5	40,2	4,56	31,3-49,1	
Perineurale Karzinose (Pn)	166						
Pn0	134 (80,7)	52,5	32,6	71,5	4,86	62,0-81,1	<0,001
Pn1	32 (19,3)	19,6	7,8	31,4	5,41	20,8-42,0	
Tumorstadium (UICC)	177						
Stadium I	33 (18,6)	75,4	64,3	98,9	7,87	83,5-114,3	<0,001
Stadium II	49 (27,7)	56,8	23,6	70,3	7,63	55,4-85,3	
Stadium III	43 (24,3)	47,0	30,7	65,3	8,16	49,3-81,3	
Stadium IV	52 (29,4)	7,1	2,4	20,8	3,42	14,1-27,5	
Grading (G)	177						
G1	13 (7,3)	39,6	26,4	60,0	13,20	34,2-85,8	0,889
G2	127 (71,8)	45,1	22,8	60,4	4,90	51,4-69,5	
G3	37 (20,9)	39,4	32,8	58,8	9,60	40,0-77,6	
Invasionsfront	175						
Invasionstyp							
Expansiv	80 (45,7)	68,4	34,3	84,5	5,42	73,9-95,2	<0,001
Infiltrativ	95 (54,2)	22,7	17,9	41,8	5,15	31,8-51,9	
Budding-Typ	175						
Negativ	73 (41,7)	71,4	37,4	87,5	5,63	76,5-98,6	<0,001
Positiv	102 (58,3)	24,6	16,0	41,8	4,86	32,3-51,4	
Spätmetastasierung	177						
Negativ	77 (43,5)	79,9	71,0	110,5	5,36	100,0-121,1	<0,001
Positiv	100 (56,5)	19,5	0,3	31,8	3,28	25,4-38,3	
Lokalrezidiv	177						
Negativ	152 (85,9)	45,8	28,3	62,6	4,58	53,6-71,5	0,474
Positiv	25 (14,1)	33,7	16,1	53,6	8,81	36,3-70,8	
Tumorlokalisation	177						
Proximal	72 (40,7)	36,2	18,6	51,4	6,26	39,0-63,6	0,097
Distal	105 (59,3)	48,3	28,2	66,2	5,31	55,7-76,6	

Tab. 3.1: Klinisch-pathologische Daten des Karzinomkollektivs in Bezug auf das Gesamtüberleben.
n= Anzahl untersuchter Fälle bzw. zur Verfügung stehender Daten.

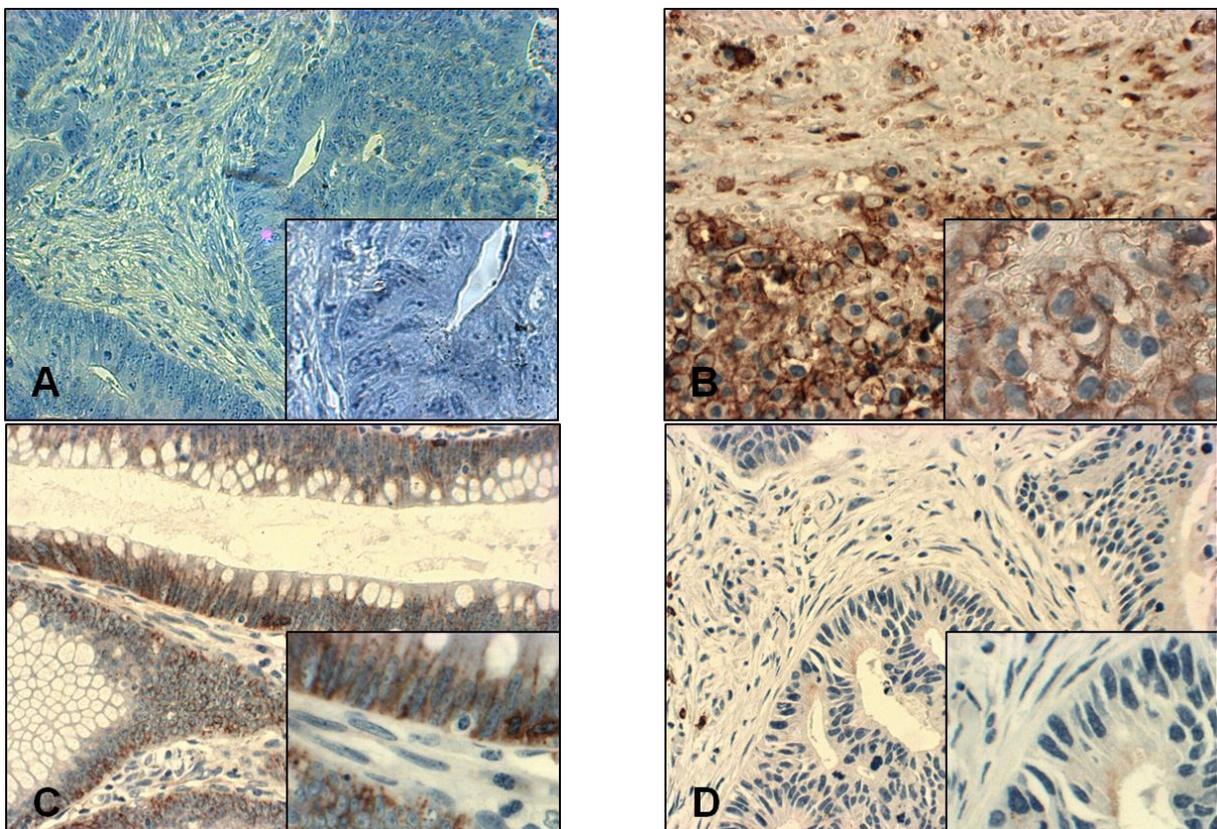
Klinisch-pathologische Faktoren	n (%)	5-/10-Jahres-krankheitsfreies Überleben (%)		Krankheitsfreies Überleben			p
				MW	Standardfehler	95%-CI	
Geschlecht	135						
Männlich	75 (55,6)	41,4	30,7	61,1	6,53	48,3-73,9	0,333
Weiblich	60 (44,4)	54,8	28,7	66,9	6,64	53,9-79,9	
Tumorklassifikation	135						
Tumorausdehnung (T)							
pT1	8 (5,9)	50,0	50,0	68,8	16,85	35,7-101,8	0,020
pT2	30 (22,2)	68,0	57,1	88,7	9,17	70,6-106,6	
pT3	70 (51,9)	44,8	16,1	55,4	5,90	43,9-67,0	
pT4	27 (20,0)	29,5	22,1	49,1	10,31	28,8-69,3	
Lymphknotenbefall (N)	135						
pN0	83 (61,5)	57,1	38,1	76,4	6,24	64,1-88,6	0,003
pN1	28 (20,7)	38,3	38,3	54,6	9,02	36,9-72,3	
pN2	24 (17,8)	26,3	10,5	38,0	8,24	21,8-54,2	
Fernmetastasen (M)	135						
M0	123 (91,1)	51,0	33,0	69,4	5,16	59,3-79,5	<0,001
M1	12 (8,9)	0,9	0	22,7	7,35	8,4-37,2	
Veneninfiltration (V)	131						
V0	96 (72,3)	58,9	39,1	77,8	5,82	66,4-89,2	<0,001
V1	35 (26,7)	17,1	0,8	30,2	4,81	20,8-39,6	
Lymphgefäßinfiltration (L)	131						
L0	76 (58,0)	64,9	45,9	85,7	6,47	73,1-98,4	<0,001
L1	55 (42,0)	26,0	13,0	39,3	5,66	28,3-50,4	
Perineurale Karzinose (Pn)	130						
Pn0	113 (86,9)	50,9	33,8	69,9	5,40	59,3-80,5	0,105
Pn1	17 (13,1)	31,7	15,8	41,2	8,57	24,4-58,0	
Tumorstadium (UICC)	135						
Stadium I	33 (24,4)	67,5	57,6	88,6	8,78	71,4-105,8	<0,001
Stadium II	49 (36,3)	50,8	21,6	65,2	7,97	49,5-80,8	
Stadium III	41 (30,4)	38,3	23,0	51,5	7,66	36,6-66,6	
Stadium IV	12 (8,9)	0,9	0	22,7	7,35	8,3-37,2	
Grading (G)	135						
G1	11 (8,1)	45,5	30,3	60,1	13,93	32,8-87,4	0,780
G2	99 (73,3)	45,5	26,1	61,5	5,40	50,9-72,0	
G3	25 (18,6)	55,1	36,8	71,8	11,47	49,4-94,4	
Invasionsfront	134						
Invasionstyp							
Expansiv	71 (53,0)	60,4	34,4	75,3	5,91	63,7-86,9	0,001
Infiltrativ	63 (47,0)	32,9	22,4	49,5	6,81	36,2-62,8	
Budding-Typ	134						
Negativ	66 (49,3)	63,5	36,1	78,5	6,01	66,7-90,3	<0,001
Positiv	68 (50,7)	32,2	21,9	48,6	6,53	35,8-61,3	
Tumorlokalisation	135						
Proximal	57 (42,2)	33,3	22,8	49,3	6,37	36,9-61,8	0,020
Distal	78 (57,8)	57,2	35,3	73,8	6,35	61,3-86,2	

Tab. 3.2: Klinisch-pathologische Daten des Karzinomkollektivs in Bezug auf das krankheitsfreie Überleben. n= Anzahl untersuchter Fälle bzw. zur Verfügung stehender Daten.

In 170 Fällen (96%) konnten mindestens 3 der 4 Gewebestanzungen ausgewertet werden. Für 7 Fälle waren weniger als drei Stanzungen auswertbar, so dass in diesen Fällen für die statistische Auswertung die Immunreaktion des Tumorzentrums am transmuralen Präparat bewertet wurde. Von 107 Tumorpräparaten stand auch Nichttumorgewebe zur Verfügung, welches ebenfalls mittels Microarray-Technik verarbeitet und immunhistochemisch auswertbar war. Alle 175 transmuralen Präparate der Karzinome mit Anteilen der Invasionsfront sowie die Präparate der 12 Leber- und 20 Lymphknotenmetastasen, der 97 Adenome und 14 Frühkarzinome waren vollständig auswertbar und konnten alle in die statistische Wertung einbezogen werden.

3.2.2. Beurteilung der immunhistochemischen Färbung von Syndecan-1

Zur Validierung der immunhistochemischen Detektion von Syn-1 wurden als Negativkontrolle Proben, die in einer Lösung ohne primären Antikörper inkubierten, mitgeführt (Abb. 3.2 A). Als interne Positivkontrolle dienten Plasmazellen (Abb. 3.2 B). Für die homogene und vergleichbare immunhistochemische Reaktion der verschiedenen Färbereihen wurden die Fälle Nr. 180 mit starker und Nr. 150 mit schwacher Gesamtexpression sowie die Fälle Nr. 31 mit starker und Nr. 45 mit schwacher Membranexpression in jeder Färberrunde als Kontrollen mitgeführt (Abb. 3.2 C-F).



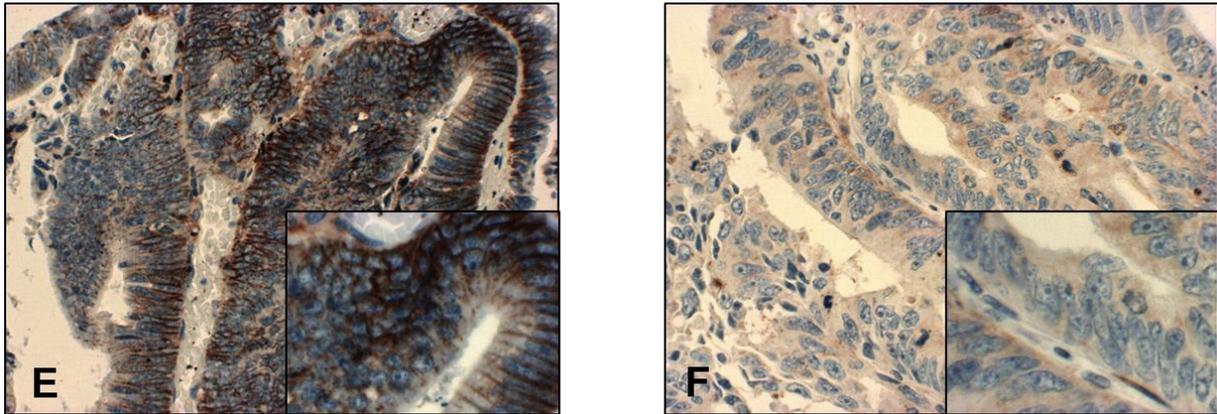


Abb. 3.2: Immunhistochemische Reaktion von Syn-1: Negativkontrolle an Fall-Nr. 21/Stanze 2 (A), Positivkontrolle an internen Plasmazellen (B), starke (C) und schwache (D) Syn-1-Gesamtexpression in den Karzinomfällen 180 und 150 bzw. starke (E) und schwache (F) Syn-1-Membranfärbung in den Fällen 31 und 45 (A) (Syn1, x200, x400).

3.2.3. Ergebnisse der immunhistochemischen Analysen

3.2.3.1. Expression der nichttumorösen Kolonmukosa

In der histologisch unauffälligen Kolonschleimhaut zeigte sich in den Epithelzellen eine gesamtheitlich starke Syn-1-Expression mit einem überwiegend zirkumferentiellen membranständigen Expressionsmuster. Im Stroma lies sich mit Ausnahme von Plasmazellen keine Syn-1-Expression nachweisen (Abb. 3.3).

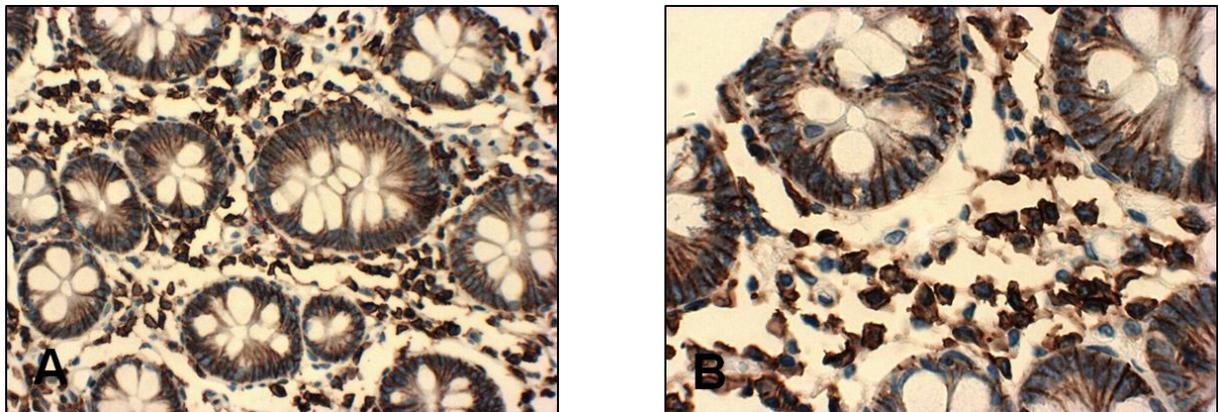


Abb. 3.3: Syn-1-Expression im Nichttumorgewebe (Fall-Nr. 18/Stanze 4, x200 (A), x400 (B)).

3.2.3.2. Expression der Organ- und Lymphknotenmetastasen

An den 12 exemplarisch untersuchten Lebermetastasen sowie den 20 ausgewählten Lymphknotenmetastasen des Karzinomkollektivs konnte im Metastasenzentrum eine mäßige, partiell membranöse Syn-1-Expression der Tumorepithelien verzeichnet werden. An der Invasionsfront zeigte sich eine deutliche Abnahme der Gesamtexpression mit Verlust der membranösen Expression bis hin zum vollständigen Expressionsverlust der Tumorbuds (Abb. 3.4).

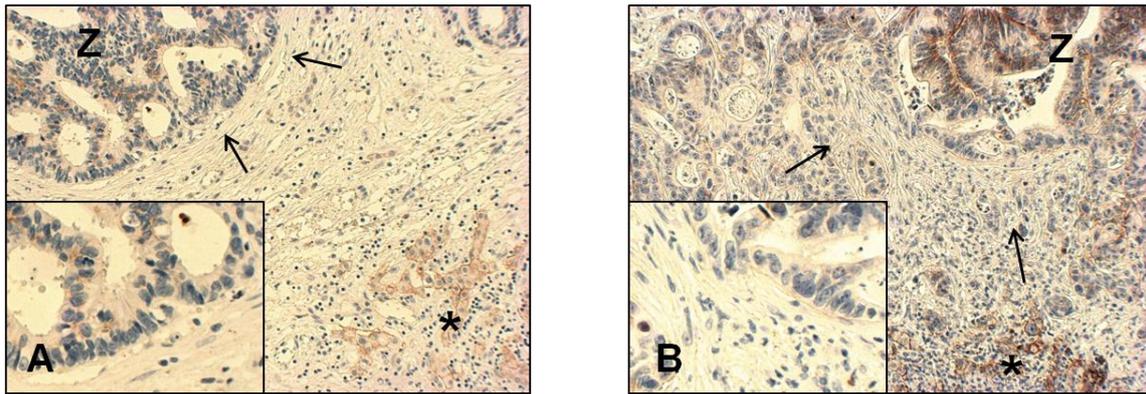


Abb. 3.4: Syn-1-Expression im Tumorepithel einer Lebermetastase (A) bzw. Lymphknotenmetastase (B) mit je Metastasenzentrum (Z), Invasionsfront (→) und Leber- bzw. Lymphknotengewebe (*) (x100, x 200).

3.2.3.3. Expression im Kolonkarzinom

Die immunhistochemischen Expressionswerte (IRS) von Syn-1 im Tumorzentrum, an der Invasionsfront sowie in den Tumorbuds und ihr Zusammenhang zu den klinisch-pathologischen Daten sind ausführlich in Tab. 3.3 dargestellt. Im Mittelwertsvergleich der IRS zwischen den einzelnen Gruppen korrelierte eine geringe Syn-1-Expression im Tumorzentrum und/oder an der Invasionsfront signifikant mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium/lokaler Tumorausdehnung, einer Lymphknoten-, Fern- und/oder Spätmetastasierung sowie einer Infiltration von Lymphgefäßen, Venen oder Nerven.

Klinisch-pathologische Faktoren	n (%)	Immunohistochemische Expression von Syn-1											
		Zytoplasmatische Expression				Membranöse Expression				Gesamtexpression			
		Tumorzentrum	p	Invasionsfront	p	Tumorzentrum	p	Invasionsfront	p	Tumorzentrum	p	Invasionsfront	p
Geschlecht	177												
Männlich	102 (57,6)	10,8±7,3	0,263	4,7±4,5	0,202	1,5±0,9	0,471	0,7±0,7	0,002	12,6±8,4	0,141	5,5±5,1	0,112
Weiblich	75 (42,4)	12,1±7,8		5,8±4,8		1,6±0,9		1,2±0,9		13,8±7,9		7,0±5,6	
Tumorklassifikation	177												
<u>Tumorausdehnung (T)</u>													
pT1	8 (4,5)	16,6±7,7	<0,001	11,3±3,1	<0,001	2,0±0	<0,001	1,7±0,6	<0,001	18,2±6,8	<0,001	13,0±2,6	<0,001
pT2	33 (18,6)	16,4±5,3		9,4±4,4		2,2±0,6		1,6±0,7		19,4±5,6		11,0±4,9	
pT3	96 (54,2)	9,6±6,8		3,9±4,0		1,2±0,8		0,7±0,7		11,0±7,9		4,7±4,6	
pT4	40 (22,6)	10,2±7,2		4,1±3,9		1,4±0,9		0,7±0,7		11,9±8,1		4,8±4,5	
<u>Lymphknotenbefall (N)</u>	177												
pN0	91 (51,4)	13,3±7,0	<0,001	6,6±4,8	<0,001	1,7±0,8	0,003	1,1±0,9	0,025	15,5±7,9	0,001	7,7±5,5	<0,001
pN1	42 (23,7)	10,3±7,5		5,6±5,1		1,5±0,8		0,9±0,8		12,2±8,5		6,4±5,9	
pN2	44 (24,9)	8,2±6,1		2,7±2,8		1,2±0,8		0,7±0,7		9,5±6,9		3,4±3,4	
<u>Fernmetastasen (M)</u>	177												
M0	123 (69,5)	12,5±7,2	0,003	6,3±4,8	<0,001	1,7±0,9	0,006	1,1±0,9	0,005	14,8±8,1	0,004	7,4±5,5	<0,001
M1	54 (30,5)	8,9±6,5		3,2±3,7		1,2±0,8		0,6±0,7		10,3±7,7		3,8±4,2	
<u>Veneninfiltration (V)</u>	172												
V0	97 (54,8)	13,1±7,4	<0,001	7,0±4,8	<0,001	1,7±0,9	0,002	1,1±0,9	0,002	15,5±8,3	<0,001	8,2±5,5	<0,001
V1	75 (42,4)	9,1±6,4		3,3±3,6		1,3±0,8		0,7±0,7		10,4±7,3		3,9±4,2	
<u>Lymphgefäßinfiltration (L)</u>	171												
L0	81 (47,8)	13,8±7,0	<0,001	7,0±4,8	<0,001	1,8±0,9	0,001	1,2±0,8	0,001	16,1±7,9	<0,001	8,3±5,5	<0,001
L1	90 (52,6)	9,2±6,8		3,9±4,1		1,2±0,8		0,7±0,8		10,8±7,7		4,6±4,8	
<u>Perineurale Karzinose (Pn)</u>	166												
Pn0	134 (80,7)	12,6±7,0	<0,001	6,2±4,6	<0,001	1,7±0,8	<0,001	1,0±0,8	0,006	14,8±7,8	<0,001	7,2±5,2	<0,001
Pn1	32 (19,3)	6,4±5,5		1,8±2,7		0,9±0,7		0,5±0,7		6,7±5,9		2,4±3,3	
Tumorstadium (UICC)	177												
Stadium I	33 (18,6)	17,1±5,9	<0,001	9,9±4,0	<0,001	2,3±0,6	<0,001	1,7±0,8	<0,001	20,3±5,8	<0,001	11,7±4,6	<0,001
Stadium II	49 (27,7)	11,3±7,1		5,1±4,3		1,4±0,9		0,9±0,7		13,1±8,3		5,9±4,9	
Stadium III	43 (24,3)	9,6±6,7		4,5±4,5		1,4±0,8		0,8±0,8		11,3±7,5		5,3±5,2	
Stadium IV	52 (29,4)	9,2±6,6		3,4±3,6		1,3±0,8		0,7±0,7		10,6±7,7		4,0±4,2	

