

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

**Die Ausprägung der Syndecan-4-Expression im  
Magenkarzinom und Korrelation mit klinisch-pathologischen  
Faktoren**

**Dissertation  
Zur Erlangung des Doktorgrades  
Dr. med.  
(doctor medicinae)**

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

vorgelegt von	Johannes Hornig
aus	Hallenberg
Magdeburg	2015

„Den Rang eines Medicus muss man sich verdienen.  
Wenn du es wirklich willst, musst du dich  
Um des Lernens willens abmühen,  
musst jede Möglichkeit suchen,  
um es den Anderen gleichzutun  
und sie zu übertreffen.  
Du musst studieren mit der Leidenschaft des Gesegneten  
oder des Verdammten.“

***Noah Gordon, Der Medicus***

**- für Hugo und Anica-**

## **DOKUMENTATIONSBLATT**

### **Bibliographische Beschreibung**

Hornig, Johannes:

Syndecan-4-Expression im Magenkarzinom und Korrelation mit klinisch-pathologischen Faktoren. 2015. 99 Blatt: 19 Abbildungen, 3 Tabellen

Magdeburg, Medizinische Fakultät, Dissertation

Das Magenkarzinom hat mit einer 5-Jahres-Gesamtüberlebenswahrscheinlichkeit von 20-30% nach wie vor eine schlechte Prognose. In dieser Studie wurde die Expression von Syndecan-4, einem transmembranen Heparansulfatproteoglykan mit Beteiligung an Zellmigration, Zell-Matrix-Interaktionen und Angiogenese, und seine Bedeutung für die Prognose des Magenkarzinoms untersucht. Immunhistologische Analysen an 161 Magenkarzinomen zeigten eine Überexpression von Syndecan-4 im Tumor im Vergleich zur nichttumorösen Magenmukosa, eine zonale Expression innerhalb des Karzinoms mit Zunahme zur Invasionsfront hin und eine Korrelation der Syndecan-4-Überexpression mit klinisch-pathologischen Parametern eines fortgeschrittenen Tumorstadiums wie lokalen Tumorausbreitung, Lymphknoten- und Fernmetastasierung sowie Angioinvasion. Des Weiteren ging eine hohe Syndecan-4-Expression mit einer kürzeren Überlebenszeit der Patienten einher. Die immunhistologischen Expressionswerte korrelierten mit den per ELISA und LC-PCR ermittelten Protein- und RNA-Konzentration von Syndecan-4. Zudem identifizierte die Analyse morphologischer Parameter der Invasionsfront wie eine infiltrative Invasionsfront, eine fehlende oder geringe Lymphozyteninfiltration und das Vorhandensein von Tumorbudding als negative prognostische Marker des Magenkarzinoms.

### **Schlüsselwörter**

Magenkarzinom, Syndecan-4, Heparansulfatproteoglykane, Invasionsfront, Invasionstyp, Tumorbudding

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1.</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Das Magenkarzinom.....</b>	<b>1</b>
1.1.1	Ätiologie des Magenkarzinoms.....	1
1.1.1.1	Chronische Gastritiden.....	1
1.1.1.2	Präkursorläsionen.....	2
1.1.1.3	Genetische Faktoren.....	3
1.1.1.4	Umwelteinflüsse.....	3
1.1.2	Epidemiologie (Inzidenz, Geschlecht, Alter).....	4
1.1.3	Diagnostik.....	4
1.1.4	Pathohistologische Begutachtung.....	5
1.1.4.1	Lokalisation.....	5
1.1.4.2	Makroskopie.....	5
1.1.4.3	Histologie und Grading.....	6
1.1.4.4	Staging.....	7
1.1.5	Therapie.....	7
1.1.6	Prognose.....	8
<b>1.2</b>	<b>Die Syndecane.....</b>	<b>9</b>
1.2.1	Struktur der Syndecane.....	9
1.2.2	Vorkommen und Expression von Syndecan-4.....	11
1.2.3	Bindungsspektrum der Syndecane.....	12
1.2.4	Funktion der Syndecane.....	12
1.2.4.1	Zell-Zell-Kontakte und fokale Adhäsion.....	13
1.2.4.2	Signalprozesse und Endozytose.....	13
1.2.4.3	Zellmigration.....	14
1.2.4.4	Embryogenese, Angiogenese und Wundheilung.....	14
1.2.4.5	Entzündung.....	15
1.2.5	Syndecan-4 in Tumoren.....	15
<b>2.</b>	<b>Fragestellung.....</b>	<b>16</b>
<b>3.</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>17</b>
<b>3.1</b>	<b>Material.....</b>	<b>17</b>
3.1.1	Untersuchungskollektiv.....	17
3.1.2	Charakterisierung der Magenkarzinome.....	18
3.1.2.1	Tumorlokalisierung.....	18
3.1.2.2	Tumorklassifikation.....	18
3.1.2.3	Histologie und Grading.....	18
3.1.2.4	Klassifikation der Invasionsfront.....	19
<b>3.2</b>	<b>Methoden.....</b>	<b>19</b>
3.2.1	Humane Gewebeproben.....	19
3.2.1.1	Materialgewinnung, Fixierung und Einbettung.....	19
3.2.1.2	Herstellung der Tissue-Microarrays.....	20
3.2.1.3	Immunhistochemische Färbung.....	21
3.2.1.4	Beurteilung der Ergebnisse der immunhistochemischen Reaktion..	21

3.2.2	Nachweis von Syndecan-4-RNA.....	22
3.2.2.1	RNA-Präparation aus Frischgewebe.....	22
3.2.2.2	RNA-Quantifizierung.....	23
3.2.2.3	Reverse Transkription von RNA.....	23
3.2.2.4	Quantitative real-time-PCR am LightCycler™.....	24
3.2.2.5	Gelelektrophorese.....	25
3.2.3	Nachweis von Syndecan-4-Protein.....	25
3.2.3.1	Präparation aus Frischgewebe.....	25
3.2.3.2	Quantifizierung mittels Photometer.....	26
3.2.3.3	Human Syndecan-4-ELISA.....	26
3.2.4	Statistische Datenverarbeitung und Fotodokumentation.....	27
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>29</b>
<b>4.1</b>	<b>Klinisch-pathologische Daten des Untersuchungskollektivs.....</b>	<b>29</b>
<b>4.2</b>	<b>Prognoseparameter.....</b>	<b>29</b>
4.2.1	Klinisch-pathologische Prognoseparameter.....	29
4.2.2	Morphologische Prognoseparameter der Invasionsfront.....	31
<b>4.3</b>	<b>Immunhistochemische Untersuchungsergebnisse.....</b>	<b>35</b>
4.3.1	Validierung der Untersuchungsmethoden.....	35
4.3.2	Expression von Syndecan-4 in der Magenmukosa.....	36
4.3.3	Expression von Syndecan-4 im Magenkarzinom.....	37
4.3.3.1	Verteilungsmuster und morphologische Besonderheiten der Syndecan-4-Expression.....	37
4.3.3.2	Korrelation der Syndecan-4-Expression mit den klinischen Daten	40
4.3.3.3	Korrelation der Syndecan-4-Expression mit den Überlebensdaten	41
<b>4.4</b>	<b>Syndecan-4 mRNA- und Proteinexpression.....</b>	<b>43</b>
<b>5.</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>46</b>
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>60</b>

## Literaturverzeichnis

**Danksagung**  
**Erklärung**  
**Lebenslauf**

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

CA 19-9	Cancer-Antigen 19-9
CA 72-4	Cancer-Antigen 72-4
Cag	cytotoxisches Antigen A
CD8	Cluster of Differentiation 8
CDH1	Cadherin-1, Typ 1, E-Cadherin
cDNA	zyklische Desoxyribonukleinsäure(acid)
CEA	carcino-embryonales Antigen, Tumormarker
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DJ	Dr. med. Dörthe Jechorek
DNA	desoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
dNTP-Mix	Nukleotidtriphosphat-Mix
dsDNA	Doppelstrang DNA
ECF	Epirubicin, Cisplatin, Fluoruracil
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	epidermal growth factor
EIA-Puffer	Enzyme Immuno Assay-Puffer
ELISA	Enzym-linked-Immunoabsorbent Assay
EZM	extrazelluläre Matrix
FAP	familiäre adenomatöse Polyposis
FGF	fibroblast growth factor
FGFR-1	Fibroblasten Wachstums(growth)faktor-Rezeptor-1
FLOT	Fluoruracil, Leukovorin, Oxaliplatin, Docetaxel
GAG	Glykosaminoglykan-Ketten
GEKID	Gesellschaft epidemiologischer Krebsregister in Deutschland
GPI	Glykosylphosphatidylinositol(-Anker)
H2O dest.	destilliertes Wasser
H2SO4	Schwefelsäure
HCL	Salzsäure
HE	Hämatoxilin-Eosin
HER-2	human epidermal growth factor receptor 2
H.p.	Helicobacter pylori
HS-Ketten	Heparansulfat-Ketten
ICAM	intercellular adhesion molecule
IF	Invasionsfront
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IL1RN	Interleukin-1-Rezeptoranatagonisten-Gen
IRS	immunreaktiver Score
LC-PCR	LightCycler-Polymerase-Ketenreaktion
MHC	Major histocompatibility Complex
mRNA	messenger Ribonukleinsäure (acid)
MW	Mittelwert
Na	Natrium
NaCl	Kochsalz
PBS-Puffer	phosphate buffered saline, Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Ketten(chain)-Reaktio
PDGF	platet derived growth factor