Klinisch-pathologische Faktoren	n (%)	Immunhistochemische Expression von Syn-1											
		Zytoplasmatische Expression				Membranöse Expression				Gesamtexpression			
		Tumorzentrum	p	Invasionsfront	p	Tumorzentrum	p	Invasionsfront	p	Tumorzentrum	p	Invasionsfront	p
Grading (G)	177												
G1	13 (7,3)	14,6±6,3		6,1±3,7		1,7±0,6		1,0±0,5		16,6±6,8		7,1±3,9	
G2	127 (71,8)	11,3±7,0	0,216	5,4±4,7	0,595	1,6±0,9	0,358	0,9±0,8	0,662	12,9±8,0	0,379	6,3±5,4	0,723
G3	37 (20,9)	10,4±7,9		4,6±4,8		1,3±0,9		1,0±0,8		12,6±9,1		5,6±5,6	
Invasionsfront	175												
<u>Invasionstyp</u>													
Expansiv	80 (45,7)	14,0±7,2	<0,001	8,0±4,7	<0,001	1,9±0,9	<0,001	1,2±0,8	<0,001	17,0±7,7	<0,001	9,3±5,4	<0,001
Infiltrativ	95 (54,2)	8,9±6,4		3,0±3,2		1,2±0,8		0,7±0,7		10,1±7,3		3,7±3,8	
<u>Budding-Typ</u>	175												
Negativ	73 (41,7)	14,1±6,9	<0,001	7,8±4,6	<0,001	1,9±0,9	<0,001	1,2±0,8	<0,001	17,0±7,4	<0,001	9,0±5,3	<0,001
Positiv	102 (58,3)	9,2±6,7		3,3±3,7		1,3±0,8		0,7±0,8		10,4±7,6		4,1±4,3	
Spätmetastasierung	177												
Negativ	77 (43,5)	13,1±7,8	0,045	7,1±4,8	<0,001	1,8±1,0	0,016	1,3±0,8	<0,001	15,1±8,5	0,024	8,4±5,5	<0,001
Positiv	100 (56,5)	14,5±7,1		4,0±4,2		1,4±0,8		0,7±0,8		11,9±7,8		4,7±4,8	
Lokalrezidiv	177												
Negativ	152 (85,9)	11,4±7,2	0,748	5,3±4,7	0,955	1,5±0,9	0,812	0,9±0,8	0,669	13,2±8,1	0,821	6,2±5,4	0,986
Positiv	25 (14,1)	10,9±7,6		5,2±4,7		1,6±0,9		1,0±0,9		12,8±8,8		6,2±5,5	
Tumorlokalisation	177												
Proximal	72 (40,7)	10,6±7,2	0,301	4,6±4,4	0,199	1,4±0,9	0,323	0,9±0,8	0,496	12,5±8,1	0,470	5,6±5,1	0,221
Distal	105 (59,3)	11,8±7,2		5,7±4,8		1,6±0,9		1,0±0,8		13,5±8,3		6,6±5,5	

Tab. 3.3: Klinisch-pathologische Daten und immunhistochemische Expression von Syn-1 in den kolorektalen Karzinomen. n=Anzahl untersuchter Fälle bzw. zur Verfügung stehender Daten. %=gültiger prozentualer Anteil am zur Verfügung stehenden Datensatz.

3.2.3.4. Zonale Expression im Kolonkarzinom

Es zeigten sich Unterschiede in der Syn-1-Expression der einzelnen **Zonen des Tumors**, so dass die Expression von Tumorzentrum, Invasionsfront sowie der Tumorbuds miteinander verglichen wurden. Die dem Tumorzentrum entsprechenden Karzinomgewebe der TMAs zeigten eine mäßige bis starke Expression von Syn-1 (MW IRS \pm SD: 13,1 \pm 8,2), wobei ein überwiegend basolaterales, membranständiges Expressionsmuster beobachtet wurde. An der Invasionsfront der transmuralen Schnitte lies sich eine deutliche Abnahme der Intensität der Syn-1-Färbung (6,2 \pm 5,4) bis hin zu einem fast vollständigen Verlust in den Tumorbuds (1,1 \pm 1,9) nachweisen. Der Unterschied in der Syn-1-Expression der drei Tumorzonen war hochsignifikant ($p < 0,001$) (Abb. 3.5).

Nach Differenzierung der **Invasionstypen** in eine expansive und eine infiltrative Form konnten ebenfalls Unterschiede in der Syn-1-Expression festgehalten werden. Sowohl für das Tumorzentrum als auch für die Invasionsfront wurden für den expansiven Infiltrationstyp höhere IRS-Werte als beim infiltrativen Typ erhoben (Tumorzentrum: 17,0 \pm 7,7 vs. 10,1 \pm 7,3; Invasionsfront: 9,3 \pm 5,4 vs. 3,7 \pm 3,8; jeweils $p < 0,001$; Tab. 3.3).

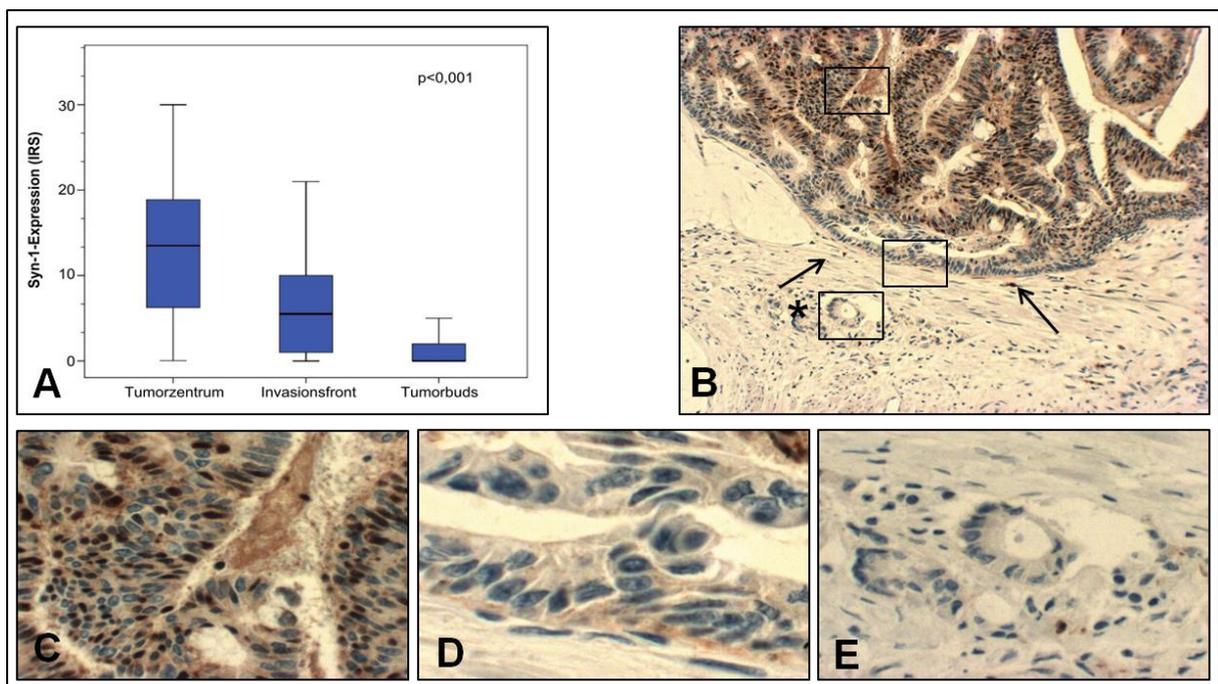


Abb. 3.5: Syn-1-Expression der unterschiedlichen Tumorzonen – Mittelwertsvergleich der immunreaktiven Scores (A), transmurales Schnittpräparat in Übersicht (B) mit Vergrößerungen des Tumorzentrums (C), der Invasionsfront (D, →) und der Tumorbuds (E, *) (Fall-Nr. 58, x100, x200).

3.2.3.5. Syndecan-1-Expression im Kolonkarzinom und Prognose

Es wurden mittels ROC-Analyse IRS-Schwellenwerte für das Tumorzentrum und die Invasionsfront ermittelt, die das Kollektiv in eine gering bzw. hoch exprimierende Gruppe separierten. Als Schwellenwert für den IRS im Tumorzentrum wurde ein IRS=15,5 (Sensitivität 70,7%, Spezifität 34,0%) und für die Invasionsfront ein Schwellenwert von IRS=8,5 (Sensitivität 85,9%, Spezifität 39,1%) bestimmt. Eine geringe Syn-1-Expression im Tumorzentrum (IRS<15,5) und/oder eine geringe Syn-1-Expression an der Invasionsfront (IRS<8,5) korrelierten signifikant mit einem kürzeren Gesamt- und/oder krankheitsfreien Überleben (Abb. 3.6, ausführliche Werte Tab 3.4/3.5).

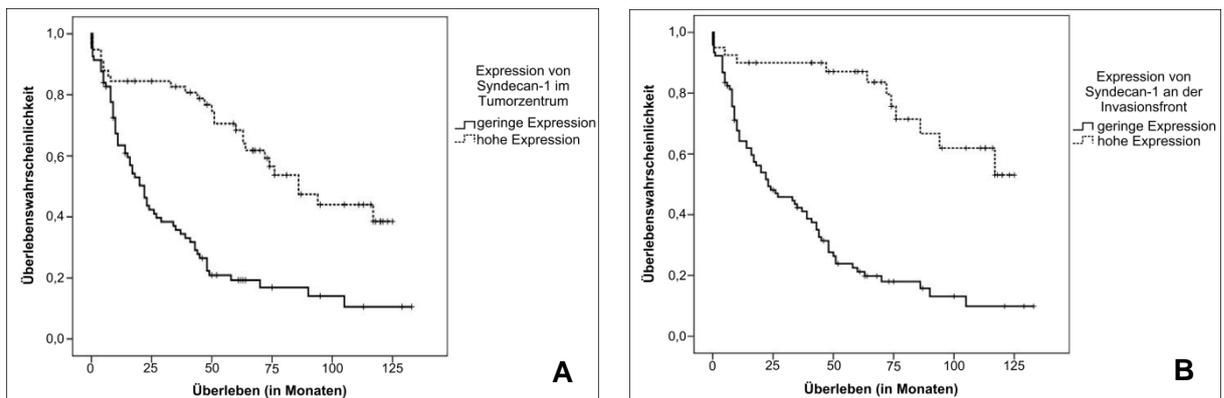


Abb. 3.6: Graphische Darstellung der Gesamtüberlebenswahrscheinlichkeit (nach Kaplan-Meier) in Abhängigkeit von geringer und hoher Syn-1-Expression. (A) Tumorzentrum; (B) Invasionsfront.

Immunohistochemische Expression von Syn-1	n (%)	5- 10- Jahres- Überleben (%)		Gesamtüberleben			p
		MW	Standardfehler	95%-CI			
Tumorzentrum	177						
geringe Expression (IRS<15,5)	103 (58,2)	19,3	10,5	37,7	4,86	28,1-47,2	<0,001
hohe Expression (IRS≥15,5)	74 (41,8)	70,6	38,5	81,6	6,23	69,3-93,3	
Invasionsfront	177						
geringe Expression (IRS<8,5)	123 (69,5)	21,2	9,8	39,8	4,53	31,0-48,9	<0,001
hohe Expression (IRS≥8,5)	54 (30,5)	87,1	53,1	98,3	6,68	85,2-111,4	

Immunohistochemische Expression von Syn-1	n (%)	5- 10- Jahres- Überleben (%)		Krankheitsfreies Überleben			p
		MW	Standardfehler	95%-CI			
Tumorzentrum	177						
geringe Expression (IRS<15,5)	103 (58,2)	43,8	35,1	66,4	8,46	49,8-83,0	0,009
hohe Expression (IRS≥15,5)	74 (41,8)	74,0	58,9	92,9	6,70	79,8-106,0	
Invasionsfront	177						
geringe Expression (IRS<8,5)	123 (69,5)	46,4	39,8	70,5	7,74	55,3-85,6	0,003
hohe Expression (IRS≥8,5)	54 (30,5)	83,5	63,8	101,1	7,10	87,2-115,0	

Tab. 3.4/ 3.5: Gesamtüberlebenszeit bzw. Krankheitsfreie Überlebenszeit in Abhängigkeit von der immunohistochemischen Expression von Syn-1 in Tumorzentrum und Invasionsfront.

3.2.3.6. Korrelation der immunhistochemischen Expression mit dem mRNA- sowie Proteingehalt von Syndecan-1

Zur Beurteilung der Aussagekraft der immunhistochemischen Ergebnisse wurde zusätzlich Tumorfriischgewebe auf den mRNA- sowie den Proteingehalt von Syn-1 untersucht. Hierzu wurden exemplarisch 22 Fälle mit geringer sowie 17 Fälle mit hoher immunhistochemischer Expression im Tumorzentrum (entsprechend der ROC-Analyse mit einem Schwellenwert von 15,5) auf den mRNA- sowie den Proteingehalt untersucht.

Aufgrund von Probenausfall bei fehlender mRNA-Qualität konnten 19 Proben mit geringer und 12 Proben mit hoher Syn-1-Expression auf den mRNA-Gehalt untersucht werden. Bzgl. des Proteingehaltes konnten alle ausgewählten Proben ausgewertet werden. Hierbei korrelierte der mRNA- und Proteingehalt von Syn-1 signifikant mit den immunhistochemischen Ergebnissen, d.h. eine geringe immunhistochemische Expression zeigte auch einen geringen mRNA- und Proteingehalt. Die Ergebnisse sind in Tab. 3.6 und Abb. 3.7 dargestellt.

Tumorzentrum	n	MW±SD	p
Syn-1-mRNA-Gehalt bei	31		
geringer IHC- Expression (IRS<15,5)	19	3,64 ±4,5	0,032
hoher IHC- Expression (IRS≥15,5)	12	11,12 ±13,4	
Syn-1-Proteingehalt bei	39		
geringer IHC- Expression (IRS<15,5)	22	101,2 ±66,3	<0,001
hoher IHC- Expression (IRS≥15,5)	17	221 ±110,3	

Tab. 3.6: Korrelation der immunhistochemischen (IHC) Syn-1-Expression mit dem mRNA- sowie Proteingehalt von Syn-1 im Tumorzentrum.

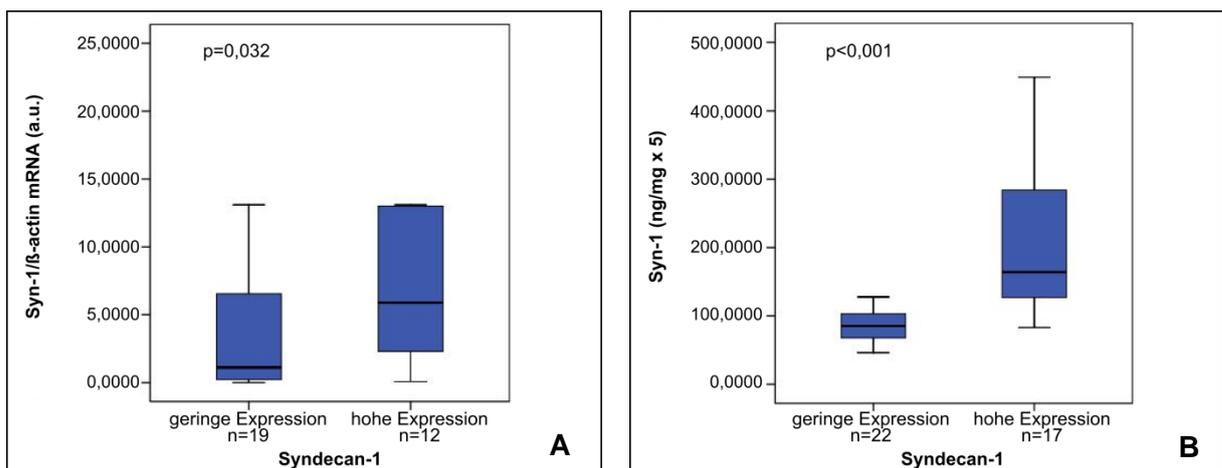


Abb. 3.7: Syn-1-mRNA- (A) sowie Syn-1-Proteingehalt (B) im Tumorzentrum bei geringer und hoher immunhistochemischer Syn-1-Expression.

3.2.3.7. Kolorektales Adenom

Bei der Korrelation der **klinisch-pathologischen Daten** mit der immunhistochemischen Expression von Syn-1 zeigten sich deutliche Unterschiede der Expression je nach Architektur sowie Dysplasiegrad der Adenome. Die tubulovillösen Adenome zeigten eine signifikante geringere Expression im Vergleich zum tubulären Adenom ($p=0,026$). Ebenfalls lag eine signifikant geringere Syn-1-Expression bei HGIN gegenüber den LGIN vor ($p<0,001$). Für die Faktoren Geschlecht und Lokalisation ließen sich keine signifikanten Unterschiede der immunhistochemischen Expression von Syn-1 finden (siehe Tab. 3.7).

Klinisch-pathologischer Faktor	n (%)	Immunhistochemische Expression von Syn-1	
		MW IRS± SD	p
Geschlecht	97		
Männlich	56 (57,7)	15,7±5,6	0,430
Weiblich	41 (42,3)	14,6±7,2	
Lokalisation	97		
Proximal	33 (34,0)	15,7±5,5	0,384
Distal	64 (66,0)	16,8±5,6	
Architektur	97		
Tubulär	56 (57,7)	17,6±5,1	0,026
Tubulovillös	41 (42,3)	14,7±5,9	
Dysplasiegrad	97		
LGIN	59 (60,8)	17,8±4,9	<0,001
HGIN	38 (39,2)	11,4±5,2	

Tab. 3.7: Klinisch-pathologische Daten und immunhistochemische Expression von Syn-1 im kolorektalen Adenom.

Des Weiteren wurde die immunhistochemische Expression von Syn-1 in den unterschiedlichen **Adenomzonen** untersucht (siehe Kapitel 2.2.2.2 Adenome), wobei es zu einer hochsignifikanten Abnahme der Expression von den apikalen Adenomabschnitten (MW IRS±SD 23,24±6,8), über zentrale Adenomanteile (15,79±6,4) nach basal (5,88±4,1) kam ($p<0,001$) (Abb. 3.8 und 3.9).

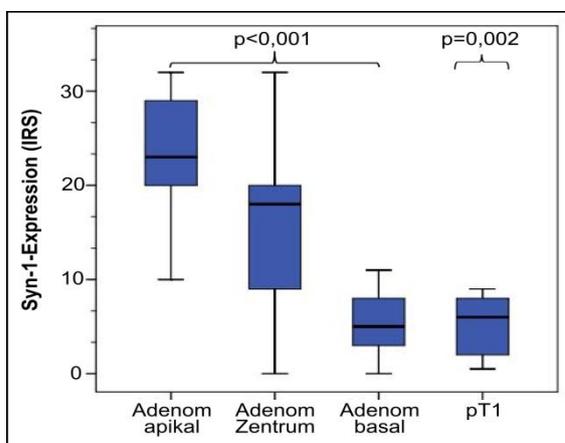


Abb. 3.8: Syn-1-Expression in den einzelnen Zonen des kolorektalen Adenoms (apikal, Zentrum, basal) sowie im Frühkarzinom (pT1).

Zusätzlich erfolgte der Vergleich zu lokal begrenzten Frühkarzinomen (pT1) im Kolorektum ($5,22 \pm 3,4$). In diesen zeigte sich eine signifikante Reduktion der Syn-1-Expression ($p=0,02$) gegenüber den Adenomzonen.

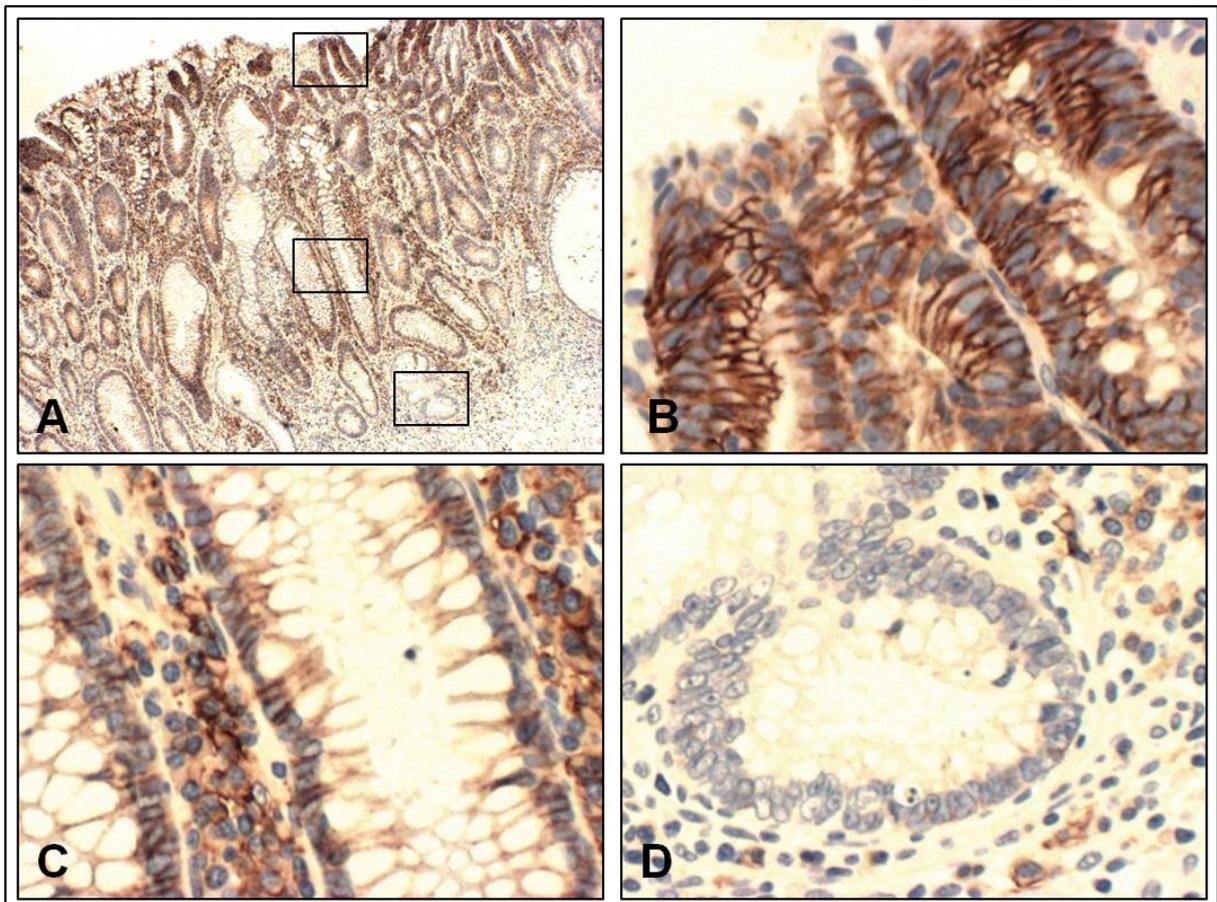


Abb. 3.9: Syn-1 in den Zonen des kolorektalen Adenoms: transmursales Schnittpräparat in Übersicht (A), apikale (B), zentrale (C) und basale Zone (D) in Vergrößerung (Fall-Nr. 1, x40, x200).

3.3. Molekularbiologische Untersuchungsergebnisse (in-vitro-Ergebnisse)

3.3.1. Charakterisierung der humanen Zelllinien

Die humanen Kolonzelllinien wurden hinsichtlich ihres Invasionspotentials und ihres Wachstumsverhaltens untersucht. Hierbei zeigte sich im Phasenkontrastmikroskop für die HT-29-Kultur eine Lagerung der Zellen in dichten Tumorzellclustern und eine typische rundzellige Epithelmorphologie (Abb. 3.10 A). Die HCT 116-Kultur zeigte ein überwiegend verstreuzelliges Wachstum der Epithelien mit vor allem spindelförmiger Zellmorphologie und pseudopodienartigen Zytoplasmaausstülpungen (Abb. 3.10 B).

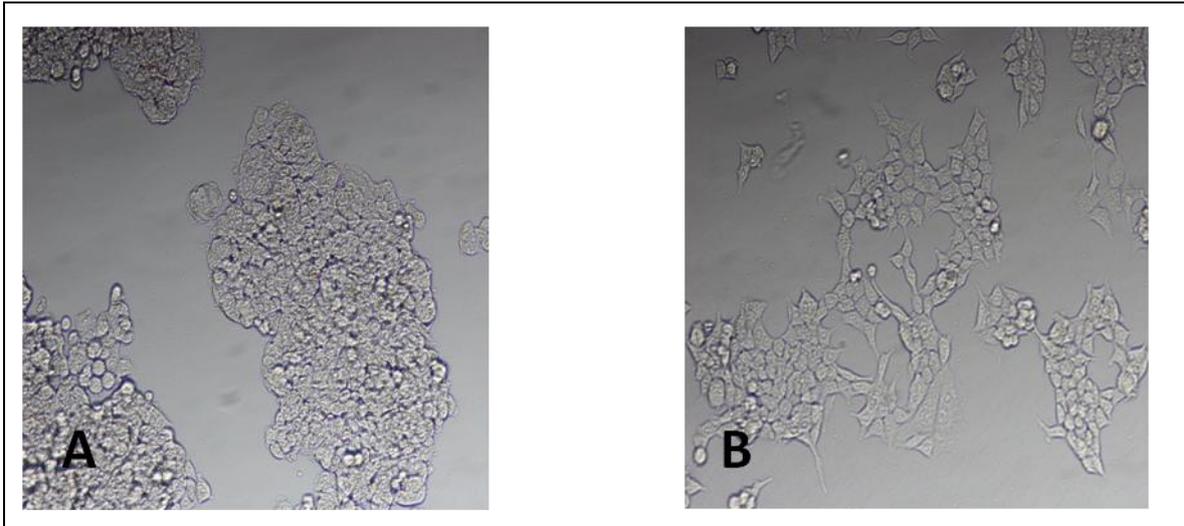


Abb. 3.10: Morphologie der Kolonzelllinien HT-29 (A) und HCT 116 (B) (Phasenkontrast, 100x).

Im Migrations-, Invasions- und Adhäsionsassay ließen sich deutliche Differenzen der Kolonzelllinien nachweisen (Abb. 3.11): So zeigten im Migrationsassay die HCT 116-Zellen ein doppelt so hohes Motilitätspotential (1,9%) verglichen mit der Zelllinie HT-29 (0,9%) ($p < 0,001$). Im Invasionsversuch überwandern 0,9% der HT-29-Zellen die Matrigelbarriere im Vergleich zu 3,4% der HCT 116-Zellen, was einer signifikanten Erhöhung auf das 3,78-fache entsprach ($p < 0,001$). Im Adhäsionstest zeigten die HT-29-Zellen mit 5,3% ein signifikant höheres adhäsives Verhalten als HCT 116-Zellen mit 3,3% ($p = 0,039$). Zusammenfassend ist die HCT 116-Zelllinie so als aggressivere Kolonkarzinomzelllinie zu bewerten.

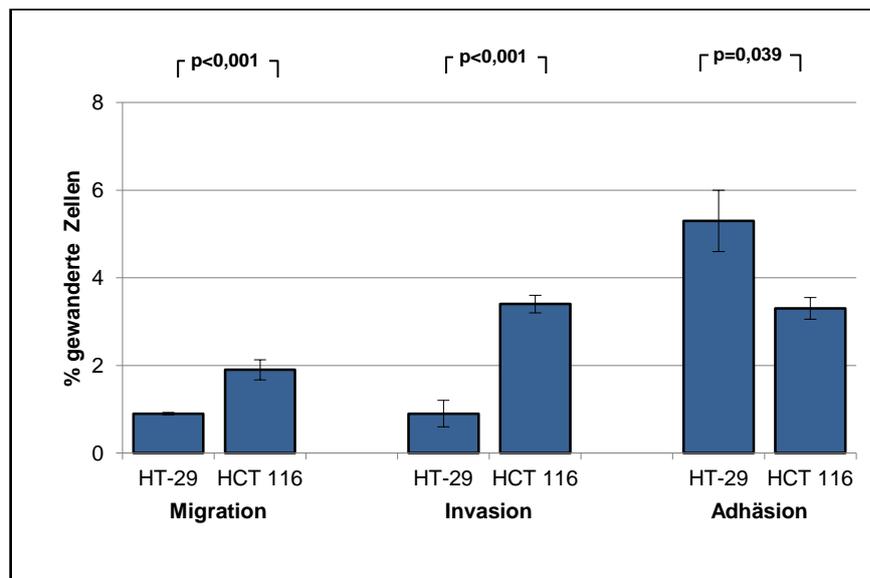


Abb. 3.11: Vergleichende graphische Darstellung der humanen Kolonzelllinien HT-29 und HCT 116 bezüglich ihres Migrations-, Invasions- und Adhäsionsverhaltens in in-vitro-Zellkulturassays.

3.3.2. mRNA-Expression von Syndecan-1 in humanen Tumorzelllinien

3.3.2.1. mRNA-Expression von Syndecan-1 in Monokultur

Zur Untersuchung, welche Zellen des Tumorverbandes (Tumorzellen oder tumorassoziierte Fibroblasten und/oder Makrophagen) zur Expression von Syn-1 in der Zellkultur als Nachbildung der in-vivo-Situation des Tumorzellverbandes beitragen, wurde zunächst die mRNA-Expression von Syn-1 in Monolayer-Kulturen untersucht. Hierbei zeigte sich für die HT-29-Kultur eine 3,5- bzw. 2,1-fach gesteigerte mRNA-Expression für Syn-1 im Vergleich zu HCT 116 bzw. zur Makrophagenzelllinie THP-1 ($p < 0,001$ bzw. $p = 0,011$) (Abb. 3.12). Fibroblasten wiesen keine Syn-1-Expression auf.

3.3.2.2. mRNA-Expression von Syndecan-1 in Kokultur

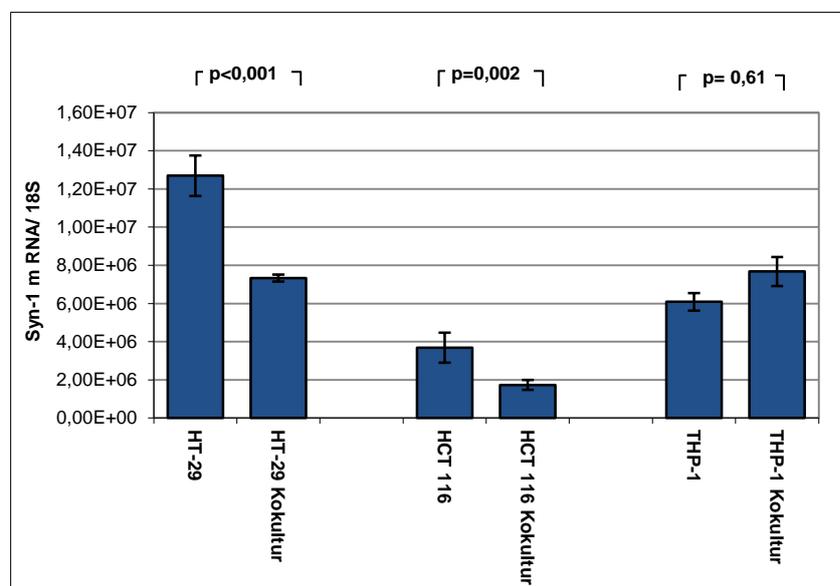


Abb. 3.12: mRNA-Expression von Syn-1 in der Mono- und Kokultur von HT-29 und HCT 116 sowie der Makrophagenlinie THP-1.

Folgend wurde die mRNA-Expression von Syn-1 in den Zelllinien HT-29 und HCT 116 nach Kokultur mit THP-1 sowie 175BR untersucht. Die Kokultivierung führte im Vergleich zur Monokultur zu einer signifikanten Reduktion der Syn-1-Expression um 42% bzw. 53% in den HT-29- bzw. HCT 116-Zellen ($p < 0,001$ bzw. $p = 0,02$) (Abb. 3.12). Die mRNA-Expression der Makrophagen wies keine signifikanten Änderungen auf ($p = 0,61$). Auch in Kokultur ließ sich keine Syn-1-Expression durch die Fibroblasten nachweisen.

3.3.3. Einfluss von Matrigel™ auf die Syndecan-1-mRNA-Expression

Um den Einfluss von Proteinen der Basalmembran auf die mRNA-Expression von Syn-1 zu untersuchen, wurden die humanen Kolonzelllinien in 35mm-Ø-Kulturschalen über 24 h ohne und mit Matrigelbeschichtung gehalten und ihr Syn-1-mRNA-Gehalt bestimmt. Im Vergleich zur Kultivierung ohne Beschichtung ließ sich für die HT-29-Zellen nach Anzucht auf Matrigel™ eine Reduktion der Syn-1-Expression auf 40,3% des Ausgangswertes nachweisen ($p=0,49$). Für HCT 116 ergab sich auf Matrigel™ eine Syn-1-mRNA-Reduktion auf 27,4% der Expression ohne Beschichtung ($p=0,30$) (Abb. 3.13).

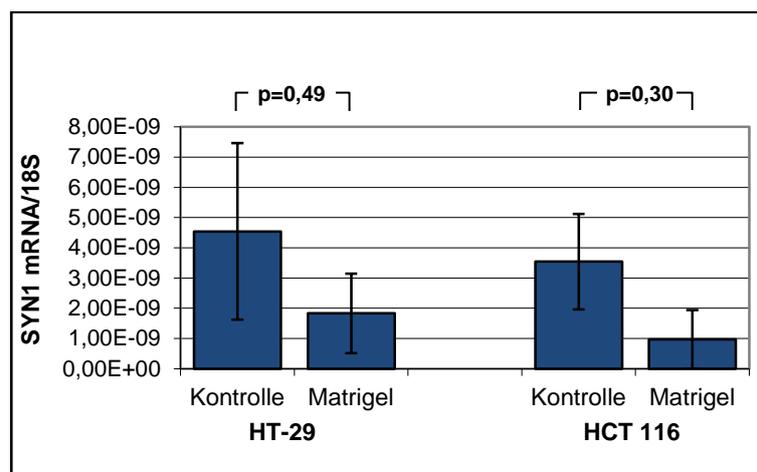


Abb. 3.13: mRNA-Expression von Syn-1 nach Kultur ohne und mit Matrigel™-Beschichtung in den Zelllinien HT-29 und HCT 116.

3.3.4. Funktionelle Zellkulturassays

In den funktionellen in-vitro-Assays wurde der Einfluss von Syn-1 sowie der Kontakt zu Matrigel™ oder Fibroblasten bzw. Makrophagen auf das Adhäsions-, Migrations- und Invasionspotential der Kolonkarzinomzelllinien HT-29 und HCT 116 entsprechend der in-vivo-Situation im Invasions- bzw. Metastasierungsprozess untersucht.

3.3.4.1. Adhäsionsassay

Im Adhäsionsassay wurde das Potential der HT-29- und HCT 116-Kulturen ermittelt, sich unter dem Einfluss von Syn-1 auf unterschiedlichen Matrices (Fibroblasten, Matrigel™, ohne Beschichtung) anzuheften (Abb. 3.14).

Beide Tumorzelllinien zeigten nach 30 min ein signifikant stärkeres adhärentes Verhalten an Matrigel (HT-29: 75% vs. 26%, $p<0,001$; HCT 116: 53% vs. 16%, $p=0,03$) sowie an Fibroblasten im Vergleich zur Monokultur (HT-29: 61% vs. 26% $p=0,01$; HCT 116: 79% vs. 16%, $p<0,001$). Nach 60 min blieb der Unterschied im Prozentsatz adhärenter HT-29- bzw. HCT 116-Zellen an Fibroblasten im Vergleich zur Monokultur bestehen (HT-29: 55% vs. 21%, $p<0,05$; HCT 116: 46% vs. 24%, $p<0,05$). Auch der Anteil adhärenter Zellen an

Matrigel war nach 60 min noch erhöht (HT-29: 34% vs. 21%, $p=0,28$; HCT 116: 35% vs. 24%, $p=0,79$). HT-29-Zellen zeigten nach 30 min ein vergleichbares adhärenthes Verhalten an Fibroblasten und Matrigel (61% vs. 75%, $p=0,42$), wohingegen nach 60 min der Anteil adhärenter Zellen an Fibroblasten höher als an Matrigel war (55% vs. 34%, $p=0,02$). HCT 116-Zellen wiesen ein gegensätzliches Verhalten auf mit initial signifikant höherem Prozentsatz adhärenter Zellen an Fibroblasten als an Matrigel (79% vs. 53%, $p<0,001$) und einer Annäherung der Werte nach 60 min (46% vs. 35%, $p=0,06$).

Die **Inhibierung von Syn-1** hatte keinen Einfluss auf das adhärenthes Verhalten der monokultivierten Tumorzellen (30 min – HT-29: 28% vs. 32%, $p=0,68$; HCT 116: 8% vs. 12%, $p=0,17$; 60 min – HT-29: 9% vs. 8%, $p=0,88$; HCT 116: 26% vs. 25%, $p=0,96$). Dahingegen resultierte die Hemmung von Syn-1 in einer signifikanten Reduktion der Adhäsion an Matrigel für die HT-29-Zellen nach 60 min und für die HCT 116-Zellen bereits nach 30 min (30 min – HT-29: 75% vs. 54%, $p=0,08$; HCT 116: 66% vs. 40%, $p=0,03$; 60 min – HT-29: 40% vs. 20%, $p=0,04$; HCT 116: 44% vs. 23%, $p=0,16$). Die Adhäsion an Fibroblasten war für die HT-29 nach Inhibierung mit siRNA leicht vermindert (30min – 85% vs. 56%, $p=0,12$; 60min - 72% vs. 54%, $p=0,23$), in den HCT 116-Zellen an Fibroblasten sogar signifikant reduziert (30 min - 73% vs. 22%, $p=0,02$; 60 min - 40% vs. 19%, $p=0,28$).

Zusammenfassend kann für Syn-1 ein Einfluss auf die Adhäsion von HT-29- als auch von HCT 116-Zellen abhängig von der jeweiligen Oberflächenbeschichtung belegt werden.

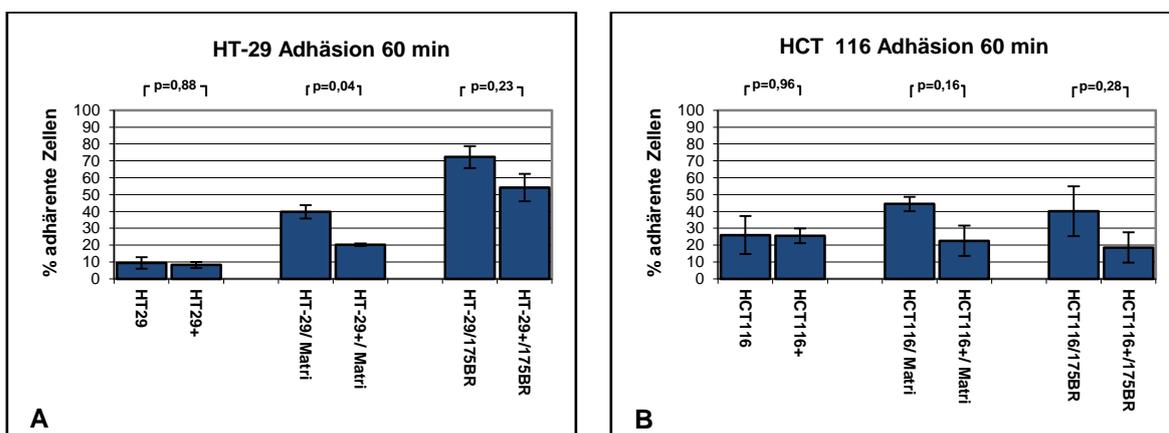


Abb. 3.14: Adhäsionsverhalten der Kolonkarzinomzellen HT-29 (A) und HCT 116 (B) nach 60 min. HT-29/HCT 116 = unbehandelte Zellen, HT-29+/HCT 116+ = siSyn-1- vorbehandelte Zellen.

3.3.4.2. Migrationsassay

Das Migrationsverhalten der Zellen in Mono- und Kokultur sowie nach Reduktion von Syn-1- mittels siRNA wurde im folgenden Assay analysiert. In Kokultur kam es zu einer starken Zunahme der Motilität nach Kontakt beider Tumorzelllinien mit Fibroblasten (HT-29: 0,21% vs. 4,18%, $p<0,001$; HCT 116: 6,31% vs. 9,75%, $p<0,001$). Ebenso war nach Kontakt zu

Makrophagen die Migration für HT-29-Zellen signifikant erhöht, für die HCT 116-Zellen tendentiell erhöht (HT-29: 0,21 vs. 1,40%, $p < 0,001$; HCT 116: 6,31% vs. 8,02%, $p = 0,208$). Insgesamt zeigten die HCT 116-Zellen sowohl mit Fibroblasten (9,75% vs. 4,18%, $p < 0,001$) als auch mit Makrophagen (8,02% vs. 1,40%, $p < 0,001$) einen stärkeren Motilitätsanstieg als die HT-29-Zellen.