PDZ <sub>2</sub>	PSD-95/Dlg/ZO-1-Protein-Domänen
PGE2	Prostaglandin-E2
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKC $\alpha$	Proteinkinase C- $\alpha$
PP	Anzahl immunpositiver Zellen
pTMN	pathohistologisch gesicherte TNM-Klassifikation
Rac1	ras-assoziiertes Botulinum-Toxin-Substrat 1
RhoA	ras homologe Genfamilie, Untergruppe A
RKI	Robert-Koch-Institut
RNA	ribonucleic acid, Ribonukleinsäure
RT	reverse Transkriptase
SD	Standardabweichung
SDF-1	stromal cell-derived factor-1
SI	Intensität der Färbung
TBE-Puffer	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TGF	transforming growth factor
TGF- $\beta$ 2	Transforming growth factor- $\beta$ 2
TMA	Tissue-Microarray
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
TZ	Tumorzentrum
UICC	Union Internationale contre le Cancer
VacA	vakuolisierendes Cytotoxin A
VEGF	vascular endothelial growth factor
WHO	World Health Organization, Weltgesundheitsorganisation
Wnt5A	wingless-type MMTV integration site family, 5A

## 1. EINLEITUNG

### 1.1 Das Magenkarzinom

#### 1.1.1 Ätiologie des Magenkarzinoms

Zu den ätiologischen Faktoren, die die Entstehung eines Magenkarzinoms begünstigen, gehören vor allem die chronische Gastritis, Präkursorläsionen der Magenmucosa, genetische Faktoren und Umweltfaktoren.

##### 1.1.1.1 Chronische Gastritiden

Eine chronische Gastritis ist durch eine Infiltration der Lamina propria mit Lymphozyten und Plasmazellen gekennzeichnet und muss histologisch diagnostiziert werden. Gemäß der Sydney-Klassifikation wird die chronische Gastritis ätiologisch in 3 Typen unterteilt:

Die Typ A-Gastritis, oder auch **Autoimmungastritis**, zeichnet sich durch Antikörper gegen die Protonenpumpe der Parietalzellen (90% der Fälle) und durch Intrinsic-Factor-Antikörper (50% der Fälle) aus. Als Folge kommt es zu einer chronischen Entzündung in Fundus und Corpus mit Atrophie der Drüsenkörper und einer intestinalen Metaplasie. Die atrophische Autoimmungastritis ist eine fakultative Präkanzerose des Magenkarzinoms<sup>(69)</sup>.

Die **bakterielle Gastritis** (Typ B) ist eine durch die Besiedlung mit *H. pylori* induzierte chronische Entzündung und stellt mit 80-90% der Fälle die häufigste Form der Gastritis und einen der wichtigsten Risikofaktoren für die Entstehung eines Magenkarzinoms dar<sup>(70,77,162)</sup>. *H. pylori* kolonisiert die Mucosa des Magens und spaltet enzymkatalysiert Harnstoff in Ammoniak und Kohlendioxid. Ammoniak erhöht den pH-Wert in der direkten Umgebung des Bakteriums, so dass die Toxizität der Magensäure neutralisiert wird. Über verschiedene Pathogenitätsfaktoren wie Cag oder VacA wird die Magenmucosa geschädigt und die Gastrinfreisetzung erhöht woraus eine Entzündung der Magenschleimhaut resultiert. Durch persistierende Entzündung und konsekutiven oxidativen Stress kommt es zur Mukosaatrophie, intestinalen Metaplasie bis hin zur Dysplasie<sup>(167)</sup>. Aus der Dysplasie kann im Verlauf ein Magenkarzinom entstehen<sup>(28,164)</sup>.

Die **chemisch-toxischen Gastritis** (Typ C) wird durch Gallereflux, Medikamente, Nikotin- oder Alkoholkonsum induziert und führt zu Ödemen und Fibrosierung der Mukosa<sup>(69)</sup>.

### 1.1.1.2 Präkursorläsionen

Präkursorläsionen sind epitheliale Veränderungen, die die Entstehung eines Karzinoms begünstigen. Dem intestinalen Typ des Magenkarzinoms geht eine Serie sequenzieller präkanzeröser Veränderungen der Magenmukosa voraus, bekannt als Correa-Hypothese<sup>(33)</sup>, zu deren definierte Stadien die chronisch aktive nicht-atrophe Gastritis, die multifokale atrophe Gastritis, die komplette und später inkomplette Metaplasie und die intestinale Neoplasie gehören. Karzinome vom diffusen Typ nach Laurén entwickeln sich auf einer kürzeren, bisher weniger gut charakterisierten Sequenz epithelialer Veränderungen.<sup>(187)</sup>

Die chronisch-aktive, H.pylori-assoziierte Gastritis kann nicht-atrophisch persistieren oder über eine multifokale atrophe Gastritis (mit intestinaler Metaplasie) zum Karzinom fortschreiten. Die Pan-Gastritis oder Corpus-prädominante Gastritis zeigt das höchste Risiko für die Entstehung eines Magenkarzinoms im Vergleich zur Atrophie oder intestinalen Metaplasie<sup>(29,79,121,173)</sup>, wobei für letztere auch diskutiert wird, ob es sich nicht vielmehr um ein parakanzeröses und nicht präkanzeröses Phänomen handelt<sup>(92)</sup>

Die **Atrophie** ist gekennzeichnet durch einen Verlust des spezifischen Drüsenkörpers und tritt meist herdförmig multifokal auf. Die **intestinale Metaplasie** ist eine Umdifferenzierung des Epithels der Magenschleimhaut mit Ausbildung von Becherzellen und, je nach Subtyp, variabler Enzym- und Muzinproduktion<sup>(69)</sup>. Hier wird der komplette bzw. Dünndarm-Phänotyp vom inkompletten Typ abgegrenzt. Eine weitere Metaplasieform ist die **spasmolytic polypeptide-expressing metaplasia** (SPEM), die eine pseudopylorische Metaplasie mit Ersatz der Fundusdrüsen (=oxyntische Atrophie) durch Drüsen antralen Phänotyps mit Expression des spasmolytischen Polypeptids TFF2 aufweist. Sie ist vor allem bei japanischen Patienten mit einem Magenfrühkarzinom oder Magenstumpfkarcinom assoziiert<sup>(45,186)</sup> und stellt die häufigste Präkursorläsion in murinen Modellen zur Magenkarzinogenese dar<sup>(61)</sup>. Die **intraepitheliale Neoplasie** entsteht sowohl auf dem Boden einer intestinalen Metaplasie, als auch sporadisch und gilt aufgrund genetischer Veränderungen als obligate Präkanzerose des Magenkarzinoms<sup>(137)</sup>. Histologisch unterscheidet man 2 Subtypen: Die low-grade und high-grade intraepitheliale Neoplasie.<sup>(29)</sup> In 80% der Fälle entwickelt sich aus der intraepithelialen Neoplasie ein Karzinom<sup>(69)</sup>.

**Adenome des Magens** sind polypoide Läsionen der Magenschleimhaut mit intraepitheliale Neoplasie<sup>(153)</sup>. Man differenziert tubuläre, tubulovillöse und villöse Adenome. Neben dem histologischen Aufbau sind der Grad der intraepithelialen Neoplasie, das makroskopische Erscheinungsbild und die Größe prognostisch entscheidend. So entarten Adenome mit einer Größe unter 2cm in ca. 3% der Fälle und Adenome größer 2cm in 40-50% der Fälle. Villöse Adenome haben generell ein höheres Entartungsrisiko<sup>(69)</sup>.

### 1.1.1.3 Genetische Faktoren

Obwohl lediglich etwa 10% der Magenkarzinome eine erbliche Komponente aufweisen<sup>(103)</sup>, wurden in den letzten Jahren diverse genetische Faktoren identifiziert, die die Entstehung eines Magenkarzinoms begünstigen.

So erkrankten Träger der Blutgruppe A signifikant häufiger<sup>(68)</sup>. Bei Verwandten 1. Grades mit einem Magenkarzinom ist das individuelle Risiko ebenfalls erhöht<sup>(190)</sup>. Auch kommt es ihm Rahmen des autosomal-dominant vererbten hereditären non-polypösen kolorektalen Karzinoms gehäuft zu Magenkarzinomen<sup>(97,112)</sup>.

Weitere Syndrome mit einem erhöhten Magenkarzinomrisiko sind die Familiäre adenomatöse Polyposis (FAP), das Li-Fraumeni-Syndrom und das Peutz-Jeghers-Syndrom<sup>(69)</sup>.

Das familiäre Magenkarzinomssyndrom (hereditäres diffuses Magenkarzinom) beruht auf einer Mutation im CDH1-Gen von E-Cadherin<sup>(148)</sup>.

Darüber hinaus konnten El-Omar et al.<sup>(44)</sup> zeigen, dass ein Polymorphismus des Interleukin-1B-Genes (C-T und T-C Transposition der Positionen -511 und -31) in Kombination mit einem Tandem-Repeat in Intron 2 des Interleukin-1-Rezeptorantagonisten-Genes (IL1RN) zu einem erhöhten Karzinomrisiko führt.