Die Daten nach si-Transfektion sind in Abb. 3.15 dargestellt: Nach **Inhibierung von Syn-1** war für die monokultivierten HT-29-Zellen eine signifikante Zunahme der Migration zu verzeichnen (0,29% vs. 0,86%, $p = 0,01$), wohingegen der Verlust von Syn-1 nach Fibroblasten- bzw. Makrophagenkontakt nur zu einer leichten Migrationszunahme führte (2,43% vs. 2,76%, $p = 0,06$ bzw. 2,03% vs. 2,44%, $p = 0,09$). Die Inhibierung von Syn-1 führte zu einem leicht vermehrten prozentualen Anteil migrierender HCT 116-Zellen in Monokultur (7,35% vs. 8,53%, $p = 0,11$) und in Kokultur mit Fibroblasten (9,35% vs. 9,62%, $p = 0,56$) bzw. Makrophagen (5,38% vs. 5,82%, $p = 0,19$).

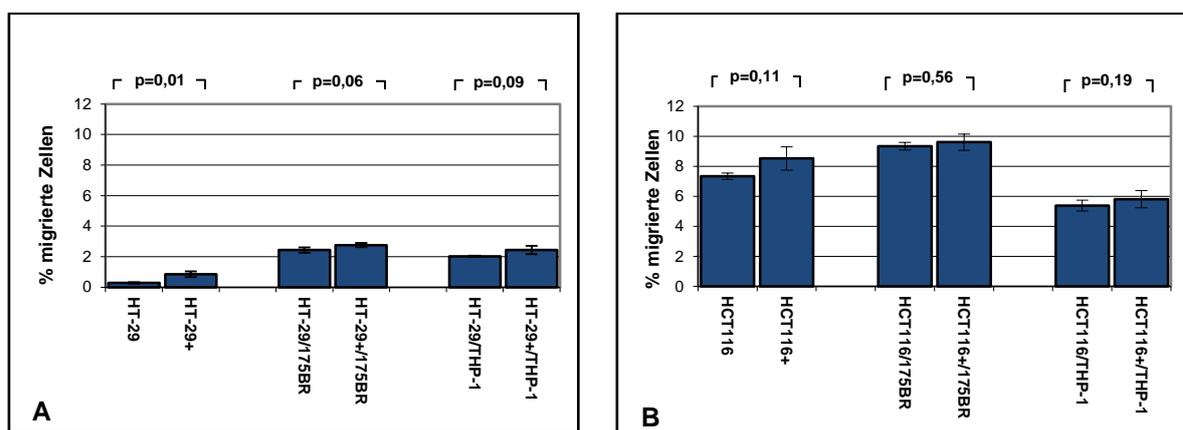


Abb. 3.15: Migrationsverhalten der Zelllinien HT-29 (A) und HCT 116 (B) in Mono- und Kokultur. HT-29/HCT 116 = unbehandelte Zellen, HT-29+/HCT 116+ = siSyn1-vorbehandelte Zellen.

3.3.4.3. Invasionsassay

Um das veränderte Invasionspotential der modifizierten Zellen im Vergleich zu den originalen HCT 116- bzw. HT-29-Zelllinien zu bestimmen, wurde das in-vitro-Invasionsassay mittels Matrigel beschichteter semipermeabler Membran sowohl in Mono- als auch Kokultur durchgeführt. Die stärkste prozentuale Zunahme invasiver Tumorzellen war für die HT-29-Zellen (0,09% vs. 0,38%, $p = 0,002$) bzw. HCT 116-Zellen (0,24% vs. 1,35%, $p < 0,001$) nach Kokultur mit Makrophagen zu verzeichnen. Die Kokultur mit Fibroblasten führte nur zu einer geringen Zunahme invasiver HT-29-Zellen (0,09% vs. 0,13%, $p = 0,288$) bzw. zu einer starken Zunahme invasiver HCT 116-Zellen (0,24% vs. 0,39%, $p = 0,219$).

Nach **Inhibition von Syn-1** (Abb. 3.16) ließen sich in Monokultur tendentiell weniger invasive HT29-Zellen (0,14% vs. 0,08%, $p=0,31$) und gleichbleibende Werte für die HCT116-Zellen (0,26% vs. 0,28%, $p=0,44$) messen. Zudem kam es zu einer Abnahme invasiver HT-29-Zellen nach Makrophagenkontakt und Inhibition von Syn-1 (0,24% vs. 0,13%, $p=0,03$). Dahingegen wies die HCT 116-Kokultur eine geringe prozentuale Zunahme invasiver Tumorzellen auf (1,38% vs. 1,64%, $p=0,35$). Die Syn-1-Hemmung führte in der Kokultur mit Fibroblasten für die HT-29-Zellen zu einer leichten und für die HCT 116-Zellen zu einer minimalen Zunahme des invasiven Potentials (HT-29: 0,12% vs. 0,19%, $p=0,01$; HCT 116: 0,41% vs. 0,46%, $p=0,11$).

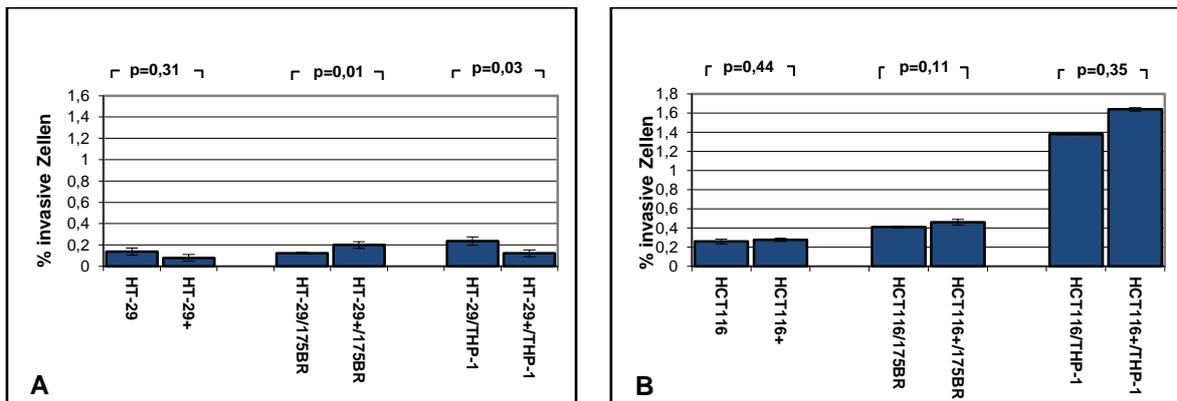


Abb. 3.16: Invasionsverhalten der Zelllinien HT-29 (A) und HCT 116 (B) in Mono- und Kokultur. HT-29/HCT 116 = unbehandelte Zellen, HT-29+/HCT 116+ = siSyn1-vorbehandelte Zellen.

4. Diskussion

Syndecan-1 nimmt als Heparansulfat-Proteoglykan an wichtigen tumorbiologischen Prozessen wie der Proliferation, der Zelladhäsion und der Tumormigration teil. Die Frage, welche Rolle Syn-1 in der lokalen Tumordinvasion und Metastasierung des kolorektalen Karzinoms einnimmt, ist bisher unbeantwortet. So wurde in dieser Arbeit die immunhistochemische Expression von Syn-1 im KRK in Korrelation mit den klinisch-pathologischen Daten vor allem im Vergleich von Tumorzentrum, Invasionsfront und Tumorbud sowie in Gegenüberstellung zum kolorektalen Adenom und gesunder Kolonschleimhaut untersucht. Weiterhin ging es um die Frage, inwieweit Unterschiede im Syn-1-Level des KRK auf Protein- bzw. mRNA-Ebene vergleichend mit der immunhistochemischen Expression vorhanden waren. Auch die Funktion von Syn-1 im Adhäsions-, Migrations- und Invasionsprozess kolorektaler Tumorzelllinien sollte anhand von Kokulturen mit Fibroblasten und Makrophagen als typische Zellen der Invasionsfront und funktionellen Zellkulturassays beleuchtet werden.

4.1. Patientenkollektiv, klinisch-pathologische Daten und Prognosefaktoren

Unter Berücksichtigung der immunhistochemischen Untersuchungsergebnisse wurde die Funktion von Syn-1 an der Invasionsfront des KRK betrachtet. Unter Analyse der Zusammensetzung des Patientenkollektivs stimmten die Verteilung von Alter, Geschlecht und klinisch-pathologischen Parametern mit der aktuellen Literatur überein [225]. Das Kollektiv zeigte sich repräsentativ hinsichtlich krankheitsfreiem und Gesamtüberleben. Im kolorektalen Adenom war das Patientengut bezüglich des intraepithelialen Neoplasiegrades und der Adenomlokalisierung gleichverteilt und somit repräsentativ.

Hinsichtlich der klinisch-pathologischen Daten des Karzinomkollektivs dieser Arbeit zeigte sich ein signifikant kürzeres Gesamtüberleben bei fortgeschrittener lokaler Tumorausdehnung (T) und fortgeschrittenem Tumorstadium (UICC (positivem Lymphknotenbefall (N) und Nachweis von Fernmetastasen (M), einer Veneninfiltration (V), Lymphgefäßinfiltration (L) oder perineuralen Karzinose (Pn))), bei infiltrativem Invasionstyp und positivem Budding-Typ sowie bei Auftreten einer Spätmetastasierung. Geschlecht, Tumorgrading, Lokalrezidiv und Tumorlokalisierung zeigten keinen Einfluss auf das Gesamtüberleben (siehe Tab. 3.1). Ähnliche Ergebnisse konnten mit Ausnahme der perineuralen Karzinose (Pn) für das krankheitsfreie Überleben gefunden werden (siehe Tab. 3.2). Somit sind die klinisch-pathologischen Faktoren, welche sich signifikant im Gesamt- und krankheitsfreiem Überleben unterschieden, als Prognoseparameter des KRK

anzunehmen. Dies stimmt mit der aktuellen Fachliteratur überein [213], [84], [83], [31], [29]. Ausgenommen hiervon ist der Faktor Tumorgrading, welcher in vorangegangenen Arbeiten als gesicherter prognostischer Marker für das KRK galt [213]. Im vorliegenden Kollektiv konnte jedoch kein signifikanter Unterschied in Abhängigkeit des Differenzierungsgrades nachgewiesen werden. Ursächlich hierfür ist möglicherweise das Überwiegen von G2-differenzierten Tumoren (71,8% aller Tumore) in dieser Arbeit, so dass keine repräsentative Gleichverteilung diesbezüglich vorlag.

Bei dem durch Jass et al. [84] erstmalig beschriebenen Tumor budding im KRK lösen sich an der Invasionsfront Zellen aus dem Tumorverband und treten als Einzelzellen oder Cluster von wenigen Zellen auf, verlieren einen Teil ihrer epithelialen Eigenschaften und ähneln mesenchymalen Zellen (=epitheliale mesenchymale Transition). Dabei geht die Stärke des *Tumor budding* mit einer gesteigerten Lymphknotenmetastasierung und einem fortgeschrittenen TNM-Stadium einher [90]. Als wichtigster histomorphologischer Faktor zur Identifikation von Hochrisikogruppen für hämatogene oder regionale Metastasierung gilt die Zone des *Buddings* als eigentlich aktive Invasionszone. Für das Gesamtüberleben konnte es bereits als unabhängiger Vorhersagefaktor bestätigt werden [90], [136]. In der vorliegenden Arbeit zeigte sich neben dem Gesamtüberleben auch für das krankheitsfreie Überleben ein signifikanter Unterschied abhängig vom *Budding-Typ* (siehe Tab. 3.1 und 3.2). Dies konnte Park et al. ebenfalls belegen [144].

4.2. Syndecan-1 als Schutzzytm vor Tumorinvasion im kolorektalen Karzinom?

Basierend auf der These, dass Syn-1 ein Regulator der Zellinvasion ist, wurde in dieser Arbeit im Speziellen die Zone des Tumorbuddings im KRK betrachtet und die immunhistochemische Syn-1-Expression der Tumorzellen der Invasionsfront mit denen des Tumorzentrums sowie mit histologisch unauffälliger Kolonmukosa verglichen. In der Letztgenannten zeigte sich in Epithelzellen eine gesamtheitlich starke Syn-1-Expression mit einem überwiegend membranständigen Expressionsmuster. Die örtliche Verteilung von Syn-1 am Rand der Epithelzelle legt nahe, dass das Protein in der gesunden Darmschleimhaut an Zell-Zell- und Zell-Matrixinteraktionen teilnimmt und zur Stabilität im Epithel- bzw. Tumorzellverband beiträgt [12]. Im Vergleich der drei Tumorzonen (Tumorzentrum, Invasionsfront, Tumorbuds) des KRK zeigte sich eine hochsignifikante Reduktion der Syn-1-Expression vom Tumorzentrum zum Tumorbud. Dies unterstützt die Annahme, dass der Verlust von Syn-1 die epithelial-mesenchymale Transformation, das Budding und somit den Invasionsprozess begünstigt. Jedoch wurde nur in einer weiteren immunhistochemischen

Studie der Tumorränder des KRK begutachtet, wobei sich kein signifikanter Unterschied zum Tumorzentrum fand [72]. Demgegenüber konnte in Zellkulturmodellen nachgewiesen werden, dass es nach Transfektion von epithelialen Zellen mit Syn-1 siRNA oder Reduktion der Syn-1-Expression durch androgen-induzierte Transformation zur Umwandlung von epithelialen zu mesenchymalen Zellen sowie zur Erhöhung der Invasivität kommt [91], [105]. Durch den Verlust der epithelialen Eigenschaften lösen sich einzelne Zellen aus dem Tumorzellverband, welche ein aggressiveres Wachstum sowie ein höheres invasives Potential aufweisen [24]. Der Verlust von Syn-1 war in Studien anderer Autoren zum KRK mit einem vermehrten Auftreten von Metastasen vergesellschaftet [55], [72]. So konnte auch in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen werden, dass eine Abnahme der Syn-1-Expression mit einem höheren Tumorstadium, dem Auftreten von Lymphknoten- und Fernmetastasen, Lymphgefäßinfiltration sowie perineuraler Karzinose hochsignifikant korrelierte (siehe Tab. 3.3). Dabei machte es keinen Unterschied, ob die zytoplasmatische, membranöse oder Gesamtexpression betrachtet wurde. Aus diesem Grund wird der Verlust von Syn-1 – insbesondere an der Invasionsfront – als negativer prognostischer Marker der KRK angesehen.

Die strukturelle Komplexität von Tumorzell-HSPG an der Zelloberfläche sowie in der ECM ermöglicht es verschiedene Aspekte des Tumorzell-Phänotyps inklusive Wachstumskinetik, Invasivität und metastatisches Potential zu modulieren [113]. Strukturelle Veränderungen der HSPG tragen möglicherweise zur Transformation vom Adenom zum Karzinom bei [85]. Bisherige immunhistochemische Studien konnten zeigen, dass im KRK eine Abnahme der Syn-1-Expression im Vergleich zum Adenom und gesunder Kolonschleimhaut zu verzeichnen war, so dass der Verlust von Syn-1 zur Kolonkarzinogenese beiträgt und Syn-1 als Adhäsionsfaktor eine Schutzfunktion gegenüber invasivem Tumorstadium einnimmt [39], [143]. In dieser Arbeit zeigte das kolorektale Adenom bezüglich der Adenomarchitektur eine signifikante Reduktion der Syn-1-Expression im tubulovillösen verglichen mit dem tubulären Adenom. Bezüglich des Dysplasiegrades konnte eine signifikante Abnahme der Syn-1-Expression in der HGIN im Vergleich zur LGIN verzeichnet werden. Außerdem konnte eine signifikante Abnahme des Syn-1-Niveaus von apikal zur Adenombasis verzeichnet werden. Lokal begrenzte Frühkarzinome (pT1) des Kolorektums zeigten eine zusätzliche signifikante Reduktion gegenüber den Adenomzonen. Somit konnte in dieser Arbeit belegt werden, dass nicht erst im KRK sondern bereits im Adenom als Vorläufer des invasiven Karzinoms in der basalen Zone, welche unmittelbar der Basalmembran aufliegt, im Rahmen der Adenom-Karzinom-Sequenz eine Herunterregulierung der Syn-1-Expression erfolgt und dieses offenbar die lokale Invasion begünstigt.

Zur Klärung der Frage, auf welcher Ebene die Regulierung des Heparansulfat-Proteoglykans Syn-1 stattfindet, erfolgte in der vorliegenden Arbeit die Detektion des mRNA- und Proteingehaltes von Syn-1 aus Tumorfrischgewebe. In Korrelation mit den immunhistochemischen Ergebnissen zeigte sich bei geringer immunhistochemischer Syn-1-Expression ebenfalls ein signifikant reduzierter Syn-1-mRNA- und Syn-1-Proteingehalt im Gegensatz zu Tumoren mit hoher immunhistochemischer Syn-1-Expression. Somit kann eine Regulierung der Expression des Proteins Syn-1 bereits auf Genebene bzw. auf epigenetischer Ebene angenommen werden. Des Weiteren können aufgrund der Korrelation zwischen quantitativ bestimmter mRNA- und Proteinexpression und der semiquantitativ erfassten immunhistochemischen Syn-1-Expression, die immunhistochemischen Untersuchungsergebnisse als valide Basis für die Korrelationsanalysen mit klinisch-pathologischen Faktoren angesehen werden.

4.3. Zellkulturanalysen: Funktion von Syndecan-1 in Kolonkarzinomzelllinien

Syn-1 ist in der Lage mit verschiedenen Wachstumsfaktoren, Proteasen und Membranproteinen zu interagieren und in verschiedene Schlüsselprozesse der Tumorgenese wie Tumorzellproliferation, Apoptosis, Angiogenese und Metastasierung involviert. Dabei hängt das invasive und metastatische Potential von Tumorzellen von der Aktivierung einer Anzahl an ECM-Liganden, welche Proliferation, dynamisches zytoskelettales Remodeling, Apoptosis und Genexpression kontrollieren, ab. Die ECM, als physikalische Barriere für die Tumormetastasierung, kann durch Enzyme wie MMPs und Heparanase degradiert werden. Hierdurch kommt es zur vermehrten Migration der Tumorzelle durch die Basalmembran. Bekannt ist, dass die Ektodomäne von Syn-1 von der Zelloberfläche mittels Matrixmetalloproteinasen MMP-7, -9, -14 (MT1-MMP) und MT3-MMP sowie Heparanase proteolytisch gespalten wird [109], [21], [47], [148]. Neben der ECM sind reaktive nichtneoplastische Zellen in den Migrationsprozess der Tumorzelle involviert. Hierbei wurde der Schwerpunkt insbesondere auf Tumor-assoziierte Makrophagen, welche an Tumorzellmigration, -invasion und Metastasierung beteiligt sind, sowie auf Karzinom-assoziierte Fibroblasten, welche Proteine sezernieren, die die Tumorzellinvasivität, Angiogenesis und Geweberemodelling stimulieren, gelegt.

In dieser Arbeit wurde unter Auswahl zweier Kolonkarzinomzelllinien, welche sich in ihrem Wachstums- und Zelladhäsionsverhalten voneinander unterschieden, das Adhäsions-, Migrations- und Invasionsverhalten der Tumorzellen in Abhängigkeit ihrer Syn-1-Aktivität untersucht. Die Zellkultur HT-29 zeigte sich in dichten Zellclustern mit einer rundzelligen Epithelmorphologie, ähnlich dem expansiven Wachstumstyp im humanen KRK. Die HCT116-

Zellen stellten sich mit einem überwiegend verstreuzelligen Wachstum und spindelzellförmiger Zellmorphologie in Annäherung an den infiltrativen Invasionsstyp des Karzinomkollektivs dar. Zur Bestätigung des in der Literatur beschriebenen aggressiveren Verhaltens der HCT 116-Kultur konnte mittels Zellkulturassays eine signifikante Steigerung der Migration und Invasion und eine signifikante Reduktion der Adhäsion im Vergleich mit den HT-29-Zellen nachgewiesen werden [114].

Im Weiteren wurde die mRNA-Expression von Syn-1 in Monokultur der humanen Kolonzelllinien HT-29 und HCT 116 sowie der Makrophagenzelllinie THP-1 und der Fibroblastenkultur 175BR bestimmt. Hierbei ließ sich die höchste Syn-1-Expression für HT-29, gefolgt von THP-1 und HCT 116 nachweisen. Die Fibroblasten zeigten keine Syn-1-Expression. Letzteres steht im Gegensatz zu Arbeiten anderer Autoren, die in bis zu 58% der Tumore eine Syn-1-Stromafärbung nachweisen konnten [119], [72]. Diese voneinander abweichenden Ergebnisse lassen sich möglicherweise damit erklären, dass Tumorzellen in der Lage sind die Syn-1-Expression in Fibroblasten zu fördern. Dies konnte in einem 2D-Kokultur-Modell in Mammakarzinomzelllinien nachgewiesen werden [121]. Ebenfalls in in-vitro-Studien mit Mammakarzinomzellen zeigten Stromafibroblasten eine erhöhte Syn-1-Expression in Assoziation mit vermehrtem Tumorzellwachstum und Angiogenese [190]. Demgegenüber lag im KRK nur für einen Teil der Tumore eine Syn-1-Expression im Stroma, jedoch ohne Hinweis für ein schlechteres klinisches Outcome der Patienten, vor [119]. Der hohe Anteil von Syn-1 in der THP-1-Kultur stimmt mit den Befunden anderer Arbeitsgruppen überein. Hiernach zählt Syn-1 in Makrophagen zu den Haupt-Heparansulfat-Proteoglykanen [218]. Makatsori et al. wiesen die Syn-1-Expression von THP-1-Zellen nach und zeigten für die Monozyten sogar eine mögliche Rolle in maligner Transformation und Differenzierung [124].

In den immunhistochemischen Ergebnissen des Karzinomkollektivs dieser Arbeit zeigte sich eine Herunterregulierung der Syn-1-Expression vorwiegend an der Invasionsfront, so dass der Tumorzellverbund des KRK anhand von in-vitro-Versuchen mittels direkter und indirekter Kokultur der Tumorzelllinien HT-29 und HCT 116 mit tumorassoziierten Makrophagen (THP-1) und Fibroblasten (175BR) untersucht wurde. In Kokultur zeigte sich ein Rückgang des Syn-1-mRNA-Gehaltes für HT-29 von 42 % und für HCT 116 von 53%. Für die Makrophagen war dahingegen ein leichter Anstieg von Syn-1 nach Kokultur zu verzeichnen. Dies spricht für eine gegenseitige Regulation der Syn-1-Expression in den Tumorzellen und Monozyten. Ähnliche Ergebnisse konnten in Zellkulturmodellen von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen gezeigt werden. Durch aktivierte Monozyten, die in der Lage waren vermehrt Zytokine zu produzieren, reduzierte sich die Syn-1-Expression in HT-29-Zellen signifikant [40]. Als mögliche Ursache hierfür konnten in-vivo im Kolon nahe der Lamina

propria Monozyten gefunden werden, welche vermehrt TNF- α produzierten [164]. Demgegenüber fanden Day et al. [40] in Kokultur mit unstimulierten Monozyten lediglich eine moderate Reduktion des Syn-1-Levels. Bekannt ist, dass durch Interaktion von THP-1 mit humanen Kolontumorzellen Chemokine, wie VEGF-A, TNF- α , IL-1 β und IL-8 freigesetzt werden, welche die Differenzierung der Monozyten zu Tumor-assoziierten Makrophagen fördern [77]. Sowohl einströmende Monozyten als auch gewebsspezifische Makrophagen können über die Sekretion von TGF- β , TNF- α und IL-1 die Expression von Syndecan-1 *in vitro* und *in vivo* induzieren und modulieren [108], [59], [10], [45]. Zytokine können sowohl die Syn-1-Expression in epithelialen und mesenchymalen Zellen regulieren [154], [40] als auch das Shedding der Syndecan-Ektodomäne induzieren und beschleunigen [52], [191]. Die Syndecane sind dabei in der Lage, über ihre HS-Ketten verschiedene Zytokine wie Interleukin-2, -3, -4, -5, -7, -8, -10, -12, TNF- α , TGF- β , GM-CSF oder IFN- γ zu binden, sie lokal zu konzentrieren und so das entzündliche (Tumor)Mikromilieu zu modulieren [65]. Dabei ist unter anderem TGF- β in der Lage, die Syn-1-Expression hochzuregulieren, wohingegen TNF- α und IFN- γ die Syndecan-1-Expression an der Zelloberfläche reduzieren [154], [40].

Einer der wichtigsten Schritte im Invasionsprozess ist die Migration der Tumorzellen durch die Basalmembran und somit der Übergang vom *in-situ*- zum invasiven Karzinom. Um den Einfluss der Basalmembran auf den Syn-1-Gehalt der humanen Kolonzelllinien *in-vitro* zu untersuchen, erfolgte die Kultivierung von HT-29 und HCT 116 auf Matrigel. Diese Beschichtung enthält Proteine, wie Laminin, Kollagen IV, Proteoglykane und Entactin, welche zu den Hauptbestandteilen der Basalmembran zählen. Unter Matrigelbeschichtung zeigte sich abhängig von der Kolonzelllinie bei HT-29 eine rund 60%ige Reduktion, bei HCT116 eine 73%ige Reduktion des mRNA-Gehaltes von Syn-1 im Vergleich zur unbeschichteten Kultur. Somit scheinen Bestandteile der Basalmembran die Syn-1-Expression zu beeinflussen. In der Literatur bekannt ist eine Interaktion von Syn-1 mit Laminin und Kollagen [76], [208], wobei Syn-1 in der Lage ist, als Korezeptor an $\alpha 2\beta 1$ -Integrin zu binden, welches die Adhäsion der Tumorzelle an Kollagen vermittelt. Vuoriluoto et al. [208] konnten einen Cross-talk zwischen Syn-1 und $\alpha 2\beta 1$ -Integrin nachweisen, wobei es in Antwort auf die Kollagenbindung zu einer gesteigerten Transkription von MMP-1 kommt. Ein Nachweis für die direkte Herunterregulierung von Syn-1 durch Bestandteile der Basalmembran konnte bisher jedoch nicht erbracht werden. Allerdings enthält Matrigel neben Extrakten der Basalmembran auch matrixdegradierende Enzyme, deren Inhibitoren und Wachstumsfaktoren [130], welche ebenfalls Einfluss auf die Syn-1-Expression nehmen können.

Der Rezeptor-vermittelte Kontakt zwischen Zellen oder zwischen Zellen und der ECM wird als Adhäsion bezeichnet und ist essentiell für die Stabilität im Tumorzellverband. Als Korezeptoren der Integrine, Cadherine und Selektine konnte für die Syndecane eine Beteiligung an Zelladhäsion und Zellsignalvermittlung nachgewiesen werden [12], [208]. So zeigte sich in Syndecan-defizienten Raji-Lymphoblastoid-Zellen nach Transfektion mit Syn-1 eine Syn-1-vermittelte Adhäsion an die Matrixkomponenten Thrombospondin, Fibronectin und Invasin, was wiederum zur Aktivierung von β 1-Integrin führte [103], [102]. Zong et al. [224] bestätigten, dass in mesenchymalen Tumorzellen eine dosisabhängige Überexpression von Syn-1 die Adhäsion an die ECM steigert. Welche Rolle Syn-1 im Adhäsionsprozess von Kolontumorzellen einnimmt, ist bisher unbekannt. In der vorliegenden Arbeit zeigte sich nach Ausschaltung von Syn-1 mittels siRNA eine teils signifikante Reduktion der Adhäsion der Kolonkarzinomzellen auf Matrigelbeschichtung und an Fibroblasten im Vergleich zu unbehandelten Zellen, wobei die Effekte für die HCT 116-Zellen geringer ausfielen. Ursache für Letzteres könnte der geringere Gehalt von Syn-1-mRNA in HCT 116-Zellen gegenüber HT-29-Monolayern sein. Im Sinne der oben beschriebenen dosisabhängigen Regulierung der Adhäsion durch Syn-1, zeigten die HCT 116-Zellen bedingt durch einen geringeren Gehalt an Syn-1 bereits initial ein geringeres adhäsives Potential gegenüber der HT-29-Kultur, so dass nach Ausschaltung von Syn-1 ein geringerer Rückgang der Adhäsion verzeichnet werden konnte. Dahingegen führte die Hemmung von Syn-1 zu keiner Änderung des adhärenen Verhaltens der Kolonkarzinomzellen in Monokultur, so dass davon ausgegangen werden kann, dass Syn-1 innerhalb des Tumorzellverbandes lediglich als Kofaktor der Zell-Zell-Adhäsion fungiert. Jedoch bedarf es Syn-1 zur Aufrechterhaltung einer epithelialen Zellmorphologie mit apikal-basaler Orientierung und Organisation in dichten Zelllagen. Die Depletion von Syn-1 in Mammaepithelzellen resultiert in einer mesenchymalen Zellmorphologie, Desorganisation des Zellverbandes und zur vermehrten Migration und Invasion auf Kollagengel [81]. Beim Fehlen von Syn-1 kommt es zusätzlich zu einer differentiellen Expression von Adhäsionsmolekülen mit Rearrangement von Integrin β 1, verminderter E-Cadherin-Expression und Desorganisation der F-Aktin-Filamente [91]. Übereinstimmend mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit stellt Syndecan-1 offenbar ein wichtiges Adhäsionsmolekül im Tumorzellverband und noch viel bedeutender für die Tumorzell-Matrix-Adhäsion dar.

Die Einwanderung der Tumorzelle in das unterhalb der Basalmembran liegende Stromagewebe wird als Migration bezeichnet. In der vorliegenden Arbeit zeigte sich nach Inhibierung von Syn-1 sowohl in Mono- als auch in Kokultur mit Makrophagen bzw. Fibroblasten eine Zunahme migrierenden Kolonkarzinomzelllinien. Somit kann angenommen werden, dass der Verlust der zuvor beschriebenen Syn-1-vermittelten Adhäsion die Migration

von Kolonkarzinomzellen begünstigt bzw. Syn-1 die Migration von Tumorzellen hemmt. Liebersbach et al. [111] demonstrierten die Rolle von Syn-1 in der Tumorzellmigration anhand von in-vitro-Versuchen an Myelomzellen auf Kollagengel, wobei Syn-1 die Tumorzelladhäsion an Typ I-Kollagen unterstützt und die Invasion in Kollagengele inhibiert. Auch Timar et al. [201] beschrieben eine Aktivierung der Tumorzellmigration nach Herunterregulierung von Syn-1 in invasiven Karzinomzellen bzw. nach Hochregulierung von Syn-1 in tumorassoziierten Fibroblasten. Demgegenüber stellte sich in in-vitro-Studien mit hepatozellulären Karzinomzellen ein Rückgang der Chemokin-induzierten Migration und Invasion in Huh-7-Zellen nach Ausschaltung von Syn-1 dar [27], [36]. Des Weiteren zeigten während der Wundheilung sowohl die Ausschaltung als auch die Überexpression von Syn-1 eine reduzierte Zellmigration [46], [188], so dass eine Balance der Syn-1-Expression vermutlich entscheidend für eine optimale Zellmigration ist [25].

Im Invasionsassay wurde der Einfluss von Syn-1 auf das Durchwanderungsverhalten von HT-29 und HCT 116 durch eine mit Matrigel-beschichtete semipermeable Membran in Anwesenheit von Fibroblasten (175BR) und Monozyten (THP-1) bzw. in Monokultur untersucht. Die Syn-1-Hemmung führte in der Kokultur mit Fibroblasten zu einer Zunahme invasiver Tumorzellen beider Zelllinien und zur vermehrten Invasion der HCT 116-Zellen in der Makrophagenkokultur. Dahingegen resultierte der Syn-1-Verlust für die HT-29-Zellen sowohl in Monokultur als auch in Kokultur mit THP-1 in einer Abnahme invasiver Zellen. Demzufolge scheint Syn-1 die Invasion der Kolontumorzellen in Abhängigkeit von ihrem Phänotyp zu fördern. Syn-1 kann dabei nicht als einzelständiges Regulatorprotein im Invasionsprozess der Tumorzelle betrachtet, sondern muss im Zusammenspiel mit der Tumorumgebung, inklusive tumorassoziierten Zellen und freigesetzter Matrixproteine gesehen werden. So können zum Beispiel Wachstumsfaktoren oder Matrix-degradierende Enzyme, sezerniert von Makrophagen und Fibroblasten, die Expression und Signaltransduktionsmechanismen von Syn-1 mitbeeinflussen [188]. Hier trägt auch ein durch tumorassoziierte Zellen gefördertes Shedding der Syn-1-Ektodomäne und eine damit einhergehende Induktion der Invasion und Umwandlung von epidermalen zu mesenchymalen Zellen im Rahmen der epidermal-mesenchymalen Transition bei. Ein ähnliches Verhalten von MCF-7-Zellen im Mammakarzinom beschrieb Nikolova et al. [139], wobei membrangebundenes Syn-1 die Invasion hemmte, während lösliches Syn-1 diese förderte. Bekannt ist, dass ein vermehrtes Shedding neben MMPs und Heparanase auch durch Wachstumsfaktoren induziert werden kann [191]. Inwieweit diese Mechanismen im KRK eine Rolle spielen, sollte Gegenstand zukünftiger Forschungen sein.

4.4. Syndecan-1–hässliches Entlein oder schöner Schwan?

Warum kommt es in den immunhistochemischen Studien des KRK gegenüber den Zellkulturversuchen der Kolontumorzellen teils zu einem scheinbar gegensätzlichen Verhalten von Syn-1? In den immunhistochemischen Ergebnissen dieser Studie deutet Vieles daraufhin, dass der Verlust von Syn-1 im Adenom die maligne Transformation zum invasiven Karzinom fördert und der Syn-1-Verlust an der Invasionsfront des KRK mit einem Tumorprogress und einer schlechteren Prognose assoziiert ist. Demgegenüber zeigte sich in den funktionellen Zellkulturversuchen ein zum Teil invasives Verhalten bei erhaltener Syn-1-Expression. Diesbezüglich muss erwähnt werden, dass zum Einen die hier durchgeführten in-vitro-Studien in zweidimensionalen Versuchen durchgeführt worden sind. Eine exaktere Abbildung der in-vivo-Situation wäre allerdings im dreidimensionalen Raum im Zusammenspiel der Tumorzellen mit ihrer Umgebung gegeben [153], [22], so dass in diesem Rahmen weiterführende Studien erfolgen müssen. Zum Anderen ist Syn-1 über das Shedding und der abgespaltenen Ektodomäne in der Lage, seine Funktionalität in tumorbiologischen Prozessen zu ändern. Durch die proteolytische Konversion von Syn-1 als membrangebundenes zum löslichen Molekül wandelt sich die Zelle von einem proliferativen zu einem invasiven Phänotyp und besitzt demzufolge veränderte proliferative Eigenschaften [139]. Lösliches Syn-1 ist vermutlich in der Lage proangiogenetische Faktoren zu aktivieren [92] sowie an Mitogene wie FGF-2 zu binden [127] und mit Proteasen zu interagieren, um sie vor ihren endogenen Inhibitoren zu schützen [50]. Wann es zu diesem Switch des Phänotyps im KRK kommt und mittels welcher Signaltransduktionswege Rezeptoren, Adhäsionsmoleküle, Wachstumsfaktoren und Proteasen dies beeinflussen [66], ist zum aktuellen Zeitpunkt nicht hinreichend erforscht. In in-vitro-Studien humaner Brustkrebszellen konnten Korezeptor-Funktionen von Syn-1 für MAPK-vermittelte Signalwege sowie die Regulierung von TIMP-1, uPAR und E-Cadherin detektiert werden [139]. In HeLa-Zellen und Makrophagen ist das Syn-1-Shedding durch SDF-1/CXC12 akzelleriert und durch MMP-9 vermittelt [21]. Ein möglicher therapeutischer Ansatz könnte somit die Unterbrechung von Prozessen bzw. Faktoren sein, welche die Umwandlung der Tumorzelle in einen invasiven Phänotyp fördern. Auch die Detektion von Patienten, welche aufgrund dieses aggressiven Invasionstypes des KRK trotz niedrigem Tumorstadium (UICC-Stadium I und II) eine frühe lokale Metastasierung und Invasion erfahren und somit eine aggressive Therapie benötigen, sollte Gegenstand zukünftiger Forschungen sein. Es ist vorstellbar, dass die Detektion des Syn-1-Verlustes an der Invasionsfront des KRK im Rahmen eines immunhistochemischen Markerpanels die Identifikation von Risikopatienten zukünftig unterstützen kann.

5. Zusammenfassung

Das kolorektale Karzinom gehört zu den häufigsten tumorösen Erkrankungen weltweit. In Deutschland ist es sogar die zweithäufigste Todesursache unter den Malignomen. Das im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Syndecan-1 ist ein wichtiges membrangebundenes Heparansulfat-Proteoglykan, welches an Zellproliferation, -migration und Zell-Matrix-Interaktionen teilnimmt. Dabei ist die funktionelle Bedeutung von Syn-1 im Invasions- und Metastasierungsprozess kolorektaler Karzinome weitgehend unbekannt und wurde in dieser Studie anhand von immunhistochemischen und molekularbiologischen Verfahren sowie funktionellen Zellkulturassays untersucht. Es erfolgte die immunhistochemische Detektion der Syn-1-Proteinexpression mittels der Tissue Microarray-Technik an 177 kolorektalen Karzinomen und 107 dazugehörigen gesunden Kolonmukosaprobe sowie an transmuralen Schnittpräparaten von 175 Karzinomen mit repräsentativem Anteil der Invasionsfront, 12 ausgewählten Leber- und 20 Lymphknotenmetastasen sowie 97 Adenomen und 14 Frühkarzinomen. Dabei zeigte sich eine hochsignifikante Reduktion der Syn-1-Expression an der Invasionsfront und den Tumorbuds gegenüber dem Tumorzentrum ($p < 0,001$). Der Verlust der Syn-1-Expression korrelierte dabei signifikant mit klinisch-pathologischen Parametern einer fortgeschrittenen Tumorerkrankung und mit einem kürzeren Gesamtüberleben der Patienten. Auch im Vergleich der Adenomzonen fiel die Syn-1-Expression von apikal nach basal sowie im Vergleich zu lokal begrenzten Frühkarzinomen (pT1) stetig ab, was dafür spricht, dass der Syn-1-Verlust die maligne Transformation unterstützt.

Zudem wurde in in-vitro-Studien an den humanen Kolontumorzellen HT-29 und HCT 116 sowie an Zellen des Tumorzellverbandes (Fibroblasten und Makrophagen) der mRNA-Gehalt von Syn-1 in Mono- und Kokultur untersucht. Die höchste Expression des Syndecans in Monokultur besaßen die HT-29, gefolgt von THP-1 und HCT 116. In beiden Kolontumorzelllinien ließ sich nach Kokultur mit Makrophagen und Fibroblasten eine verminderte Syn-1-Expression nachweisen.

In funktionellen Zellkulturassays wurde an den humanen Kolontumorzellen mittels siRNA-Transfektion der Einfluss von Syn-1 auf die Tumorzelladhäsion, -migration und -invasion untersucht. Syn-1 wurde dabei als wichtiger Adhäsionsfaktor der Tumorzellen an Matrigel und Fibroblasten identifiziert, wodurch es die Tumorzellmigration – auch nach Kokultur mit Fibroblasten und Makrophagen hemmt. Dahingegen zeigten sich in Abhängigkeit von der Tumorzelllinie unterschiedliche insgesamt nur geringe Auswirkungen des Syn-1-Verlustes auf die Invasion.

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten daraufhin, dass Syndecan-1 als kritischer Mediator der Tumorprogression im KRK angenommen werden kann. Es ist jedoch nicht als

einzelständiges Regulatorprotein im Invasionsprozess anzunehmen, sondern muss im Zusammenspiel diverser tumorassoziierter Zellen, extrazellulärer Matrixkomponenten und intrazellulärer Signaltransduktionsmechanismen betrachtet werden. Welche Signal- und Regulationsprozesse von Syn-1 zur Progression des kolorektalen Karzinoms beitragen und welche therapeutischen Möglichkeiten daraus resultieren, bleibt abzuwarten.