### 1.1.1.4 Umwelteinflüsse

Inzidenz und Prävalenz des Magenkarzinoms zeigen deutliche geographische Unterschiede mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko in den Industrienationen<sup>(141)</sup>. Es besteht eine enge Korrelation zwischen einem erhöhtem Konsum von Tabak, Alkohol oder stark gesalzenen, oder geräucherten Speisen und einem vermehrten Risiko, an einem Magenkarzinom zu erkranken<sup>(51,168)</sup>. Adipositas und mangelnde körperliche Aktivität begünstigen ebenfalls die Entstehung eines Magenkarzinoms.

### 1.1.2 Epidemiologie (Inzidenz, Geschlecht, Alter)

Weltweit gibt es ca. 20/100.000 Neuerkrankungen pro Jahr, in Europa ca. 30/100000. Männer sind etwa doppelt so häufig betroffen wie Frauen. Das Magenkarzinom ist bei Männern die 5. häufigste maligne Erkrankung und belegt bei Frauen Platz 8. Es macht 4 – 5% aller malignen Erkrankungen aus und verursacht 5% aller Krebssterbefälle. Das mittlere Erkrankungsalter ist bei Männern das 71. Lebensjahr, Frauen erkranken im Mittel mit 75 Jahren. Die Inzidenz des Magenkarzinoms ist, insbesondere aufgrund der Helicobactereradikation, in den westlichen Nationen seit Jahren rückläufig und liegt in Deutschland bei ca. 26/100000 Männer bzw. 17/100000 Frauen.

Während das Magenkarzinom vom diffusen Typ global etwa mit der gleichen Häufigkeit vorkommt, ist der intestinale Typ eng mit dem Vorkommen chronischer Gastritiden assoziiert und zeigt besonders in den Industrieländern eine hohe Prävalenz (besonders Japan, Finnland, USA, Deutschland)

*(www.rki.de, Krebs in Deutschland, Häufigkeiten und Trends, 7. Auflage 2010)*

### 1.1.3 Diagnostik

Zu den klinischen **Symptomen** des Magenkarzinoms gehören allgemeine Symptome wie Müdigkeit, Gewichtsverlust, Nachtschweiß, subfebrile Temperaturen, Inappetenz, Übelkeit und Leistungsminderung, aber auch lokalisationspezifische Symptome wie Dysphagie (Kardianähe) oder Magenentleerungsstörungen (Pylorusnähe). Auch Blutungen wie Hämatemesis und Meläna können auftreten. Palpable Tumore im Epigastrium und vergrößerte Lymphknoten besonders supraclaviculär (Virchow-Drüse) können bei der körperlichen Untersuchung richtungsweisend sein.

Anamnestisch sollten Risikoerkrankungen wie das Ulcus ventriculi et duodeni, rezidivierende oder chronische Gastritiden und vorausgegangene Magen(teil)operationen erfragt werden.

Als Goldstandard der Diagnostik gilt die Gastroskopie mit Biopsien suspekter Herde<sup>(124)</sup>.

Die Hauptsäulen der bildgebenden Diagnostik sind die Computertomographie mit Doppelkontrasttechnik und die Endosonographie. Beide Verfahren dienen der Beurteilung der Invasionsstiefe und der regionalen Lymphknoten. Tumormarker wie CEA, CA 19-9 und CA 72-4 eignen sich lediglich zur Verlaufskontrolle und spielen in der Diagnostik eine untergeordnete Rolle<sup>(124)</sup>.

### 1.1.4 Pathohistologische Begutachtung

Die pathohistologische Begutachtung des Magen(teil)resektates besteht aus einer makroskopischen Beschreibung unter genauer Angabe des Resektionstypes, der Tumorgröße, Tumorform, Tumorlokalisierung, Entfernung des Tumors zu den Resektaträndern, Angaben zur makroskopischen Serosapenetration sowie einer histologischen Aufarbeitung zur Feststellung des histologischen Types, Gradings und TNM- sowie R-Klassifikation gemäß der aktuell gültigen UICC-Klassifikation.

#### 1.1.4.1 Lokalisation

Über 65% aller Magenkarzinome sind im Antrum/ Pylorusbereich lokalisiert. Jeweils 10-25% finden sich im Korpus- bzw. Fundusbereich, der kleinen Kuvatur oder der Kardia. Befällt ein Karzinom mehrere Unterbezirke, so wird es jenem Bezirk zugeordnet in dem sich der größte Volumenanteil befindet (longitudinaler Durchmesser)<sup>(135)</sup>

#### 1.1.4.2 Makroskopie

Die meisten Magenkarzinome entwickeln sich auf dem Boden einer intraepithelialen Neoplasie als polypoide, aber auch als flache Läsion.

Anhand der Bormann-Klassifikation lässt sich das makroskopische Erscheinungsbild der Magenkarzinome in vier Grade untergliedern:

Typ 1	polypös exophytisch ( 35 % )
Typ 2	ulzeriert, mit scharfer Begrenzung ( 35 – 40 % )
Typ 3	ulzeriert, mit unscharfer Begrenzung ( 20 % )
Typ 4	diffus infiltrierend ( 20 % )

Diffus wachsende Karzinome (Typ 4) infiltrieren oberflächlich Mucosa und Submucosa und erzeugen plaqueartige, flache Defekte mit und ohne Ulzerationen. Muzinöse Adenokarzinome zeigen eine gelantinartige glänzende Oberfläche<sup>(135)</sup>.

Der Anteil von Frühkarzinomen in den westlichen Staaten liegt bei etwa 20% aller diagnostizierter Magenkarzinome. Definitionsgemäß beschränkt sich seine Tiefenausdehnung auf die Mukosa oder Submukosa. Die Prognose ist nach kurativer Operation günstig<sup>(69)</sup>. Die Einteilung des Frühkarzinoms nach Wachstumstyp, Tumorgröße und Invasionstyp entsprechend der Japanischen Klassifikation nach Inokuchi et al.<sup>(80)</sup> dient der Abschätzung der Wahrscheinlich bereits bestehender

Lymphknotenmetastasen und unterscheidet den superficial spreading type, small mucosa type und penetrating type.

#### 1.1.4.3 Histologie und Grading

Das Tumortyping erfolgt nach der WHO-Klassifikation und schließt die Laurén-Klassifikation ein<sup>(69)</sup>. Entsprechend der prädominanten histologischen Komponente werden das tubuläre, papilläre und muzinöse Adenokarzinom sowie das Siegelringzellkarzinom des Magens unterschieden.

Das tubuläre Adenokarzinom besteht aus stark dilatierten und verzweigten tubulären, sowie azinären Strukturen mit unterschiedlichem Durchmesser. Die Zelltypen reichen von low-grade bis high-grade mit einem sehr pleomorphen Zellbild<sup>(47)</sup>. Um ein muzinöses Adenokarzinom histologisch zu diagnostizieren muss per definitionem in über 50% der Tumormasse muzinöses, extrazelluläres Material vorhanden sein.

Ein Siegelringzellkarzinom ist zu diagnostizieren, wenn über 50% der Tumormasse von malignen Zellen gebildet wird, welche intrazytoplasmatisch Muzin enthalten.

Entsprechend dem Wachstumsmuster wird **nach Laurén** zwischen Karzinomen vom intestinalen, diffusen oder Mischtyp differenziert<sup>(104)</sup>. Das Karzinom vom intestinalen Typ zeigt Drüsenstrukturen und entsteht meist auf dem Boden einer intestinalen Metaplasie. Die häufig scharfe Begrenzung und ein guter bis moderater Differenzierungsgrad der Tumorzellen führen zu einer besseren Prognose als beim Karzinom vom diffusen Typ. Letzterer wächst deutlich infiltrativ mit einem mäßigen bis schlechten Differenzierungsgrad der Zellen, wodurch keine oder nur spärliche Drüsenstrukturen erkennbar sind. Die Tumorzellen sind in der Regel in Clustern angeordnet und zeigen eine geringere Kohäsion und geringere Mitoserate als beim intestinalen Typ.

Das **Grading** nach WHO erfolgt vierstufig: G1= gut differenziert, G2= mäßig differenziert, G3= mäßig differenziert, G4= undifferenziert, wobei aufgrund der besseren Reproduzierbarkeit eine Einteilung in zwei Grade (low vs. high grade) empfohlen wird. Erfolgte eine präoperative Radio- und/oder Chemotherapie, ist ein histologisches Regressionsgrading durchzuführen, welches in der Regel in Deutschland nach dem Vorschlag der Münchener Arbeitsgruppe um Becker et al. erfolgt<sup>(10)</sup>.

#### 1.1.4.4 Staging

Die Stadieneinteilung der Magenkarzinome erfolgt anhand der pTNM-Klassifikation. Hierbei werden die Infiltrationstiefe (T), der Lymphknotenstatus (N) und das Auftreten von Fernmetastasen (M) beurteilt. Für die N-Kategorie müssen mindestens 15 regionäre Lymphknoten histologisch untersucht werden, um eine Aussage treffen zu dürfen. Darüber hinaus werden die Resektionsränder des Tumors (R-Klassifikation) sowie die Infiltration von Lymphgefäßen (L), Nerven (N) und Venen (V) mit untersucht und verschlüsselt<sup>(135)</sup>.

#### 1.1.5 Therapie

Die Therapie des Magenkarzinoms erfolgt stadienabhängig. Besteht eine kurative Intention, ist die Operation Mittel der Wahl und kann gegebenenfalls durch andere Therapiekonzepte ergänzt werden.

Der histomorphologische Typ und die Tumorlokalisation sind bei der Entscheidung zwischen totaler oder subtotaler Gastrektomie die ausschlaggebenden Faktoren. Während Magenfrühkarzinome in den meisten Fällen endoskopisch resiziert werden können, müssen Karzinome im oberen und mittleren Magendrittel vom intestinalen Typ und alle Karzinome vom diffusen Typ nach Lauren einer totalen Gastrektomie unterzogen werden. Karzinome des unteren Drittels und teilweise des mittleren Drittels vom intestinalen Typ können auch mit einer subtotalen Gastrektomie (Teilresektion) therapiert werden<sup>(124)</sup>.

Der einzuhaltende Sicherheitsabstand beträgt bei Karzinomen vom intestinalem Typ nach Laurén 5cm und bei Karzinomen vom diffusem Typ 8cm<sup>(73,124)</sup>. Insbesondere bei lokal weit fortgeschrittenen Karzinomen (UICC-Stadium Ib-IIIb) ohne Möglichkeit einer R0-Resektion wird ein Downsizing durch eine neoadjuvante Chemotherapie angestrebt. Die Ergebnisse der MAGIC-Studie zeigten ein Anstieg der 5-Jahres-Überlebensrate von 23% auf 36,3% bei Patienten mit neoadjuvanter Chemotherapie nach ECF-Schema (Epirubicin 50mg/m<sup>2</sup>, Cisplatin 60mg/m<sup>2</sup>, 5-Fluoruracil 200mg/m<sup>2</sup>) gegenüber jenen mit alleiniger chirurgischer Therapie<sup>(33)</sup>. Das ECF-Regime wird aktuell in diversen Studien mit alternativen Schemata verglichen (z.B. FLOT). Eine adjuvante Chemotherapie hingegen verspricht nach derzeitiger Studienlage noch keine signifikante Steigerung der Überlebensrate, jedoch wird eine neoadjuvante Chemotherapie nach erfolgter Resektion auch adjuvant fortgesetzt<sup>(33)</sup>.

Seit 2010 stehen für HER2/neu-positive Karzinome mit dem monoklonalen Her2/neu-Antikörper Trastuzumab eine neue Therapieoption zur Verfügung. Bei funktioneller Inoperabilität kann eine definitive Radiochemotherapie in potentiell kurativer Absicht versucht werden<sup>(124)</sup>.

### 1.1.6 Prognose

Die Prognose von Patienten mit Magenkarzinom ist mit einer mittleren 5-Jahres-Überlebensrate von 20-30% weiterhin mäßig und hängt von verschiedenen Faktoren ab. Hierzu gehören die R0-Resektion, der Lymphknotenstatus, das Vorhandensein von Fernmetastasen und die pT-Kategorie. Auch das Alter, Begleiterkrankungen und der Allgemeinzustand des Patienten sind prognostisch signifikant<sup>(113,120)</sup>.

Patienten mit Magenfrühkarzinom (UICC Ia) haben mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von über 80% die beste Prognose<sup>(116,160)</sup>. Studien zeigen, dass ein fortgeschrittener Lymphknotenbefall die Prognose trotz Gastrektomie deutlich einschränkt. So liegt die 5-Jahres-Überlebensrate bei 1-6 befallenen Lymphknoten noch bei 44%, sinkt jedoch auf 30% bei 7-15 befallenen Lymphknoten bzw. auf nur noch 11% bei über 15 positiven Lymphknoten.

Durch oft fehlende Frühsymptomatik haben etwa 70% der Patienten bei Diagnosestellung schon Lymphknotenmetastasen<sup>(105)</sup>.

Auch die Invasionstiefe des Karzinoms ist prognostisch entscheidend. So beträgt die 5-Jahres-Überlebensrate im Tis-Stadium noch nahezu 100% um von Stadium T1 bis T4 von 75% über 44,4% und 5,9% auf letztendlich 3,3% zu fallen.

Patienten mit Fernmetastasen (pM1, UICC IV) haben lediglich eine 5-Jahres-Überlebensrate von durchschnittlich 4,1 Monaten nach operativem Eingriff<sup>(160)</sup>.

## 1.2 Die Syndecane

Die **Proteoglykane** sind glykosylierte Proteine der extrazellulären Matrix (EZM) und befinden sich darüber hinaus in intrazellulären sekretorischen Granula und an der Zelloberfläche.

Sie setzen sich aus Core-Proteinen zusammen, welche kovalent an zwei bis drei Hyaluronsäureketten gebunden sind. Die Glykosaminoglykan-Ketten (GAG) der Core-Proteine besitzen als biochemisches Grundgerüst Polysaccharidketten aus Uronsäure und einem N-Acetylglukosamin als Aminozucker<sup>(140)</sup>. Je nach Sulfatierung und Zusammensetzung der Disaccharide der GAG-Ketten erfolgt eine Einteilung in Heparansulfat-, Chondroitinsulfat-, Keratansulfat- oder Dermatansulfat-Proteoglykane<sup>(20)</sup>.

Die **Heparansulfat-Proteoglykane** unterteilen sich in membranständige und matrixassoziierte Proteoglykane<sup>(140)</sup>. Zur Gruppe der membranständigen Proteoglykane zählen die Syndecane als Transmembranproteine vom Typ I und die Glypicane, welche durch einen Glykosylphosphatidylinositol-(GPI)-Anker mit der Membran verbunden sind<sup>(36)</sup>. Ein weiteres Unterscheidungsmerkmal zwischen Glypicanen und Syndecanen bildet ihre dreidimensionale Struktur.

Die **Syndecan-Familie** besteht aus 4 Mitgliedern (Syndecan-1, Syndecan-2, Syndecan-3 bzw. Syndecan-4).

### 1.2.1 Struktur der Syndecane

Die Grundstruktur aller Syndecane zeigt Abbildung 1.2.1. Jedes Syndecan besitzt eine kurze zytoplasmatische Endodomäne, eine konservierte transmembrane Domäne und eine extrazelluläre Ektodomäne. Letztere besitzt drei bis fünf Kontaktpunkte für Heparansulfat- oder Chondroitinsulfat-Ketten<sup>(172)</sup>. Während die Endo- und transmembranen Domänen der Syndecane in weiten Teilen sequenzhomolog sind, zeigen die extrazellulären Domänen deutliche Unterschiede in ihrem Aufbau<sup>(115,152)</sup> und lassen in ihrer molekularen Struktur deutliche Gemeinsamkeiten zwischen den Syndecanen-1 und -3 sowie zwischen den Syndecanen-2 und -4 erkennen<sup>(11,31)</sup>. Die Heparansulfatketten ermöglichen Bindungen mit zahlreichen unterschiedlichen Proteinen. Die strukturähnliche Endo- und transmembrane Domäne bindet bei den vier Vertretern der Syndecane an weitestgehend gleiche Proteine<sup>(12)</sup>.

Die **extrazelluläre Domäne** der Syndecane bindet Glykosaminoglykanketten.

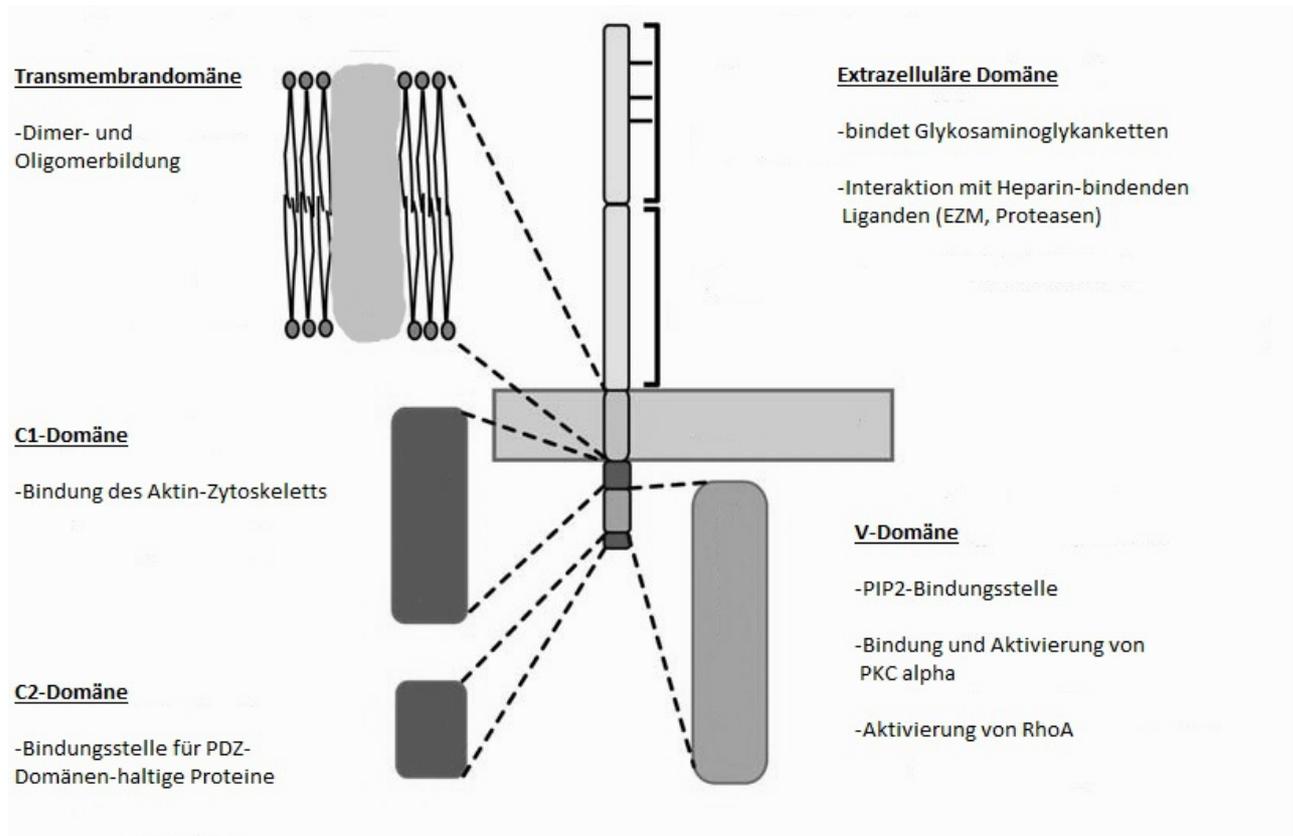
Eine Vielzahl von Enzymen ist an der postrationalen Heparansulfatketten-Modifikation beteiligt wodurch sehr spezifische und einzigartige Bindungsmotive