Literaturverzeichnis

- [1] Alazzouzi H, Alhopuro P, Salovaara R, Sammalkorpi H, Järvinen H, Mecklin JP, Hemminki A, Schwartz SJ, Aaltonen LA, Arango D: SMAD4 as a prognostic marker in colorectal cancer. *Clin Cancer Res.* 11(7). 2606-2611 (2005)
- [2] Aldridge AJ, Simson JN: Histological assessment of colorectal adenomas by size. Are polyps less than 10 mm in size clinically important? *Eur J Surg.* 167 (10). 777-781 (2001)
- [3] Alexander CM, Reichsman F, Hinkes MT, Lincecum J, Becker KA, Cumberledge S, Bernfield M: Syndecan-1 is required for Wnt-1-induced mammary tumorigenesis in mice. *Nat Genet.* 25(3). 329-332 (2000)
- [4] Allegra CJ, Paik S, Colangelo LH, Parr AL, Kirsch I, Kim G, Klein P, Johnston PG, Wolmark N, Wieand HS: Prognostic value of thymidylate synthase, Ki-67, and p53 in patients with Dukes' B and C colon cancer: a National Cancer Institute-National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project collaborative study. *J Clin Oncol.* 21(2). 241-250 (2003)
- [5] Asundi VK., Carey DJ.: Self-association of N-Syndecan (Syndecan-3) Core Protein Is Mediated by a Novel Structural Motif in the Transmembrane Domain and Ectodomain Flanking Region. *J Biol Chem.* 270(44). 26404-26410 (1995)
- [6] Bacsa S, Karasneh G, Dosa S, Liu J, Valyi-Nagy T, Shukla D: Syndecan-1 and syndecan-2 play key roles in herpes simplex virus type-1 infection. *J Gen Virol.* 92(Pt 4). 733-743 (2011)
- [7] Baker K, Zlobec I, Tornillo L, Terracciano L, Jass JR, Lugli A: Differential significance of tumour infiltrating lymphocytes in sporadic mismatch repair deficient versus proficient colorectal cancers: a potential role for dysregulation of the transforming growth factor-beta pathway. *Eur J Cancer.* 43(3). 624-631 (2007)
- [8] Barbareschi M, Maisonneuve P, Aldovini D, Cangi MG, Pecciarini L, Angelo Mauri F, Veronese S, Caffo O, Lucenti A, Palma PD, Galligioni E, Doglioni C: High syndecan-1 expression in breast carcinoma is related to an aggressive phenotype and to poorer prognosis. *Cancer.* 98(3). 474-483 (2003)
- [9] Bartlett AH, Hayashida K, Park PW: Molecular and cellular mechanisms of syndecans in tissue injury and inflammation. *Mol Cells.* 24(2). 153-166 (2007)
- [10] Basson CT, Kocher O, Basson MD, Asis A, Madri JA: Differential modulation of vascular cell integrin and extracellular matrix expression in vitro by TGF-beta 1 correlates with reciprocal effects on cell migration. *J Cell Physiol.* 153(1). 118-128 (1992)

-
- [11] Beauvais DM, Ell BJ, McWhorter AR, Rapraeger AC: Syndecan-1 regulates alphavbeta3 and alphavbeta5 integrin activation during angiogenesis and is blocked by synstatin, a novel peptide inhibitor. *J Exp Med.* 206(3). 691-705 (2009)
- [12] Beauvais DM, Rapraeger AC: Syndecans in tumor cell adhesion and signaling. *Reprod Biol Endocrinol.* 2. 3 (2004)
- [13] Benatti P, Gafà R, Barana D, Marino M, Scarselli A, Pedroni M, Maestri I, Guerzoni L, Roncucci L, Menigatti M, Roncari B, Maffei S, Rossi G, Ponti G, Santini A, Losi L, Di Gregorio C, Oliani C, Ponz de Leon M, Lanza G: Microsatellite instability and colorectal cancer prognosis. *Clin Cancer Res.* 11(23). 8332-8340 (2005)
- [14] Bernfield M, Götte M, Park PW, Reizes O, Fitzgerald ML, Lincecum J, Zako M: Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Annu Rev Biochem.* 68. 729-777 (1999)
- [15] Bernstein CN, Blanchard JF, Kliever E, Wajda A: Cancer risk in patients with inflammatory bowel disease: a population-based study. *Cancer.* 91(4). 854-862 (2001)
- [16] Berry DP, Clarke P, Hardcastle JD, Vellacott KD: Randomized trial of the addition of flexible sigmoidoscopy to faecal occult blood testing for colorectal neoplasia population screening. *Br J Surg.* 84(9). 1274-1276 (1997)
- [17] Bertario L, Russo A, Sala P, Pizzetti P, Ballardini G, Andreola S, Spinelli P: Predictors of metachronous colorectal neoplasms in sporadic adenoma patients. *Int J Cancer.* 105 (1). 82-87 (2003)
- [18] Bingham SA, Day NE, Luben R, Ferrari P, Slimani N, Norat T, Clavel-Chapelon F, Kesse E, Nieters A, Boeing H, Tjønneland A, Overvad K, Martinez C, Dorransoro M, Gonzalez CA, Key TJ, Trichopoulou A, Naska A, Vineis P, Tumino R, Krogh V, Bueno-de-Mesquita HB, Peeters PH, Berglund G, Hallmans G, Lund E, Skeie G, Kaaks R, Riboli E: Dietary fibre in food and protection against colorectal cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC): an observational study. *Lancet.* 361(9368). 1496-1501 (2003)
- [19] Birkner BR: Evidence-based prevention of colorectal carcinoma. *Dtsch Med Wochenschr.* 128(49). 2598-2603 (2003)
- [20] Bode L, Salvestrini C, Park PW, Li J-P, Esko JD, Yamaguchi Y, Murch S, Freeze HH: Heparan sulfate and syndecan-1 are essential in maintaining murine and human intestinal epithelial barrier function. *J Clin Invest.* 118(1). 229-238 (2008)
- [21] Brule S, Charnaux N, Sutton A, Ledoux D, Chaigneau T, Saffar L, Gattegno L: The shedding of syndecan-4 and syndecan-1 from HeLa cells and human primary macrophages is accelerated by SDF-1/CXCL12 and mediated by the matrix metalloproteinase-9. *Glycobiology.* 16(6). 488-501 (2006)
- [22] Brábek J, Mierke CT, Rösel D, Veselý P, Fabry B: The role of the tissue microenvironment in the regulation of cancer cell motility and invasion. *Cell Commun Signal.* 8:22. (2010)

-
- [23] Bülow HE, Hobert O: Differential sulfations and epimerization define heparan sulfate specificity in nervous system development. *Neuron*. 41(5). 723-736 (2004)
- [24] Calorini L, Bianchini F: Environmental control of invasiveness and metastatic dissemination of tumor cells: the role of tumor cell-host cell interactions. *Cell Commun Signal*. 8:24. (2010)
- [25] Chakravarti R, Sapountzi V, Adams JC: Functional role of syndecan-1 cytoplasmic V region in lamellipodial spreading, actin bundling, and cell migration. *Mol Biol Cell*. 16(8). 3678-3691 (2005)
- [26] Chao A, Thun MJ, Jacobs EJ, Henley SJ, Rodriguez C, Calle EE: Cigarette smoking and colorectal cancer mortality in the cancer prevention study II. *J Natl Cancer Inst*. 92(23). 1888-1896 (2000)
- [27] Charni F, Friand V, Haddad O, Hlawaty H, Martin L, Vassy R, Oudar O, Gattegno L, Charnaux N, Sutton A: Syndecan-1 and syndecan-4 are involved in RANTES/CCL5-induced migration and invasion of human hepatoma cells. *Biochim Biophys Acta*. 1790(10). 1314-1326 (2009)
- [28] Chen Y, Hayashida A, Bennett AE, Hollingshead SK, Park PW: Streptococcus pneumoniae sheds syndecan-1 ectodomains through ZmpC, a metalloproteinase virulence factor. *J Biol Chem*. 282(1). 159-167 (2007)
- [29] Cianchi F, Palomba A, Boddi V, Messerini L, Pucciani F, Perigli G, Bechi P, Cortesini C: Lymph node recovery from colorectal tumor specimens: recommendation for a minimum number of lymph nodes to be examined. *World J Surg*. 26(3). 384-389 (2002)
- [30] Citarda F, Tomaselli G, Capocaccia R, Barcherini S, Crespi M, Group IMS: Efficacy in standard clinical practice of colonoscopic polypectomy in reducing colorectal cancer incidence. *Gut*. 48(6). 812-815 (2001)
- [31] Compton CC, Fielding LP, Burgart LJ, Conley B, Cooper HS, Hamilton SR, Hammond ME, Henson DE, Hutter RV, Nagle RB, Nielsen ML, Sargent DJ, Taylor CR, Welton M, Willett C: Prognostic factors in colorectal cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med*. 124(7). 979-994 (2000)
- [32] Condeelis J, Pollard JW: Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis. *Cell*. 124(2). 263-266 (2006)
- [33] Conejo JR, Kleeff J, Koliopanos A, Matsuda K, Zhu ZW, Goecke H, Bicheng N, Zimmermann A, Korc M, Friess H, Büchler MW: Syndecan-1 expression is up-regulated in pancreatic but not in other gastrointestinal cancers. *Int J Cancer*. 88(1). 12-20 (2000)
- [34] Cruz-Correa M, Giardiello FM: Familial adenomatous polyposis. *Gastrointest Endosc*. 58(6). 885-894 (2003)

- [35] Cucino C, Buchner AM, Sonnenberg A: Continued rightward shift of colorectal cancer. *Dis Colon Rectum*. 45(8). 1035-1040 (2002)
- [36] Dagouassat M, Suffee N, Hlawaty H, Haddad O, Charni F, Laguillier C, Vassy R, Martin L, Schischmanoff P-O, Gattegno L, Oudar O, Sutton A, Charnaux N: Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)/CCL2 secreted by hepatic myofibroblasts promotes migration and invasion of human hepatoma cells. *Int J Cancer*. 126(5). 1095-1108 (2010)
- [37] Day R, Forbes A: Heparin, cell adhesion, and pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Lancet*. 354(9172). 62-65 (1999)
- [38] Day R, Ilyas M, Daszak P, Talbot I, Forbes A: Expression of Syndecan-1 in Inflammatory Bowel Disease and a Possible Mechanism of Heparin Therapy. *Digestive Diseases and Sciences*. 44(12). 2508-2515 (1999)
- [39] Day RM, Hao X, Ilyas M, Daszak P, Talbot IC, Forbes A: Changes in the expression of syndecan-1 in the colorectal adenoma-carcinoma sequence. *Virchows Archiv*. 434(2). 121-125 (1999)
- [40] Day RM, Mitchell TJ, Knight SC, Forbes A: Regulation of epithelial syndecan-1 expression by inflammatory cytokines. *Cytokine*. 21(5). 224-233 (2003)
- [41] Dingley KH, Curtis KD, Nowell S, Felton JS, Lang NP, Turteltaub KW: DNA and protein adduct formation in the colon and blood of humans after exposure to a dietary-relevant dose of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazol[4,5-b]pyridine. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 8. 507-512 (1999)
- [42] Dobra K, Nurminen M, Hjerpe A: Growth factors regulate the expression profile of their syndecan co-receptors and the differentiation of mesothelioma cells. *Anticancer Res*. 23(3B). 2435-2444 (2003)
- [43] Duffy MJ, van Dalen A, Haglund C, Hansson L, Holinski-Feder E, Klapdor R, Lamerz R, Peltomaki P, Sturgeon C, Topolcan O: Tumour markers in colorectal cancer: European Group on Tumour Markers (EGTM) guidelines for clinical use. *Eur J Cancer*. 43(9). 1348-1360 (2007)
- [44] van Duijnhoven FJ, Bueno-De-Mesquita HB, Ferrari P, Jenab M, Boshuizen HC, Ros MM, Casagrande C, Tjønneland A, Olsen A, Overvad K, Thorlacius-Ussing O, Clavel-Chapelon F, Boutron-Ruault MC, Morois S, Kaaks R, Linseisen J, Boeing H, Nöthlings U, Trichopoulou A, Trichopoulos D, Misirli G, Palli D, Sieri S, Panico S, Tumino R, Vineis P, Peeters PH, van Gils CH, Ocké MC, Lund E, Engeset D, Skeie G, Suárez LR, González CA, Sánchez MJ, Dorronsoro M, Navarro C, Barricarte A, Berglund G, Manjer J, Hallmans G, Palmqvist R, Bingham SA, Khaw KT, Key TJ, Allen NE, Boffetta P, Slimani N, Rinaldi S, Gallo V, Norat T, Riboli E: Fruit, vegetables, and colorectal cancer risk: the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Am J Clin Nutr*. 89(5). 1441-1452 (2009)

-
- [45] Edwards IJ, Wagner WD, Owens RT: Macrophage secretory products selectively stimulate dermatan sulfate proteoglycan production in cultured arterial smooth muscle cells. *Am J Pathol.* 136(3). 609-621 (1990)
- [46] Elenius V, Götte M, Reizes O, Elenius K, Bernfield M: Inhibition by the soluble syndecan-1 ectodomains delays wound repair in mice overexpressing syndecan-1. *J Biol Chem.* 279(40). 41928-41935 (2004)
- [47] Endo K, Takino T, Miyamori H, Kinsen H, Yoshizaki T, Furukawa M, Sato H: Cleavage of syndecan-1 by membrane type matrix metalloproteinase-1 stimulates cell migration. *The Journal of biological chemistry.* 278(42). 40764-40770 (2003)
- [48] Esko JD, Selleck SB: Order out of chaos: assembly of ligand binding sites in heparan sulfate. *Annu Rev Biochem.* 71. 435-471 (2002)
- [49] Fearon ER, Vogelstein B: A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell.* 61. 759-767 (1990)
- [50] Fears CY, Woods A: The role of syndecans in disease and wound healing. *Matrix Biol.* 25(7). 443-456 (2006)
- [51] Filmus J, Capurro M, Rast J: Glypicans. *Genome Biol.* 9(5). 224 (2008)
- [52] Fitzgerald ML, Wang Z, Park PW, Murphy G, Bernfield M: Shedding of syndecan-1 and -4 ectodomains is regulated by multiple signaling pathways and mediated by a TIMP-3-sensitive metalloproteinase. *J Cell Biol.* 148(4). 811-824 (2000)
- [53] Floer M, Götte M, Wild MK, Heidemann J, Gassar ES, Domschke W, Kiesel L, Luegering A, Kucharzik T: Enoxaparin improves the course of dextran sodium sulfate-induced colitis in syndecan-1-deficient mice. *Am J Pathol.* 176(1). 146-157 (2010)
- [54] Freissler E, Meyer auf der Heyde A, David G, Meyer TF, Dehio C: Syndecan-1 and syndecan-4 can mediate the invasion of OpaHSPG-expressing *Neisseria gonorrhoeae* into epithelial cells. *Cell Microbiol.* 2(1). 69-82 (2000)
- [55] Fujiya M, Watari J, Ashida T, Honda M, Tanabe H, Fujiki T, Saitoh Y, Kohgo Y: Reduced expression of syndecan-1 affects metastatic potential and clinical outcome in patients with colorectal cancer. *Jpn J Cancer Res.* 92(10). 1074-1081 (2001)
- [56] Fukai N, Kenagy RD, Chen L, Gao L, Daum G, Clowes AW: Syndecan-1: an inhibitor of arterial smooth muscle cell growth and intimal hyperplasia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 29(9). 1356-1362 (2009)
- [57] Gal R, Sadikov E, Sulkes J, Klein B, Koren R: Deleted in colorectal cancer protein expression as a possible predictor of response to adjuvant chemotherapy in colorectal cancer patients. *Dis Colon Rectum.* 47(7). 1216-1224 (2004)
- [58] Galizia G, Lieto E, Ferraraccio F, De Vita F, Castellano P, Orditura M, Imperatore V, La Mura A, La Manna G, Pinto M, Catalano G, Pignatelli C, Ciardiello F: Prognostic

- significance of epidermal growth factor receptor expression in colon cancer patients undergoing curative surgery. *Ann Surg Oncol.* 13(6). 823-835 (2006)
- [59] Gallo RL, Ono M, Povsic T, Page C, Eriksson E, Klagsbrun M, Bernfield M: Syndecans, cell surface heparan sulfate proteoglycans, are induced by a proline-rich antimicrobial peptide from wounds. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91(23). 11035-11039 (1994)
- [60] Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pagès C, Tosolini M, Camus M, Berger A, Wind P, Zinzindohoué F, Bruneval P, Cugnenc PH, Trajanoski Z, Fridman WH, Pagès F: Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science.* 313(5795). 1960-1964 (2006)
- [61] Giacosa A, Franceschi S, La Vecchia C, Favero A, Andreatta R: Energy intake, overweight, physical exercise and colorectal cancer risk. *Eur J Cancer Prev.* 8 Suppl 1. S53-60 (1999)
- [62] Gillen CD, Andrews HA, Prior P, Allan RN: Crohn's disease and colorectal cancer. *Gut.* 35(5). 651-655 (1994)
- [63] Giralt J, Navalpotro B, Hermosilla E, de Torres I, Espin E, Reyes V, Cerezo L, de las Heras M, Ramon y Cajal S, Armengol M, Benavente S: Prognostic significance of vascular endothelial growth factor and cyclooxygenase-2 in patients with rectal cancer treated with preoperative radiotherapy. *Oncology.* 71(5-6). 312-319 (2006)
- [64] Groden J, Thliveris A, Samowitz W, Carlson M, Gelbert L, Albertsen H, Joslyn G, Stevens J, Spirio L, Robertson M: Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene. *Cell.* 66(3). 589-600 (1991)
- [65] Götte M: Syndecans in inflammation. *FASEB J.* 17(6). 575-591 (2003)
- [66] Götte M, Kersting C, Radke I, Kiesel L, Wülfing P: An expression signature of syndecan-1 (CD138), E-cadherin and c-met is associated with factors of angiogenesis and lymphangiogenesis in ductal breast carcinoma in situ. *Breast Cancer Res.* 9(1). R8 (2007)
- [67] Hamilton SR, Aaltonen LA: Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System. World Health Organization Classification of Tumours. IARC Press, Lyon. (2000)
- [68] Hamilton W, Lancashire R, Sharp D, Peters TJ, Cheng K, Marshall T: The risk of colorectal cancer with symptoms at different ages and between the sexes: a case-control study. *BMC Med.* 7. 17 (2009)
- [69] Hampel H, Stephens JA, Pukkala E, Sankila R, Aaltonen LA, Mecklin JP, de la Chapelle A: Cancer risk in hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome: later age of onset. *Gastroenterology.* 129(2). 415-421 (2005)

-
- [70] Han I, Park H, Oh E-S: New Insights into Syndecan-2 Expression and Tumourigenic Activity in Colon Carcinoma Cells. *J Mol Histol.* 35(3). 319-326 (2003)
- [71] Harley BA, Kim HD, Zaman MH, Yannas IV, Lauffenburger, D A; Gibson LJ: Microarchitecture of three-dimensional scaffolds influences cell migration behavior via junction interactions. *Biophys J.* 95(8). 4013-4024 (2008)
- [72] Hashimoto Y, Skacel M, Adams JC: Association of loss of epithelial syndecan-1 with stage and local metastasis of colorectal adenocarcinomas: an immunohistochemical study of clinically annotated tumors. *BMC Cancer.* 8. 185 (2008)
- [73] Hayashida A, Amano S, Park PW: Syndecan-1 promotes *Staphylococcus aureus* corneal infection by counteracting neutrophil-mediated host defense. *J Biol Chem.* 286(5). 3288-3297 (2011)
- [74] Hayashida K, Parks WC, Park PW: Syndecan-1 shedding facilitates the resolution of neutrophilic inflammation by removing sequestered CXC chemokines. *Blood.* 114(14). 3033-3043 (2009)
- [75] Hilska M, Roberts PJ, Collan YU, Laine VJ, Kössi J, Hirsimäki P, Rahkonen O, Laato M: Prognostic significance of matrix metalloproteinases-1, -2, -7 and -13 and tissue inhibitors of metalloproteinases-1, -2, -3 and -4 in colorectal cancer. *Int J Cancer.* 121(4). 714-723 (2007)
- [76] Hoffman MP, Nomizu M, Roque E, Lee S, Jung DW, Yamada Y, Kleinman HK: Laminin-1 and Laminin-2 G-domain Synthetic Peptides Bind Syndecan-1 and Are Involved in Acinar Formation of a Human Submandibular Gland Cell Line. *J Biol Chem.* 273(44). 28633-28641 (1998)
- [77] Honda T, Inagawa H, Yamamoto I: Differential Expression of mRNA in Human Monocytes following Interaction with Human Colon Cancer Cells. *Anticancer Res.* 31(7). 2493-2497 (2011)
- [78] Hu Y, Sun H, Owens RT, Gu Z, Wu J, Chen YQ, O'Flaherty JT, Edwards IJ: Syndecan-1-dependent suppression of PDK1/Akt/bad signaling by docosahexaenoic acid induces apoptosis in prostate cancer. *Neoplasia.* 12(10). 826-836 (2010)
- [79] Ilan N, Elkin M, Vlodaysky I: Regulation, function and clinical significance of heparanase in cancer metastasis and angiogenesis. *Int J Biochem Cell Biol.* 38(12). 2018-2039 (2006)
- [80] Iozzo RV, Sanderson RD: Proteoglycans in cancer biology, tumour microenvironment and angiogenesis. *J Cell Mol Med.* 15(5). 1013-1031 (2011)
- [81] Ishikawa T, Kramer RH: Sdc1 negatively modulates carcinoma cell motility and invasion. *Exp Cell Res.* 316(6). 951-965 (2010)
- [82] Jass JR: Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. *Histopathology.* 50 (1). 113-130 (2007)

-
- [83] Jass JR, Barker M, Fraser L, Walsh MD, Whitehall VL, Gabrielli B, Young J, Leggett BA: APC mutation and tumour budding in colorectal cancer. *J Clin Pathol.* 56(1). 69-73 (2003)
- [84] Jass JR, Love SB, Northover JM: A new prognostic classification of rectal cancer. *Lancet.* 329(8545). 1303-1306 (1987)
- [85] Jayson GC: Heparan Sulfate Undergoes Specific Structural Changes during the Progression from Human Colon Adenoma to Carcinoma in Vitro. *J Biol Chem.* 273(1). 51-57 (1998)
- [86] Joensuu H, Anttonen A, Eriksson M, Makitaro R, Alfthan H, Kinnula V, Leppa S: Soluble Syndecan-1 and Serum Basic Fibroblast Growth Factor Are New Prognostic Factors in Lung Cancer. *Cancer Res.* 62(18). 5210-5217 (2002)
- [87] Johnson KG, Ghose A, Epstein E, Lincecum J, O'Connor MB, Van Vactor D: Axonal heparan sulfate proteoglycans regulate the distribution and efficiency of the repellent slit during midline axon guidance. *Curr Biol.* 14(6). 499-504 (2004)
- [88] Kalia M, Chandra V, Rahman SA, Sehgal D, Jameel S: Heparan sulfate proteoglycans are required for cellular binding of the hepatitis E virus ORF2 capsid protein and for viral infection. *J Virol.* 83(24). 12714-12724 (2009)
- [89] Kalluri R, Zeisberg M: Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer.* 6(5). 392-401 (2006)
- [90] Kanazawa H, Mitomi H, Nishiyama Y, Kishimoto I, Fukui N, Nakamura T, Watanabe M: Tumour budding at invasive margins and outcome in colorectal cancer. *Colorectal Dis.* 10(1). 41-47 (2008)
- [91] Kato M, Saunders S, Nguyen H, Bernfield M: Loss of cell surface syndecan-1 causes epithelia to transform into anchorage-independent mesenchyme-like cells. *Mol Biol Cell.* 6(5). 559-576 (1995)
- [92] Kato M, Wang H, Kainulainen V, Fitzgerald ML, Ledbetter S, Ornitz DM, Bernfield M: Physiological degradation converts the soluble syndecan-1 ectodomain from an inhibitor to a potent activator of FGF-2. *Nat Med.* 4(6). 691-697 (1998)
- [93] Kharabi Masouleh B, Ten Dam GB, Wild MK, Seelige R, van der Vlag J, Rops AL, Echtermeyer FG, Vestweber D, van Kuppevelt TH, Kiesel L, Götte M: Role of the heparan sulfate proteoglycan syndecan-1 (CD138) in delayed-type hypersensitivity. *J Immunol.* 182(8). 4985-4993 (2009)
- [94] Khotskaya YB, Dai Y, Ritchie JP, MacLeod V, Yang Y, Zinn K, Sanderson RD: Syndecan-1 is required for robust growth, vascularization, and metastasis of myeloma tumors in vivo. *J Biol Chem.* 284(38). 26085-26095 (2009)
- [95] Kim CW, Goldberger OA, Gallo RL, Bernfield M: Members of the syndecan family of heparan sulfate proteoglycans are expressed in distinct cell-, tissue-, and development-specific patterns. *Mol Biol Cell.* 5(7). 797-805 (1994)