entstehen, welche ihrerseits eine hohe Selektivität für Bindungspartner aufweisen<sup>(172)</sup>. Syndecan-4 besitzt drei dieser Bindungsstellen für Glykosaminoglykane<sup>(32,138)</sup>. Auch spielt die gewebetypische Glykosylierung eine entscheidende Rolle<sup>(31)</sup> und führt zu unterschiedlichen zellspezifischen Lokalisationen und Bindungseigenschaften<sup>(32,151)</sup>.

Die **Transmembrandomäne** der Syndecane ist hoch konserviert und dient der Dimer- und Oligomerbildung<sup>(22)</sup> und damit der Syndecan-vermittelten Signalwege<sup>(172,192)</sup>. Bei Syndecan-4 besitzt sie in Assoziation mit einer kleinen angrenzenden Aminosäuresequenz eine hohe Affinität zu Proteinkinase C- $\alpha$  (PKC $\alpha$ ) und spielt bei ihrer Aktivierung eine entscheidende Rolle<sup>(139)</sup>.

Die relativ kurze **intrazelluläre bzw. zytoplasmatische Domäne** besteht aus den konservierten Regionen 1 und 2 (C1 und C2) und einer in ihrer Sequenz variablen V-Domäne<sup>(172)</sup>. Die C1-Domäne spielt bei der Bindung von Aktinzytoskelett assoziierten Proteinen und bei der Dimerisation der Syndecane eine wichtige Rolle<sup>(32,64)</sup>. Eine Tetrapeptid-Sequenz der C2-Domäne dient als PDZ<sub>2</sub>-Bindesstelle und damit als Bindungsstelle für PDZ-Domänen-haltige Proteine<sup>(48,60)</sup>.

Die V-Domäne ist aufgrund ihrer Heterogenität vermutlich mit für die spezifischen Funktionen der einzelnen Syndecane verantwortlich<sup>(172)</sup>. Sie besteht bei Syndecan-4 aus einer Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>)-Bindungsstelle und dient primär der Syndecan-4-Dimerisierung<sup>(159)</sup>. Die Bindung und Aktivierung von PKC $\alpha$ , einem Schlüsselenzym der Syndecan-vermittelten Signalantwort, ist ebenfalls abhängig von der Bindung von PIP<sub>2</sub> an die V-Domäne<sup>(75,131)</sup> und spielt in diesem Kontext möglicherweise eine wichtige Rolle bei der Interaktion von Syndecan-4 mit dem Zytoskelett<sup>(65)</sup>.



**Abbildung 1.2.1: Grundstruktur von Syndecan-4 und seiner Domänen (modifiziert nach Beauvais et al. <sup>(9)</sup>)**

### 1.2.2 Vorkommen und Expression von Syndecan-4

Die vier bekannten Syndecane unterscheiden sich in ihrem Expressionsmuster, je nach Gewebe, deutlich<sup>(35,36,98)</sup>.

Syndecan-4 ist das kleinste Syndecan und findet sich nahezu in allen Geweben vor allem jedoch in Epithelzellen, Endothelzellen, Fettzellen, Fibroblasten, Nervenzellen und Chondrozyten<sup>(32)</sup>. Die Expression der Syndecane ist bisher noch nicht eindeutig geklärt, unterliegt jedoch strengen Regulationsmechanismen. Die Syndecan-4-Expression wird positiv durch TGF- $\beta$ 2 beeinflusst<sup>(38)</sup>. Mechanischer Stress induziert ebenfalls eine gesteigerte Syndecan-4-Expression während der Angiogenese in Muskelgewebe<sup>(107)</sup>. Ebenso können verschiedene Bestandteile der extrazellulären Matrix, wie Fibronectin, Kollagen V, und Tenascin im Rahmen pathophysiologischer Prozesse eine gesteigerte Expression von Syndecan-4 induzieren<sup>(78)</sup>.

### 1.2.3 Bindungsspektrum der Syndecane

Durch die Glykosaminoglykanketten der Syndecane und ihrer exponierten Position an der Zelloberfläche sind sie Bindungspartner einer Vielzahl von Proteinen und greifen dadurch regulativ in diverse Signalprozesse ein. Einige Studien konnten zeigen, dass eine Inhibition der HS-Ketten-Synthese diese Signalprozesse stark herabsetzt<sup>(172)</sup>. Darüber hinaus dienen Syndecane der Interaktion mit Enzyme, Bakterien oder Viren, modulieren die Zell-Zell oder Zell-Matrix-Interaktion, oder wirken bei der Aktivierung von Proteasen und deren Inhibitoren mit<sup>(14,32,34)</sup>. Die Syndecane binden vor allem Komponenten der extrazellulären Matrix wie Fibronectin, Vitronectin, Tenascin und die fibrillären Kollagene Typ I, III und V<sup>(31)</sup> sowie Wachstumsfaktoren wie die FGFs, VEGFs, TGFs und PDGFs<sup>(172)</sup>. Auch verschiedene Interleukine<sup>(62)</sup> und Plasmaproteine wie Antithrombin-I und -III<sup>(31)</sup> oder Thrombospondin<sup>(11,31)</sup> binden Syndecane. Syndecan-4 ist darüber hinaus in der Lage direkt Endothelzellen oder Fibroblasten zu binden<sup>(119)</sup>. Die Ektodomänen der Syndecane können von der Zelloberfläche durch proteolytische Spaltung abgetrennt werden und als funktionell intakte Moleküle in das Interstitium diffundieren (sog. **shedding**)<sup>(12)</sup>. Besonders Proteasen der Matrix-Metalloproteasen-Familie sind am *shedding* beteiligt und werden durch Heparanasen in ihrer Funktion unterstützt<sup>(114)</sup>.

### 1.2.4 Funktion der Syndecane

Die vier Syndecantypen haben durch die strukturell unterschiedliche Ektodomäne ein individuelles Funktionsspektrum. Während Syndecan-2 und -4 eher eine Wachstumsstimulation initiieren, hemmen Syndecan-1 und -3 das Zellwachstum<sup>(172)</sup>. Besonders das in dieser Studie untersuchte Syndecan-4 hat wichtige Funktionen im Rahmen der Zellmigration, der Zell-Zell-Kontakte und Zell-Matrix-Interaktion, bei Signalprozessen und der Endozytose, während der Angiogenese, Embryogenese und Zellproliferation bzw. der Zelldifferenzierung<sup>(149,172)</sup>. Auch dient es als Co-Rezeptoren der Signaltransduktion an der extrazellulären Membran und ist an zahlreichen pathophysiologischen Prozessen wie Tumorentwicklung und -progression, Wundheilung, Entzündung, Schock und Sepsis beteiligt<sup>(84)</sup>.

#### 1.2.4.1 Zell-Zell-Kontakte und fokale Adhäsionen

Die Syndecane sind bei Zell-Zell-Kontakten zwischen epithelialen und mesenchymalen Zellen oder im epithelialen Zellverband ein wichtiges Bindeglied.

Sie modulieren die Struktur des Zellverbands und die Ausrichtung des Zytoskeletts durch Interaktion mit Proteinen wie Vinculin und  $\alpha$ -Aktin<sup>(52,66)</sup>. Durch Bindung von F-Aktin und dem Ezrin-Radixin-Moesin-Komplex an die Syndecan-Endodomäne wird das Aktin-Zytoskelett an der Zellmembran befestigt und so die Zellpolarität reguliert<sup>(64)</sup>.

Syndecan-4 wurde in **fokalen Adhäsionen** zahlreicher Zelltypen wie beispielsweise Endothelzellen, Fibroblasten oder vaskulären Muskelzellen identifiziert<sup>(4,181)</sup>. Es dient hier als Bindeglied zwischen Komponenten des Zytoskeletts wie Syndesmos und  $\alpha$ -Aktinin und Komponenten der extrazellulären Matrix wie Kollagen und Fibronectin<sup>(5,8,46,65,129,189)</sup>.

In migrierenden Zellen erfolgt eine Rekrutierung von Syndecan-4 von peripheren in zentrale fokale Adhäsionen<sup>(4,182)</sup>.

#### 1.2.4.2 Signalprozesse und Endozytose

Syndecan-4 ist als regulatives Protein an einer Vielzahl von Signalkaskaden beteiligt. Zu den Bindungspartnern gehören Tyrosinkinasen und Wachstumsfaktoren, über welche die Regulation von Rac1 und RhoA erfolgt<sup>(7,41,171)</sup>, wobei diese Signalkaskaden durch Bindung von Syndecan-4 an Komponenten der extrazellulären Matrix induziert werden<sup>(7,41)</sup>.

Des Weiteren fungiert Syndecan-4 im Rahmen der Zellproliferation als Co-Rezeptor für FGFR-1 und seine Liganden FGF1 und -2<sup>(146)</sup> und. Auch beruht die Migration von Gefäßmuskelzellen auf einem FGF-2-vermittelten Signal von Syndecan-4<sup>(23)</sup>.

Über die Interaktion mit PKC $\alpha$ , PIP<sub>2</sub> und PDZ wird PKC $\alpha$  aktiviert<sup>(101)</sup> und die intrazelluläre Weiterleitung von Signalen getriggert<sup>(75,161)</sup>. So ist eine Migration und Proliferation von Endothelzellen nach Mutationen der PDZ- oder PIP<sub>2</sub>-Bindungsregion von Syndecan-4 nicht mehr möglich<sup>(74)</sup>. Auch die Phosphorylierung der Fokal-Adhäsion-Kinase wird durch Syndecan-4 moduliert<sup>(177)</sup>.

Zudem ist Syndecan-4 in die Internalisierung von Peptiden, Bakterien, Viren und Molekülen der extrazellulären Matrix via Endozytose über seine Beteiligung an lipid rafts involviert<sup>(56,132,163,172)</sup>.

### 1.2.4.3 Zellmigration

Die Syndecan-4 induzierte Aktivierung der Kinasen RhoA, Rac1 und FAK führt zu einer Rac1-vermittelten Polymerisation und Kontraktion von F-Aktin, einer daraus resultierenden Extension von Filo- und Lamellipodien und der Bildung fokaler Komplexe<sup>(49,122)</sup>. Diese reifen unter Einfluss von RhoA zu fokalen Adhäsionen und führen letztendlich über eine Neuordnung kontraktile Aktin-Stressfasern zu einer Zelltranslokation<sup>(177)</sup>.

Darüber hinaus bestimmt Syndecan-4 die Ausrichtung und Lokalisation der fokalen Adhäsionen und damit die Migrationsrichtung<sup>(7,129)</sup>. Die Migration bedarf eines schnellen Abbaus der fokalen Adhäsionen an den Retraktionsregionen der Zellen und wird durch die Internalisation von Syndecan-4 via Endozytose ermöglicht. Bei Mutationen ist dieser Vorgang beeinträchtigt und die Migration gestört<sup>(125,171)</sup>.

So wurde bei Syndecan-4-knockout-Mäusen eine verlangsamte Migration von Endothelzellen mit einer gestörten Angiogenese<sup>(43)</sup> und einer gestörten Tubulusbildung gezeigt<sup>(75)</sup>. Auch war die Ausbreitung von Fibroblasten auf einer Fibronectin-Matrix bei Syndecan-4-Defizienz nicht mehr möglich<sup>(122)</sup>. Diese Migration der Fibroblasten bedarf vor allem einer Interaktion von Syndecan-4 mit Integrinen<sup>(6)</sup>.

### 1.2.4.4 Embryogenese, Angiogenese und Wundheilung

Unter pathophysiologischen Bedingungen bedarf es Syndecan-4 für eine regelrechte **Angiogenese**<sup>(43)</sup>. In Wundheilungsstudien zeigten Syndecan-4-knockout-Mäusen im Vergleich zum Wildtyp einen deutlich kleineren Durchmesser der gebildeten Kapillaren im Granulationsgewebe, was auf eine gehemmte Funktion der Syndecane als Co-Rezeptor für Wachstumsfaktoren zurückgeführt wird<sup>(50,54)</sup>. Syndecan-4-regulierte Signalmoleküle wie PKC $\alpha$ , FAK und Rac1 haben durch ihre migrationsfördernde Wirkung auf Endothelzellen entscheidenden Einfluss auf die Angiogenese. So konnten Bokhari et al.<sup>(15)</sup> eine verminderte Angiogenese bei Inhibition dieser Faktoren zeigen. Eine Überexpression hingegen ist mit einer vermehrten Angiogenese in Granulationsgewebe von Wunden verbunden<sup>(143)</sup>.

Während der **Embryogenese** zeigten Syndecan-4-knockout-Mäuse bei der Reparatur von Muskelgewebe eine insuffiziente Reaktion aufgrund einer gestörten Migration der Skelettmuskel-Vorläuferzellen<sup>(26)</sup>. In Syndecan-4-knockout-Embryonen ließ sich darüber hinaus eine vermehrte Thrombenbildung in der Plazenta nachweisen, was einen Einfluss von Syndecan-4 bei der Blutgerinnung nahe legt<sup>(83)</sup>.

Während Syndecan-4 im Rahmen der **Wundheilung** in unverwundeter Haut lediglich in epithelialen Haarfollikelzellen und epidermalen Keratinozyten exprimiert wird<sup>(58,111)</sup>, kann es bei verwundeter Haut zusätzlich in den Fibroblasten der Dermis, an den Wundrändern und im Granulationsgewebe in hoher Konzentration nachgewiesen werden<sup>(59)</sup>.

Die Wundheilung bei Syndecan-4-knockout-Mäusen ist aufgrund einer verminderten Fibroblastenmigration und einer verzögerten Angiogenese deutlich gestört<sup>(43,82,165)</sup>.

#### **1.2.4.5 Entzündung**

Bei Entzündungsvorgängen induzieren Syndecane die Produktion von Zytokinen. So wird in Peritoneal-Makrophagen die Konzentration von ICAM-1, ICAM-1a, IL-1, IL-6, IL-12, TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$  und Prostaglandin E2 durch Syndecan-4 erhöht. Auch wird die zytotoxische Fähigkeit von Makrophagen durch Syndecane verbessert<sup>(184)</sup>.

#### **1.2.5 Syndecan-4 in Tumoren**

Über die Rolle von Syndecan-4 in Magenkarzinomen ist bisher wenig bekannt. Jedoch wurde in einigen Tumorentitäten durch Untersuchung an Zelllinien oder Gewebeproben eine erhöhte Syndecan-4-Expression beschrieben wie beispielsweise in Karzinomen der Mamma, des Kolons, der Leber, der Harnblase und der Lunge in malignen Melanomen, in Seminomen des Hodens sowie in Mesotheliomen<sup>(3,67,117,130,136,150,166,170,193)</sup>.

In diesen Studien wurden mehrere Mechanismen beschrieben über welche Syndecan-4 seine Wirkung hinsichtlich Tumorwachstum, Metastasierung und Angiogenese entfaltet. Zvibel et al.<sup>(193)</sup> wiesen Syndecan-4 als Interaktionspartner bzw. Ligand für EGF B2 und B3 nach, welcher in Kolonkarzinomen zu vermehrter Lebermetastasierung führt. Sutton et al.<sup>(166)</sup> konnten zeigen, dass die Zellmigration und Infiltration einer Leberzellkarzinomreihe durch den Stromal cell-derived factor-1 induziert wird und dessen Expression Syndecan-4-abhängig ist.

Eine erhöhte Metastasierungsneigung von malignen Melanomen wird ebenfalls durch eine erhöhte Syndecan-4-Konzentration und dessen Aktivierung von Wnt5A getriggert<sup>(136)</sup>. Studien zu Seminomen des Hodens stellen die Rolle von Syndecan-4 bei Angiogenese, Zellmigration und Tumorwachstum heraus<sup>(170)</sup>.

## 2. FRAGESTELLUNG

In einer Reihe maligner Tumoren, wie beispielsweise im Mamma-, Kolon- oder hepatozellulären Karzinom und auch im malignen Melanom, konnte eine vermehrte Syndecan-4-Expression gezeigt werden. Syndecan-4 ist in die Signalkaskaden der Zellmigration, Zell-Zell-Interaktion und Angiogenese involviert und könnte über diese Prozesse, wie schon in anderen Karzinomen beschrieben, die Progression des Magenkarzinoms entscheidend beeinflussen.

Ziel der Arbeit ist:

- ▶ die immunhistochemische Darstellung und Beschreibung der Syndecan-4-Expression im Magenkarzinom
- ▶ die Validierung der immunhistochemischen Ergebnisse durch Analyse der Syndecan-4-Protein und -RNA-Konzentration
- ▶ der Vergleich der Syndecan-4-Expression zwischen Tumorzentrum und Invasionsfront
- ▶ die Korrelation der Syndecan-4-Expression mit morphologischen Faktoren der Invasionsfront
- ▶ die Korrelation der Ergebnisse mit klinisch-pathologischen Faktoren und dem Überleben

Hierdurch soll die Rolle von Syndecan-4 im Magenkarzinom - insbesondere sein Einfluss auf die lokale Invasion und die klinische Prognose - genauer untersucht werden.