-
- [96] Kinnunen T, Kaksonen M, Saarinen J, Kalkkinen N, Peng HB, Rauvala H: Cortactin-Src kinase signaling pathway is involved in N-syndecan-dependent neurite outgrowth. *J Biol Chem.* 273(17). 10702-10708 (1998)
- [97] Kirn-Safran C, Farach-Carson MC, Carson DD: Multifunctionality of extracellular and cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Cell Mol Life Sci.* 66(21). 3421-3434 (2009)
- [98] Kliment CR, Englert JM, Gochuico BR, Yu G, Kaminski N, Rosas I, Oury TD: Oxidative stress alters syndecan-1 distribution in lungs with pulmonary fibrosis. *J Biol Chem.* 284(6). 3537-3545 (2009)
- [99] Konings EJ, Goldbohm RA, Brants HA, Saris WH, van den Brandt PA: Intake of dietary folate vitamers and risk of colorectal carcinoma: results from The Netherlands Cohort Study. *Cancer.* 95(7). 1421-1433 (2002)
- [100] Kudo, S: Endoscopic mucosal resection of flat and depressed types of early colorectal cancer. *Endoscopy.* 25. 455-461 (1993)
- [101] Lambaerts K, Wilcox-Adelman SA, Zimmermann P: The signaling mechanisms of syndecan heparan sulfate proteoglycans. *Curr Opin Cell Biol.* 21(5). 662-669 (2009)
- [102] Lebakken CS, McQuade KJ, Rapraeger AC: Syndecan-1 signals independently of beta1 integrins during Raji cell spreading. *Exp Cell Res.* 259(2). 315-325 (2000)
- [103] Lebakken CS, Rapraeger AC: Syndecan-1 mediates cell spreading in transfected human lymphoblastoid (Raji) cells. *J Cell Biol.* 132(6). 1209-1221 (1996)
- [104] Lee IM: Physical activity and cancer prevention-data from epidemiologic studies. *Med Sci Sports Exerc.* 35(11). 1823-1827 (2003)
- [105] Leppä S, Härkönen P, Jalkanen M: Steroid-induced epithelial-fibroblastic conversion associated with syndecan suppression in S115 mouse mammary tumor cells. *Cell Regul.* 2(1). 1-11 (1991)
- [106] Levi F, Pasche C, Lucchini F, La Vecchia C: Dietary fibre and the risk of colorectal cancer. *Eur J Cancer.* 37(16). 2091-2096 (2001)
- [107] Levy P, Munier A, Baron-Delage S, Di Gioia Y, Gespach C, Capeau J, Cherqui G: Syndecan-1 alterations during the tumorigenic progression of human colonic Caco-2 cells induced by human Ha-ras or polyoma middle T oncogenes. *British journal of cancer.* 74(3). 423-431 (1996)
- [108] Li J, Brown LF, Laham RJ, Volk R, Simons M: Macrophage-Dependent Regulation of Syndecan Gene Expression. *Circ Res.* 81 (5). 785-796 (1997)
- [109] Li Q, Park PW, Wilson CL, Parks WC: Matrilysin Shedding of Syndecan-1 Regulates Chemokine Mobilization and Transepithelial Efflux of Neutrophils in Acute Lung Injury. *Cell.* 111(5). 635-646 (2002)

-
- [110] Liang JT, Huang KC, Jeng YM, Lee PH, Lai HS, Hsu HC: Microvessel density, cyclooxygenase 2 expression, K-ras mutation and p53 overexpression in colonic cancer. *Br J Surg.* 91(3). 355-361 (2004)
- [111] Liebersbach BF, Sanderson RD: Expression of syndecan-1 inhibits cell invasion into type I collagen. *J. Biol. Chem.* 269(31). 20013-20019 (1994)
- [112] Lin LC, Lee HH, Hwang WS, Li CF, Huang CT, Que J, Lin KL, Lin FC, Lu CL: p53 and p27 as predictors of clinical outcome for rectal-cancer patients receiving neoadjuvant therapy. *Surg Oncol.* 15(4). 211-216 (2006)
- [113] Liu D, Shriver Z, Qi Y, Venkataraman G, Sasisekharan R: Dynamic regulation of tumor growth and metastasis by heparan sulfate glycosaminoglycans. *Semin Thromb Hemost.* 28(1). 67-78 (2002)
- [114] Liu Y, Zhang F, Zhang X-F, Qi L-S, Yang L, Guo H, Zhang N: Expression of nucleophosmin/NPM1 correlates with migration and invasiveness of colon cancer cells. *J Biomed Sci.* 19(1). 53 (2012)
- [115] Locker GY, Hamilton S, Harris J, Jessup JM, Kemeny N, Macdonald JS, Somerfield MR, Hayes DF, Bast RC, ASCO: ASCO 2006 update of recommendations for the use of tumor markers in gastrointestinal cancer. *J Clin Oncol.* 24(33). 5313-5327 (2006)
- [116] Longley RL, Woods A, Fleetwood A, Cowling GJ, Gallagher JT, Couchman JR: Control of morphology, cytoskeleton and migration by syndecan-4. *J Cell Sci.* 112 (P20). 3421-3431 (1999)
- [117] Lopes CC, Dietrich CP, Nader HB: Specific structural features of syndecans and heparan sulfate chains are needed for cell signaling. *Braz J Med Biol Res.* 39(2). 157-167 (2006)
- [118] Lugli A, Zlobec I, Minoo P, Baker K, Tornillo L, Terracciano L, Jass JR: Prognostic significance of the wnt signalling pathway molecules APC, beta-catenin and E-cadherin in colorectal cancer: a tissue microarray-based analysis. *Histopathology.* 50(4). 453-464 (2007)
- [119] Lundin M, Nordling S, Lundin J, Isola J, Wiksten J-P, Haglund C: Epithelial syndecan-1 expression is associated with stage and grade in colorectal cancer. *Oncology.* 68(4-6). 306-313 (2005)
- [120] Ma P, Beck SL, Raab RW, McKown RL, Coffman GL, Utani A, Chirico WJ, Rapraeger AC, Laurie GW: Heparanase deglycanation of syndecan-1 is required for binding of the epithelial-restricted prosecretory mitogen lacritin. *J Cell Biol.* 174(7). 1097-1106 (2006)
- [121] Maeda T, Alexander CM, Friedl A: Induction of Syndecan-1 Expression in Stromal Fibroblasts Promotes Proliferation of Human Breast Cancer Cells. *Cancer Res.* 64(2). 612-621 (2004)

- [122] Mahtouk K, Hose D, Raynaud P, Hundemer M, Jourdan M, Jourdan E, Pantesco V, Baudard M, De Vos J, Larroque M, Moehler T, Rossi JF, Rème T, Goldschmidt H, Klein B: Heparanase influences expression and shedding of syndecan-1, and its expression by the bone marrow environment is a bad prognostic factor in multiple myeloma. *Blood*. 109(11). 4914-4923 (2007)
- [123] Majumdar SR, Fletcher RH, Evans AT: How does colorectal cancer present? Symptoms, duration, and clues to location. *Am J Gastroenterol*. 94(10). 3039-3045 (1999)
- [124] Makatsori E, Lamari FN, Theocharis AD, Anagnostides S, Hjerpe A, Tsegenidis T, Karamanos NK: Large matrix proteoglycans, versican and perlecan, are expressed and secreted by human leukemic monocytes. *Anticancer Res*. 23(4). 3303-3309 (2003)
- [125] Mander BJ, Carney LJ, Scott HJ, Donaldson DR: Jass staging is a predictor of outcome following "curative" resection of Dukes' B colorectal carcinoma. *Surgeon*. 4(4). 227-230 (2006)
- [126] Manon-Jensen T, Itoh Y, Couchman JR: Proteoglycans in health and disease: the multiple roles of syndecan shedding. *FEBS J*. 277(19). 3876-3889 (2010)
- [127] Marshall LJ, Ramdin LSP, Brooks T, DPhil PC, Shute JK: Plasminogen Activator Inhibitor-1 Supports IL-8-Mediated Neutrophil Transendothelial Migration by Inhibition of the Constitutive Shedding of Endothelial IL-8/Heparan Sulfate/Syndecan-1 Complexes. *J. Immunol*. 171(4). 2057-2065 (2003)
- [128] Maykel JA, Hagerman G, Mellgren AF, Y; LS, Alavi K, Baxter NN, Madoff RD: Crohn's colitis: the incidence of dysplasia and adenocarcinoma in surgical patients. *Dis Colon Rectum*. 49 (7). 950-957 (2006)
- [129] McQuade KJ, Beauvais DM, Burbach BJ, Rapraeger AC: Syndecan-1 regulates alphavbeta5 integrin activity in B82L fibroblasts. *J Cell Sci*. 119(Pt 12). 2445-2456 (2006)
- [130] Meng Y, Eshghi S, Li YJ, Schmidt R, Schaffer DV, Healy KE: Characterization of integrin engagement during defined human embryonic stem cell culture. *FASEB J*. 24(4). 1056-1065 (2010)
- [131] Mennerich D, Vogel A, Klamann I, Dahl E, Lichtner RB, Rosenthal A, Pohlenz H-D, Thierauch K-H, Sommer A: Shift of syndecan-1 expression from epithelial to stromal cells during progression of solid tumours. *Eur J Cancer*. 40(9). 1373-1382 (2004)
- [132] Mino P, Zlobec I, Baker K, Tornillo L, Terracciano L, Jass JR, Lugli A: Loss of raf-1 kinase inhibitor protein expression is associated with tumor progression and metastasis in colorectal cancer. *Am J Clin Pathol*. 127(5). 820-827 (2007)
- [133] Morgan MR, Humphries MJ, Bass MD: Synergistic control of cell adhesion by integrins and syndecans. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 8(12). 957-969 (2007)

- [134] Morodomi T, Isomoto H, Shirouzu K, Kakegawa K, Irie K, Morimatsu M: An index for estimating the probability of lymph node metastasis in rectal cancers. Lymph node metastasis and the histopathology of actively invasive regions of cancer. *Cancer*. 63(3). 539-543 (1989)
- [135] Munro AJ, Lain S, Lane DP: P53 abnormalities and outcomes in colorectal cancer: a systematic review. *Br J Cancer*. 92(3). 434-444 (2005)
- [136] Nakamura T, Mitomi H, Kanazawa H, Ohkura Y, Watanabe M: Tumor budding as an index to identify high-risk patients with stage II colon cancer. *Dis Colon Rectum*. 51(5). 568-572 (2008)
- [137] Nehls O, Okech T, Hsieh CJ, Enzinger T, Sarbia M, Borchard F, Gruenagel HH, Gaco V, Hass HG, Arkenau HT, Hartmann JT, Porschen R, Gregor M, Klump B: Studies on p53, BAX and Bcl-2 protein expression and microsatellite instability in stage III (UICC) colon cancer treated by adjuvant chemotherapy: major prognostic impact of proapoptotic BAX. *Br J Cancer*. 96(9). 1409-1418 (2007)
- [138] Nielsen HJ, Hansen U, Christensen IJ, Reimert CM, Br nner N, Moesgaard F: Independent prognostic value of eosinophil and mast cell infiltration in colorectal cancer tissue. *J Pathol*. 189(4). 487-495 (1999)
- [139] Nikolova V, Koo CY, Ibrahim SA, Wang Z, Spillmann D, Dreier R, Kelsch R, Fischgr be J, Smollich M, Rossi LH, Sibrowski W, W lfing P, Kiesel L, Yip GW, G tte M: Differential roles for membrane-bound and soluble syndecan-1 (CD138) in breast cancer progression. *Carcinogenesis*. 30(3). 397-407 (2009)
- [140] Norat T, Bingham S, Ferrari P, Slimani N, Jenab M, Mazuir M, Overvad K, Olsen A, Tj nneland A, Clavel F, Boutron-Ruault MC, Kesse E, Boeing H, Bergmann MM, Nieters A, Linseisen J, Trichopoulou A, Trichopoulos D, Tountas Y, Berrino F, Palli D, Panico S, Tumino R, Vineis P, Bueno-de-Mesquita HB, Peeters PH, Engeset D, Lund E, Skeie G, Ardanaz E, Gonz lez C, Navarro C, Quir s JR, Sanchez MJ, Berglund G, Mattisson I, Hallmans G, Palmqvist R, Day NE, Khaw KT, Key TJ, San Joaquin M, H mon B, Saracci R, Kaaks R, Riboli E: Meat, fish, and colorectal cancer risk: the European Prospective Investigation into cancer and nutrition. *J Natl Cancer Inst*. 97(12). 906-916 (2005)
- [141] Okina E, Manon-Jensen T, Whiteford JR, Couchman JR: Syndecan proteoglycan contributions to cytoskeletal organization and contractility. *Scand J Med Sci Sports*. 19(4). 479-489 (2009)
- [142] Owen, R W: Dietary and chemopreventive strategies. *Recent Results Cancer Res*. 146. 195-213 (1998)
- [143] Pap Z, P vai Z, D nes L, Kovalszky I, Jung J: An immunohistochemical study of colon adenomas and carcinomas: E-cadherin, Syndecan-1, Ets-1. *Pathol Oncol Res*. 15(4). 579-587 (2009)

- [144] Park K-J, Choi H-J, Roh M-S, Kwon H-C, Kim C: Intensity of tumor budding and its prognostic implications in invasive colon carcinoma. *Dis Colon Rectum*. 48(8). 1597-1602 (2005)
- [145] Park PW, Pier GB, Hinkes MT, Bernfield M: Exploitation of syndecan-1 shedding by *Pseudomonas aeruginosa* enhances virulence. *Nature*. 411(6833). 98-102 (2001)
- [146] Park PW, Pier GB, Preston MJ, Goldberger O, Fitzgerald ML, Bernfield M: Syndecan-1 shedding is enhanced by LasA, a secreted virulence factor of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem*. 275(5). 3057-3064 (2000)
- [147] Pedersen A, Johansen C, Grønbaek M: Relations between amount and type of alcohol and colon and rectal cancer in a Danish population based cohort study. *Gut*. 52(6). 861-867 (2003)
- [148] Peretti T, Waisberg J, Mader AM, de Matos LL, da Costa RB, Conceição GM, Lopes AC, Nader HB, Pinhal MA: Heparanase-2, syndecan-1, and extracellular matrix remodeling in colorectal carcinoma. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 20(8). 756-765 (2008)
- [149] Popat S, Houlston RS: A systematic review and meta-analysis of the relationship between chromosome 18q genotype, DCC status and colorectal cancer prognosis. *Eur J Cancer*. 41(14). 2060-2070 (2005)
- [150] Popat S, Hubner R, Houlston RS: Systematic review of microsatellite instability and colorectal cancer prognosis. *J Clin Oncol*. 23(3). 609-618 (2005)
- [151] Prall F, Nizze H, Barten M: Tumour budding as prognostic factor in stage I/II colorectal carcinoma. *Histopathology*. 47. 17-24 (2005)
- [152] Prihartono N, Palmer JR, Louik C, Shapiro S, Rosenberg L: A case-control study of use of postmenopausal female hormone supplements in relation to the risk of large bowel cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 9 (4). 443-447 (2000)
- [153] Provenzano PP, Inman DR, Eliceiri KW, Trier SM, Keely PJ: Contact guidance mediated three-dimensional cell migration is regulated by Rho/ROCK-dependent matrix reorganization. *Biophys J*. 95(11). 5374-5384 (2008)
- [154] Pruessmeyer J, Martin C, Hess FM, Schwarz N, Schmidt S, Kogel T, Hoettecke N, Schmidt B, Sechi A, Uhlig S, Ludwig A: A disintegrin and metalloproteinase 17 (ADAM17) mediates inflammation-induced shedding of syndecan-1 and -4 by lung epithelial cells. *J Biol Chem*. 285(1). 555-564 (2010)
- [155] Purushothaman A, Chen L, Yang Y, Sanderson RD: Heparanase stimulation of protease expression implicates it as a master regulator of the aggressive tumor phenotype in myeloma. *J Biol Chem*. 283(47). 32628-32636 (2008)
- [156] Purushothaman A, Uyama T, Kobayashi F, Yamada S, Sugahara K, Rapraeger AC, Sanderson RD: Heparanase-enhanced shedding of syndecan-1 by myeloma cells promotes endothelial invasion and angiogenesis. *Blood*. 115(12). 2449-2457 (2010)

-
- [157] De Quay N, Cerottini JP, Albe X, Saraga E, Givel JC, Caplin S: Prognosis in Duke's B colorectal carcinoma: the Jass classification revisited. *Eur J Surg.* 165(6). 588-592 (1999)
- [158] Rabeneck L, Davila JA, El-Serag HB: Is there a true "shift" to the right colon in the incidence of colorectal cancer? *Am J Gastroenterol.* 98(6). 1400-1409 (2003)
- [159] Raman K, Kuberan B: Chemical Tumor Biology of Heparan Sulfate Proteoglycans. *Curr Chem Biol.* 4(1). 20-31 (2010)
- [160] Rapraeger AC, Ott VL: Molecular interactions of the syndecan core proteins. *Curr Opin Cell Biol.* 10(5). 620-628 (1998)
- [161] Rasmussen M, Kronborg O, Fenger C, Jørgensen OD: Possible advantages and drawbacks of adding flexible sigmoidoscopy to hemoccult-II in screening for colorectal cancer. A randomized study. *Scand J Gastroenterol.* 34(1). 73-78 (1999)
- [162] Ratto C, Sofo L, Ippoliti M, Merico M, Bossola M, Vecchio FM, Doglietto GB, Crucitti F: Accurate lymph-node detection in colorectal specimens resected for cancer is of prognostic significance. *Dis Colon Rectum.* 42(2). 143-154 (1999)
- [163] Reid ME, Marshall JR, Roe D, Lebowitz M, Alberts D, Battacharyya AK, Martinez ME: Smoking exposure as a risk factor for prevalent and recurrent colorectal adenomas. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 12(10). 1006-1011 (2003)
- [164] Reinecker HC, Steffen M, Witthoef T, Pflueger I, Schreiber S, MacDermott RP, Raedler A: Enhanced secretion of tumour necrosis factor-alpha, IL-6, and IL-1 beta by isolated lamina propria mononuclear cells from patients with ulcerative colitis and Crohn's disease. *Clinical and experimental immunology.* 94 (1). 174-181 (1993)
- [165] Reymond MA, Dworak O, Remke S, Hohenberger W, Kirchner T, Köckerling F: DCC protein as a predictor of distant metastases after curative surgery for rectal cancer. *Dis Colon Rectum.* 41(6). 755-760 (1998)
- [166] Rhiner C, Gysi S, Fröhli E, Hengartner MO, Hajnal A: Syndecan regulates cell migration and axon guidance in *C. elegans*. *Development.* 132(20). 4621-4633 (2005)
- [167] Rops AL, Götte M, Baselmans MH, van den Hoven MJ, Steenbergen EJ, Lensen JF, Wijnhoven TJ, Cevikbas F, van den Heuvel LP, van Kuppevelt TH, Berden JH, van der Vlag J: Syndecan-1 deficiency aggravates anti-glomerular basement membrane nephritis. *Kidney Int.* 72(10). 1204-1215 (2007)
- [168] Roxburgh CS, Salmond JM, Horgan PG, Oien KA, McMillan DC: Comparison of the prognostic value of inflammation-based pathologic and biochemical criteria in patients undergoing potentially curative resection for colorectal cancer. *Ann Surg.* 249(5). 788-793 (2009)
- [169] Rutter MD, Saunders BP, Wilkinson KH, Rumbles S, Schofield G, Kamm MA, Williams CB, Price AB, Talbot IC, Forbes A: Thirty-year analysis of a colonoscopic