### **3. Material und Methoden**

#### **3.1 Material**

##### **3.1.1 Untersuchungskollektiv**

Das Kollektiv umfasste insgesamt 161 Patienten, bei denen zwischen 1997 und 2009 ein Magenkarzinom diagnostiziert wurde. 151 dieser Patienten wurden in der Klinik für Viszeralchirurgie der Universität Magdeburg operiert und 10 Patienten in der chirurgischen Abteilung des Medigreif-Klinikum Burg.

Die patientenbezogenen Daten wurden aus Krankenakten, histopathologischen Befunden und Arztbriefen der Viszeralchirurgie des Uniklinikums, der chirurgischen Abteilung des Klinikum Burg und des Institutes für Pathologie der Universität Magdeburg in Zusammenarbeit mit Herrn Eugen Bellon, einem weiteren Medizindoktoranden, zusammengetragen. Dokumentiert wurden Geschlecht, Alter, Größe und Gewicht des Patienten, sowie die klinische Diagnose, das präoperative Tumorstadium, der pathohistologische Befund, das operative Procedere (partielle/komplette Gastrektomie etc.) und eine eventuelle postoperative Therapie. Durch Durchsicht des ambulanten Patientendokumentationssystems MEDICO und durch postalische Kontaktierung der Hausärzte wurde das Follow-up der Patienten im Abstand von 3 Monaten kontinuierlich aktualisiert und Daten zum Auftreten einer metachronen Metastase, eines Lokalrezidives oder zum Tod des Patienten erfasst.

Das schriftliche Einverständnis aller Patienten für die Erhebung der patienten- und befundbezogenen Daten sowie für die Gewebeasservierung für wissenschaftliche Untersuchungen wurde vom Operateur im Rahmen der präoperativen Aufklärung eingeholt und ist in den Patientenakten der viszeralchirurgischen Kliniken hinterlegt. Die Entnahme, Asservierung und Verwendung von Gewebe für wissenschaftliche Studien wurde im Rahmen eines Antrages für die Erstellung einer Proben-, Blut-, Stuhl- und Datenbank bei chirurgisch relevanten Karzinomen einschließlich gastrointestinaler Karzinome von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät Magdeburg genehmigt (Ethikvotum Nr. 33/2001).

### **3.1.2 Charakterisierung der Magenkarzinome**

#### **3.1.2.1 Tumorlokalisation**

Die Zuordnung der Lokalisation erfolgte entsprechend der WHO in Cardia, Fundus, Corpus, Antrum und Pylorus. Des Weiteren wurden Cardia, Fundus und Corpus zum proximalen Abschnitt und Antrum und Pylorus zum distalen Abschnitt zusammengefasst.

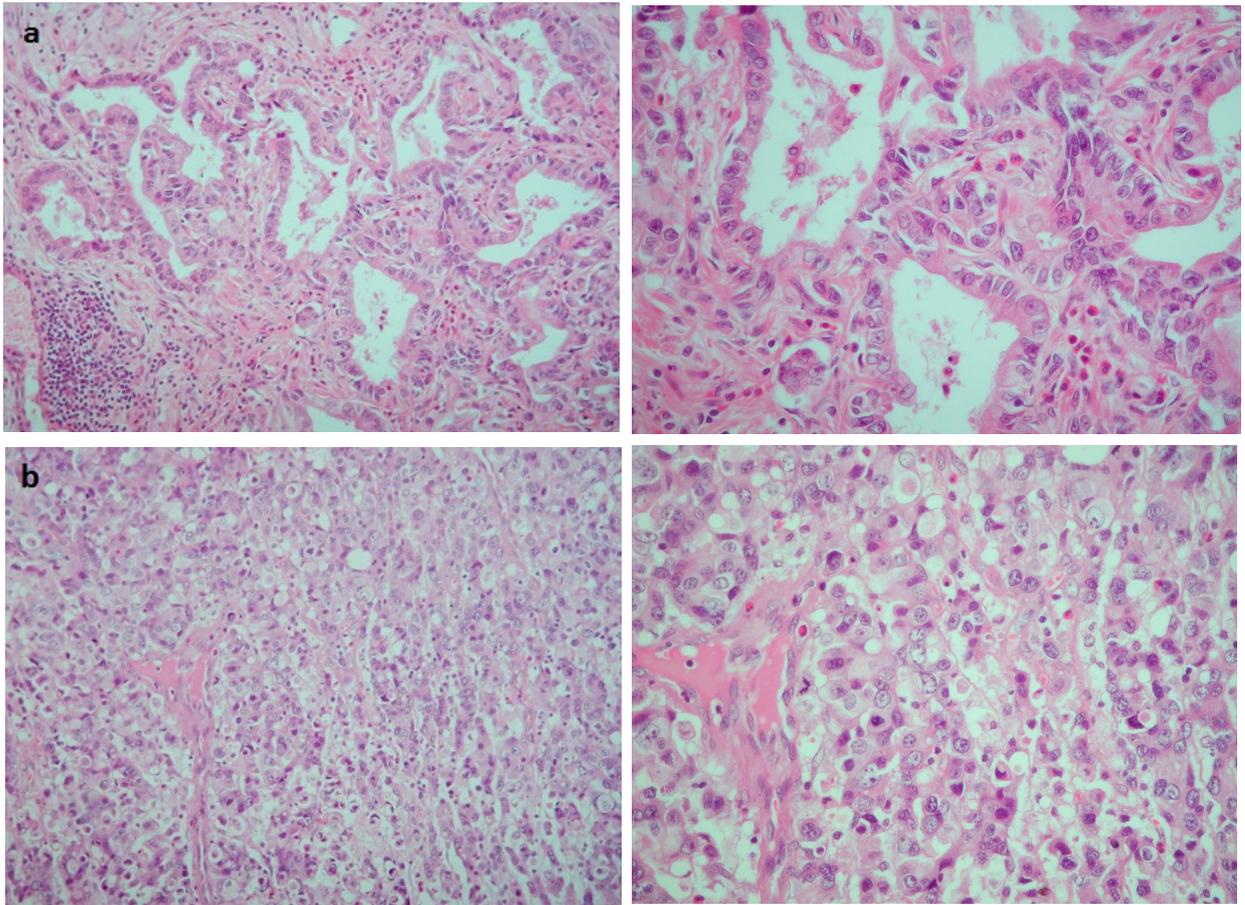
#### **3.1.2.2 Tumorklassifikation**

Die einheitliche Reklassifizierung der Tumorstadien erfolgte entsprechend der siebten Auflage der UICC (p)TNM-Klassifikation für Magenkarzinome (2010).

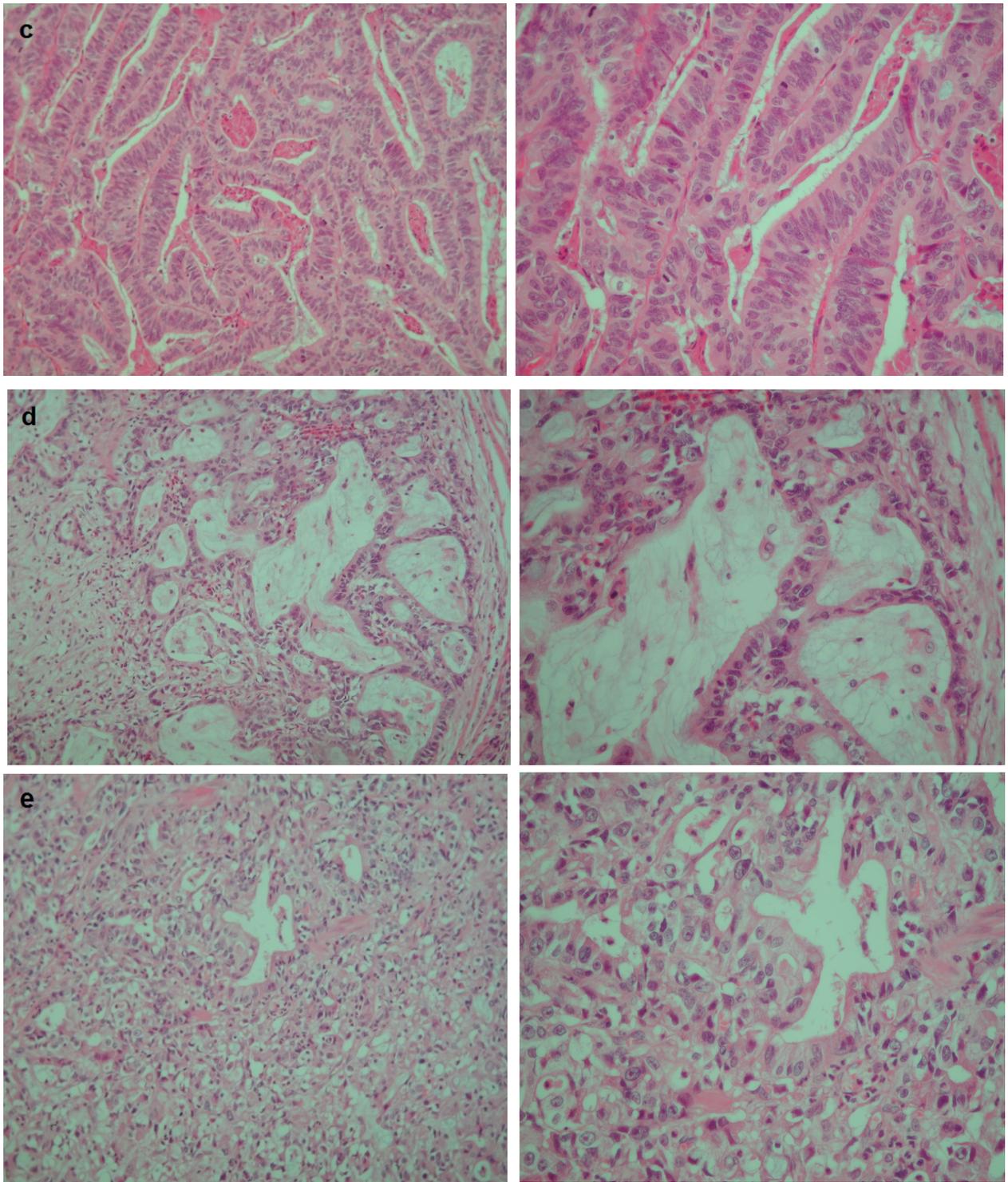
Die histologisch aufgearbeiteten Präparate wurden hierbei hinsichtlich ihrer lokalen Infiltrationstiefe (T), des Lymphknotenbefalls (N), des Auftretens von Fernmetastasen (M), einer Venen (V)- oder Lymphgefäß (L)-Infiltration und der Resektatränder (R) von einem Pathologen (PD Dr. D. Jechorek) des Institutes beurteilt.