- surveillance program for neoplasia in ulcerative colitis. *Gastroenterology*. 130(4). 1030-1038 (2006)
- [170] Rønnov-Jessen L, Petersen OW: Induction of alpha-smooth muscle actin by transforming growth factor-beta 1 in quiescent human breast gland fibroblasts. Implications for myofibroblast generation in breast neoplasia. *Lab Invest*. 68(6). 696-707 (1993)
- [171] Sanderson RD: Heparan sulfate proteoglycans in invasion and metastasis. *Semin Cell Dev Biol*. 12(2). 89-98 (2001)
- [172] Saphire AC, Bobardt MD, Zhang Z, David G, Gallay PA: Syndecans serve as attachment receptors for human immunodeficiency virus type 1 on macrophages. *J Virol*. 75(19). 9187-9200 (2001)
- [173] Sasisekharan R, Shriver Z, Venkataraman G, Narayanasami U: Roles of heparan-sulphate glycosaminoglycans in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2(7). 521-528 (2002)
- [174] Schaefer L, Schaefer RM: Proteoglycans: from structural compounds to signaling molecules. *Cell Tissue Res*. 339(1). 237-246 (2010)
- [175] Schalhorn A, Kolligs F, Tympner C, Gross M, Wagner A, Wichmann M, Lersch, C. & Zellmann K: Kolonkarzinom. In *Gastrointestinale Tumore. Manual: Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge*. München: W. Zuckschwerdt. 2006.
- [176] Schellings MWM, Vanhoutte D, van Almen GC, Swinnen M, Leenders JGG, Kubben N, van Leeuwen REW, Hofstra L, Heymans S, Pinto YM: Syndecan-1 amplifies angiotensin II-induced cardiac fibrosis. *Hypertension*. 55(2). 249-256 (2010)
- [177] Schmidt A, Echtermeyer F, Alozie A, Brands K, Buddecke E: Plasmin- and thrombin-accelerated shedding of syndecan-4 ectodomain generates cleavage sites at Lys(114)-Arg(115) and Lys(129)-Val(130) bonds. *J Biol Chem*. 280(41). 34441-34446 (2005)
- [178] Schmiegel W, Reinacher-Schick A, Arnold D, Graeven U, Heinemann V, Porschen R, Riemann J, Rödel C, Sauer R, Wieser M, Schmitt W, Schmoll H-J, Seufferlein T, Kopp I, Pox C: Update S3-guideline "colorectal cancer" 2008. *Zeitschrift für Gastroenterologie*. 46 (8). 799-840 (2008)
- [179] Schmoll H-J, Höffken K, Possinger K: *Kompodium Internistische Onkologie*. pp. 3811-3812. Springer Medizin Verlag Heidelberg 2006.
- [180] Scholefield JH, Moss S, Sufi F, Mangham CM, Hardcastle JD: Effect of faecal occult blood screening on mortality from colorectal cancer: results from a randomised controlled trial. *Gut*. 50(6). 840-844 (2002)
- [181] Seidel C, Sundan A, Hjorth M, Turesson I, Dahl IMS, Abildgaard N, Waage A, Borset M: Serum syndecan-1: a new independent prognostic marker in multiple myeloma. *Blood*. 95(2). 388-392 (2000)

-
- [182] Shafti-Keramat S, Handisurya A, Kriehuber E, Meneguzzi G, Slupetzky K, Kirnbauer R: Different heparan sulfate proteoglycans serve as cellular receptors for human papillomaviruses. *J Virol.* 77(24). 13125-13135 (2003)
- [183] Shaikat A, Scouras N, Schünemann HJ: Role of supplemental calcium in the recurrence of colorectal adenomas: a metaanalysis of randomized controlled trials. *Am J Gastroenterol.* 100(2). 390-394 (2005)
- [184] Shimoda M, Mellody KT, Orimo A: Carcinoma-associated fibroblasts are a rate-limiting determinant for tumour progression. *Semin Cell Dev Biol.* 21(1). 19-25 (2010)
- [185] Shimoyama M, Yamazaki T, Suda T, Hatakeyama K: Prognostic significance of lateral lymph node micrometastases in lower rectal cancer: an immunohistochemical study with CAM5.2. *Dis Colon Rectum.* 46(3). 333-339 (2003)
- [186] Stanford KI, Bishop JR, Foley EM, Gonzales JC, Niesman IR, Witztum JL, Esko JD: Syndecan-1 is the primary heparan sulfate proteoglycan mediating hepatic clearance of triglyceride-rich lipoproteins in mice. *J Clin Invest.* 119(11). 3236-3245 (2009)
- [187] Stepp MA, Gibson HE, Gala PH, Iglesia DD, Pajoohesh-Ganji A, Pal-Ghosh S, Brown M, Aquino C, Schwartz AM, Goldberger O, Hinkes MT, Bernfield M: Defects in keratinocyte activation during wound healing in the syndecan-1-deficient mouse. *J Cell Sci.* 115(23). 4517-4531 (2002)
- [188] Stepp MA, Liu Y, Pal-Ghosh S, Jurjus RA, Tadvalkar G, Sekaran A, Losicco K, Jiang L, Larsen M, Li L, Yuspa SH: Reduced migration, altered matrix and enhanced TGFbeta1 signaling are signatures of mouse keratinocytes lacking Sdc1. *J Cell Sci.* 120. 2851-2863 (2007)
- [189] Su G, Blaine SA, Qiao D, Friedl A: Membrane type 1 matrix metalloproteinase-mediated stromal syndecan-1 shedding stimulates breast carcinoma cell proliferation. *Cancer Res.* 68(22). 9558-9565 (2008)
- [190] Su G, Blaine SA, Qiao D, Friedl A: Shedding of syndecan-1 by stromal fibroblasts stimulates human breast cancer cell proliferation via FGF2 activation. *J Biol Chem.* 282(20). 14906-14915 (2007)
- [191] Subramanian SV, Fitzgerald ML, Bernfield M: Regulated shedding of syndecan-1 and -4 ectodomains by thrombin and growth factor receptor activation. *J Biol Chem.* 272(23). 14713-14720 (1997)
- [192] Sun H, Berquin IM, Owens RT, O'Flaherty JT, Edwards IJ: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma-mediated up-regulation of syndecan-1 by n-3 fatty acids promotes apoptosis of human breast cancer cells. *Cancer Res.* 68(8). 2912-2919 (2008)
- [193] Teng YH-F, Aquino RS, Park PW: Molecular functions of syndecan-1 in disease. *Matrix Biol.* (2011)
- [194] Terg R, Sambuelli A, Coronel E, Mazzuco J, Cartier M, Negreira S, Muñoz A, Gil A, Míguez C, Huernos S, Romero G, Goncalvez S, Levi D, Abecasis R: Prevalence of

- primary sclerosing cholangitis in patients with ulcerative colitis and the risk of developing malignancies. A large prospective study. *Acta Gastroenterol Latinoam.* 38(1). 26-33 (2008)
- [195] Terry P, Giovannucci E, Michels KB, Bergkvist L, Hansen H, Holmberg L, Wolk A: Fruit, vegetables, dietary fiber, and risk of colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst.* 93(7). 525-533 (2001)
- [196] Thomas SM, Brugge JS: Cellular functions regulated by Src family kinases. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 13. 513-609 (1997)
- [197] Tkachenko E, Rhodes JM, Simons M: Syndecans: new kids on the signaling block. *Circ Res.* 96(5). 488-500 (2005)
- [198] Towler B, Irwig L, Glasziou P, Kewenter J, Weller D, Silagy C: A systematic review of the effects of screening for colorectal cancer using the faecal occult blood test, hemoccult. *BMJ.* 317(7158). 559-565 (1998)
- [199] Tsamandas AC, Kardamakis D, Ravazoula P, Zolota V, Salakou S, Tepetes K, Kalogeropoulou C, Tsota I, Kourelis T, Makatsoris T, Karavias D, Scopa CD, Bonikos DS, Kalofonos HP, Petsas T: The potential role of TGFbeta1, TGFbeta2 and TGFbeta3 protein expression in colorectal carcinomas. Correlation with classic histopathologic factors and patient survival. *Strahlenther Onkol.* 180(4). 201-208 (2004)
- [200] Tsunoda A, Shibusawa M, Kawamura M, Marumori T, Kusano M, Ohta H: Colorectal cancer after pelvic irradiation: case reports. *Anticancer Res.* 17(1B). 729-732 (1997)
- [201] Tímár J, Lapis K, Dudás J, Sebestyén A, Kopper L, Kovalszky I: Proteoglycans and tumor progression: Janus-faced molecules with contradictory functions in cancer. *Semin Cancer Biol.* 12(3). 173-186 (2002)
- [202] Ungefroren H, Sebens S, Seidl D, Lehnert H, Hass R: Interaction of tumor cells with the microenvironment. *Cell Commun Signal.* 9. 18 (2011)
- [203] Vanhoutte D, Schellings MWM, Götte M, Swinnen M, Herias V, Wild MK, Vestweber D, Chorianopoulos E, Cortés V, Rigotti A, Stepp M-A, Van de Werf F, Carmeliet P, Pinto YM, Heymans S: Increased expression of syndecan-1 protects against cardiac dilatation and dysfunction after myocardial infarction. *Circulation.* 115(4). 475-482 (2007)
- [204] Vasen HF, Wijnen JT, Menko FH, Kleibeuker JH, Taal BG, Griffioen G, Nagengast FM, Meijers-Heijboer EH, Bertario L, Varesco L, Bisgaard ML, Mohr J, Fodde R, Khan PM: Cancer risk in families with hereditary nonpolyposis colorectal cancer diagnosed by mutation analysis. *Gastroenterology.* 110(4). 1020-1027 (1996)
- [205] Vlodavsky I, Friedmann Y, Elkin M, Aingorn H, Atzmon R, Ishai-Michaeli R, Bitan M, Pappo O, Peretz, T; Michal I, Spector L, Pecker I: Mammalian heparanase: gene cloning, expression and function in tumor progression and metastasis. *Nat Med.* 5(7). 793-802 (1999)

-
- [206] Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AM, Bos JL: Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med.* 319. 525-532 (1988)
- [207] Volk R, Schwartz JJ, Li J, Rosenberg RD, Simons M: The Role of Syndecan Cytoplasmic Domain in Basic Fibroblast Growth Factor-dependent Signal Transduction. *Journal of Biological Chemistry.* 274(34). 24417-24424 (1999)
- [208] Vuoriluoto K, Jokinen J, Kallio K, Salmivirta M, Heino J, Ivaska J: Syndecan-1 supports integrin alpha2beta1-mediated adhesion to collagen. *Exp Cell Res.* 314(18). 3369-3381 (2008)
- [209] Wang JB, Guan J, Shen J, Zhou L, Zhang YJ, Si YF, Yang L, Jian XH, Sheng Y: Insulin increases shedding of syndecan-1 in the serum of patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract.* 86(2). 83-88 (2009)
- [210] Wang LM, Kevans D, Mulcahy H, O'Sullivan J, Fennelly D, Hyland J, O'Donoghue D, Sheahan K: Tumor budding is a strong and reproducible prognostic marker in T3N0 colorectal cancer. *Am J Surg Pathol.* 33(1). 134-141 (2009)
- [211] Wiksten JP, Lundin J, Nordling S, Lundin M, Kokkola A, von Boguslawski K, Haglund C: Epithelial and stromal syndecan-1 expression as predictor of outcome in patients with gastric cancer. *Int J Cancer.* 95(1). 1-6 (2001)
- [212] Winawer SJ, Zauber AG, Ho MN, O'Brien MJ, Gottlieb LS, Sternberg SS, Waye JD, Schapiro M, Bond JH, Panish JF: Prevention of colorectal cancer by colonoscopic polypectomy. The National Polyp Study Workgroup. *N Engl J Med.* 329(27). 1977-1981 (1993)
- [213] Wittekind C, Meyer HJ, Bootz F: TNM Klassifikation maligner Tumoren. pp. 66-70. Springer Medizin Verlag Heidelberg 2002.
- [214] Woods A, Couchman JR: Syndecan-4 and focal adhesion function. *Curr Opin Cell Biol.* 13(5). 578-583 (2001)
- [215] Wu K, Willett WC, Fuchs CS, Colditz GA, Giovannucci EL: Calcium intake and risk of colon cancer in women and men. *J Natl Cancer Inst.* 94(6). 437-446 (2002)
- [216] Xu J, Park PW, Kheradmand F, Corry DB: Endogenous Attenuation of Allergic Lung Inflammation by Syndecan-1. *J Immunol.* 174(9). 5758-5765 (2005)
- [217] Yang N, Mosher R, Seo S, Beebe D, Friedl A: Syndecan-1 in breast cancer stroma fibroblasts regulates extracellular matrix fiber organization and carcinoma cell motility. *Am J Pathol.* 178(1). 325-335 (2011)
- [218] Yeaman C, Rapraeger AC: Membrane-anchored proteoglycans of mouse macrophages: P388D1 cells express a syndecan-4-like heparan sulfate proteoglycan and a distinct chondroitin sulfate form. *J Cell Physiol.* 157(2). 413-425 (1993)

- [219] Zhang B, Li X, Nakama H, Zhang X, Wei N, Zhang L: A case-control study on risk of changing food consumption for colorectal cancer. *Cancer Invest.* 20(4). 458-463 (2002)
- [220] Zhang Y, McKown RL, Raab RW, Rapraeger AC, Laurie GW: Focus on molecules: syndecan-1. *Exp Eye Res.* 93(4). 329-330 (2011)
- [221] Zimmermann P, David G: The syndecans, tuners of transmembrane signaling. *FASEB J.* 13 Suppl. S91-S100 (1999)
- [222] Zlobec I, Minoo P, Baker K, Haegert D, Khetani K, Tornillo L, Terracciano L, Jass JR, Lugli A: Loss of APAF-1 expression is associated with tumour progression and adverse prognosis in colorectal cancer. *Eur J Cancer.* 43(6). 1101-1107 (2007)
- [223] Zlobec I, Terracciano L, Tornillo L, Günthert U, Vuong T, Jass JR, Lugli A: Role of RHAMM within the hierarchy of well-established prognostic factors in colorectal cancer. *Gut.* 57(10). 1413-1419 (2008)
- [224] Zong F, Fthenou E, Mundt F, Szatmári T, Kovalszky I, Szilák L, Brodin D, Tzanakakis G, Hjerpe A, Dobra K: Specific syndecan-1 domains regulate mesenchymal tumor cell adhesion, motility and migration. *PloS one.* 6(6). e14816 (2011)
- [225] www.rki.de: Krebs in Deutschland, Häufigkeiten und Trends. Gesundheitsberichterstattung des Bundes.

Danksagung

Insbesondere danke ich meiner Betreuerin der Arbeit Frau PD Dr. med. Dörthe Jechorek. Ich danke Dir für die Vergabe dieses interessanten Themas, Deinem fortwährendem Engagement und stetem Interesse an dem Voranschreiten meiner Arbeit. Weiterhin danke ich Dir für die in allem Umfang kompetente fachliche Beratung sowie der zu jeder Zeit motivierenden Gespräche.

Bei Frau Dr. Sabine Franke möchte ich mich herzlich für die fachliche und persönliche Unterstützung insbesondere auf dem Gebiet der molekularen Genetik bedanken.

Ein weiterer Dank gilt dem Team der molekularen Genetik sowie den Mitarbeitern des immunhistochemischen Labors, insbesondere Frau Gärtner, Frau Scharfenort, Frau Staeck, Frau Kügler, Frau Miethke und Frau Wiest, welche mich unermüdlich unterstützen und mir bei allen aufgetretenen Problemen zur Seite standen.

Des Weiteren danke ich den ärztlichen Mitarbeitern der Klinik für Viszeralchirurgie, insbesondere Herrn apl. Prof. Dr. med. F. Meyer, sowie den Hausärzten der Patienten für die Hilfe bei der Erstellung des klinischen Follow-ups sowie Frau B. Peters des Institutes für Biometrie und Medizinische Informatik für die hilfreichen Tipps während der statistischen Analysen.

Zum Schluss möchte ich mich von Herzen bei meinen Eltern für die zu jeder Zeit erfahrene Motivation sowie für die aufmunternden Gespräche bedanken. Ein besonderer Dank gilt meinem Bruder Fabian, welcher mich jederzeit insbesondere bei der Lösung technischer Probleme beraten konnte. Abschließend möchte ich meinem Freund Roman für die unendliche Geduld, die jederzeit kritische Unterstützung sowie den steten Glauben an mich danken.

Ehrenerklärung

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

Die Rolle von Syndecan-1 im kolorektalen Karzinom

im Institut für Pathologie

mit Unterstützung durch PD Dr. med. D. Jechorek und Dr. rer. nat. S. Franke

ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Bei der Abfassung der Dissertation sind Rechte Dritter nicht verletzt worden.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Ich übertrage der Medizinischen Fakultät das Recht, weitere Kopien meiner Dissertation herzustellen und zu vertreiben.

Magdeburg, den 16.08.2013

Annekatriin Wiedemann

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Annekatriin Wiedemann
Geburtsdatum, -ort	15.05.1984, Magdeburg
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig

Schulbildung

08/1990 – 07/1994	Ludwig-Richter-Grundschule, Chemnitz
08/1994 – 07/1996	Georgius-Agricola-Gymnasium, Chemnitz
08/1996 – 07/2002	Samuel-von-Pufendorf-Gymnasium, Flöha, Abschluss: Abitur

Studium

10/2002 – 11/2008	Studium der Humanmedizin, Otto-von-Guericke-Universität, Magdeburg
12/2008 – 05/2009	Promotionsstudium, Otto-von-Guericke-Universität, Magdeburg

Promotion

Seit 03/2008	Experimentelle Doktorarbeit am Institut für Pathologie der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg
--------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Ärztliche Tätigkeit

06/2009 – 12/2011	Assistenzärztin an der Klinik für Kardiologie, Angiologie und Pneumologie des Universitätsklinikums Magdeburg
Seit 02/2012	Assistenzärztin an der Klinik für Innere Medizin I Klinikum Peine

Magdeburg, den 16.08.2013

Annekatriin Wiedemann

Anlagen

Anlage I – Chemikalien, Kits und Geräte:

Chemikalien:

Soweit nicht anders angegeben wurden die verwendeten Chemikalien von folgenden Firmen bezogen:

Biochrom KG	(Berlin)
Merck	(Darmstadt)
PAA	(Cölbe)
Carl Roth GmbH & Co.	(Karlsruhe)
Serva	(Heidelberg)
Sigma-Aldrich Chemie GmbH	(Steinheim)

Alle Chemikalien waren von handelsüblicher Reinheit.

Gebrauchsmaterialien:

Alle Gebrauchsmaterialien wurden soweit nicht anders angegeben, von folgenden Firmen bezogen:

Gefäße für die Zellkultur:	Nunc, Wiesbaden
Reaktionsgefäße:	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Pipetten (Kunststoff):	Greiner, Frickenhausen
Transwellchamber-Platten:	Costar Corning, über Fischer Scientific, Schwerte

Kits:

DC Protein Assay	Bio-Rad, München
Lipofectamine™2000 Transfektions-Kit	Invitrogen, Groningen, Niederlande
SYBR® Green Kit	Quantace, Berlin
peqGOLD TriFast™	peqLab, Erlangen
peqGOLD Taq-DNA-Polymerase Kit	peqLab, Erlangen
QIAprep Spin Miniprep Kit	Invitrogen, Karlsruhe
sCD138 ELISA KIT	Cell Science, Canton, MA, USA
TOPO TA Cloning® Kit	Invitrogen, Karlsruhe
Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Sample Kit	Roche, Mannheim
<i>ultraView</i> ™ Universal DAB Detection Kit	Ventana, Tucson, USA

Geräte:

Brutschrank	Heraeus, Hanau
BenchMark® XT Färbeautomat	Ventana, Tucson, USA
Coulter Counter ZII	Coulter Immunotech, Marseille, Frankreich
Elektrophorese-Apparaturen	Eurogentec, Taufkirchen
Gewebeinfiltrationsautomat (Leica ASP-300)	Leica Instruments GmbH, Nussloch
LightCycler®	Roche, Mannheim
Manual Tissue Arrayer MTA 1	Beecher Instruments, USA
Mikrotom RM 2155	Leica Instruments GmbH, Nussloch
Olympus BH-2 Lichtmikroskop	Olympus Optical Co., Hamburg
Paraffinausgießstation (Leica EG1160)	Leica Instruments GmbH, Nussloch

Photometer	Eppendorf, Hamburg
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Schüttler	IKA®Werke, Staufen
Spektralfluorometer SPECTRAmax® GEMINI	Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, USA
Thermocycler	Biozym, Hamburg
Tischzentrifuge	Roth, Karlsruhe
Wasserbad	Hettich, Tuttlingen
Zentrifugen	Eppendorf, Hamburg

Weitere Reagenzien und Materialien:

HyperLadder IV	Bioline, Luckenwalde
MACS Microbeads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
MACS LS-Säulen	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
AutoMACS	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Polylysin-beschichtete Objektträger	Super Frost Plus Menzel Gläser, Braunschweig

Anlage II - Reaktionsansatz Reverse Transkription:

4	µl	5xReaktionspuffer
0,5	µl	Protector RNase Inhibitor (40 U/µl)
2	µl	Deoxynucleotide Mix (10mM each)
1	µl	DTT (5mM)
1,1	µl	Transcriptor High Fidelity Reverse Transcriptase (20 U/µl)

Anlage III - Reaktionsansatz semiquantitative PCR:

1	µl	umgeschriebene cDNA
5	µl	10xReaktionspuffer
10	µl	5xEnhancer Solution P
1	µl	dNTP Mix (40mM)
1	µl	SYN-1 spezifischer up Primer
1	µl	SYN-1 spezifischer do(wn) Primer
0,5	µl	<i>Taq</i> -DNA-Polymerase (5 u/µl)
30,5	µl	Wasser (ddH ₂ O)

Anlage IV – Reaktionsansatz Real-time PCR:

2	µl	umgeschriebene cDNA
4	µl	5xSensiMix <i>Lite</i>
1,5	µl	Enzyme Mix
1	µl	SYN-1 spezifischer up Primer/18S up Primer
1	µl	SYN-1 spezifischer do(wn) Primer/18S down Primer
0,4	µl	50xSYBR® Green solution
0,4	µl	MgCl ₂ (50 mM)
9,7	µl	Wasser (ddH ₂ O)