#### **3.1.2.3 Histologie und Grading**

Im Rahmen der histologischen Beurteilung durch einen Pathologen (PD Dr. D. Jechorek) erfolgte die Einteilung der Tumore entsprechend des Differenzierungsgrads der Zellen in gut differenzierte (G1), mäßig differenzierte (G2) und gering differenzierte (G3) Karzinome. Des Weiteren erfolgte eine Klassifikation nach Laurén (Abb. 3.1.3.3a/b). Bei den im Kollektiv berücksichtigten Fällen handelt es sich histologisch ausschließlich um primäre Adenokarzinome. Undifferenzierte Karzinome (G4) wurden ausgeschlossen.



**Abbildung 3.1.2.3a/b : Adenokarzinom des Magens vom intestinalen Typ (G2) (a) und diffusen Typ (b), x100, x200, HE**



**Abbildung 3.1.2.3 c/d/e:** Adenokarzinom des Magens mit c) guter Differenzierung (G1), d) mäßiger Differenzierung (G2) und e) schlechter Differenzierung (G3), x100, x200, HE

### 3.1.2.4 Klassifikation der Invasionsfront

Die Klassifikation der Invasionsfront erfolgte durch einen Pathologen (PD Dr. D. Jechorek) am H&E-gefärbten Schnittpräparat mit repräsentativen Anteilen der Invasionsfront und orientierten sich an vorgeschlagen Prognosekriterien für die Beurteilung kolorektaler Karzinome: Der **Invasionstyp** beschreibt das Infiltrationsmuster der Tumorzellen der Invasionsfront in das angrenzende Gewebe<sup>(89)</sup>. Demnach wird ein *expansiver Typ* für verdrängende, glatt umschriebene Invasionsmuster von einem *infiltrativen Typ* bei diffusem bzw. strahlenartigem Ausbreitungsmuster unterschieden. Die Evaluierung des **budding-Types** wurde nach den Kriterien von Morodomi et al.<sup>(128)</sup> durchgeführt, wobei *budding-positiv* als Vorhandensein von isolierten oder aus maximal 5 Tumorzellen bestehender Cluster eingebettet in Stroma der Invasionsfront definiert ist. *Budding-negative* Karzinome weisen diese Phänomen nicht auf. Weiteren wurde die Dichte der peritumoralen Infiltration durch **Lymphozyten** an der Invasionsfront ermittelt. Bei Vorliegen von mäßig dichten bis bandartigen Lymphozytenansammlungen wurden die Karzinome als Lymphozyten-positiv und bei Vorhandensein von nur einzelnen Lymphozyten bzw. Gruppen von <10Lymphozyten/HPF als Lymphozyten-negativ bezeichnet.

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Humane Gewebeproben

#### 3.2.1.1 Materialgewinnung, Fixierung und Einbettung

Nach chirurgischer Entfernung wurde das Magenresektat auf Crash-Eis an das pathologische Institut der Universität Magdeburg gesandt und dort innerhalb von 20min von einem Pathologen des Institutes bearbeitet. Es wurden für molekulare Analysen repräsentative Proben aus dem Tumor als auch aus makroskopisch tumorfreien Anteilen entnommen und bei -80°C schockgefroren. Präparate von Patienten nach neoadjuvanter Chemotherapie, oder einer Ischämiezeit über 20min wurden ausgeschlossen. Darüber hinaus wurden von Karzinomen mit einem Durchmesser unter 15mm kein Frischgewebe entnommen. Ein Tumorzellgehalt von mindestens 50% der kryoasservierten Proben wurde einmalig mittels Hämatoxilin-Eosin-gefärbtem Kryoschnitt im Rahmen vorausgegangener Studien sichergestellt.

Weiteres Tumor- und Nichttumorgewebe für die diagnostische Routine- und immunhistochemische Untersuchungen wurde mittels einer 4%igen Formalinlösung fixiert, mittels Äthylalkohol und Xylol in aufsteigender Konzentration entwässert und anschließend in Paraffin eingebettet. Diese Paraffinblöcke dienten sowohl der Herstellung der Tissue Microarrays als auch transmuraler Schnittpräparate.

Für die histochemischen und immunhistochemischen Färbungen wurden Schnitte von 3µm Dicke angefertigt (Mikrotom RM 2155, Leica Instruments GmbH, Nussloch, Deutschland). Die standardisierte Hämatoxylin-Eosin-(H&E)-Färbung diente als Übersichtsfärbung.

### **3.2.1.2 Herstellung der Tissue-Microarrays**

Die Verwendung der Tissue Microarray-Technik ermöglichte es, simultan Gewebeproben von verschiedenen Patienten hinsichtlich ihrer Proteinexpression zu untersuchen. Darüber hinaus lassen sich durch die Konzentration von mehreren Tumoren auf einen Paraffinblock und damit verbunden die gemeinsame Färbung, Unregelmäßigkeiten in der Farbintensität der einzelnen Proben reduzieren und technische Ressourcen einsparen<sup>(19,40,100)</sup>.

Für alle Karzinome wurden repräsentative Regionen ausschließlich des Tumorzentrums und je nach Tumorlokalisation der korrespondierenden, unauffälligen Antrum- oder Corpusschleimhaut entnommen und zu Tissue Microarrays zusammengeführt. Um eine mögliche morphologische Heterogenität auszugleichen, wurden jeweils vier Stenzen pro Probe entnommen.

Zur Herstellung der Microarrays wurde zunächst von den einzelnen Paraffinblöcken H&E-gefärbte Schnittpräparat für die Identifizierung und Entnahme der gewünschten Gewebeareale angefertigt.. Um einen Startpunkt zu markieren, wurden unter Verwendung eines Manual-Tissue-Arrayers (MTA Booster®, Version 1.01, Firma Alphelys, Plaisir, Frankreich) zunächst 5 Stenzen Plazentagewebe in den Akzeptorblock eingesetzt. Anschließend wurden jeweils 4 Gewebiszylinder pro Donorblock mit einem Durchmesser von 0,8mm entnommen und anhand genau definierter Koordinaten in den präparierten Akzeptorblock überführt (Akzeptorblock: 25mm x 17mm, 0,1mm Abstand, max. 15 x 10 Stenzen). Die Reihenfolge der Stenzen wurde tabellarisch dokumentiert. Das Erhitzen des entstandenen TMA-Blocks auf 60°C diente der Einbindung der Stenzen im Paraffin des Akzeptorblocks. Mittels Mikrotom (RM 2155, Leica Instruments GmbH, Nussloch, Deutschland) wurden 3µm dicke Schnitte der

fertigen Tissue Micro-Array-Blöcke angefertigt und die Gewebequalität durch eine H&E-Färbung und anschließendes Mikroskopieren überprüft.

### **3.2.1.3 Immunhistochemische Färbung**

Die immunhistochemische Detektion der Syndecan-4-Expression erfolgte an 3µm-dicken Paraffinschnitten. Nach Trocknung über Nacht (60°C), Entparaffinierung in einer absteigenden Alkoholreihe (3x 100%, 2x 96% und 1x 75% Xylol) und zweifacher Wässerung der Schnitte erfolgte das weitere Procedere unter standardisierten Automatenbedingungen im NexES® Immunostainer (Ventana, Tucson, USA). Nach 4minütiger Vorbehandlung mit einem Peroxidase-Blocker (iVIEW®-INHIBITOR, Ventana) und Waschung wurde der Syndecan-4-Antikörper (sc-15350, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland) in einer Verdünnung von 1:50 aufgetragen. Weitere Schritte beinhalten das Blocken von endogenem Biotin (iVIEW®-BLOCKER, Ventana), das Auftragen von iVIEW-BIOTIN Ig und die Inkubation für acht Minuten. Die Färbreaktion wird durch Hinzugabe von iVIEW Diamino-Benzidin (iVIEW®-DAB) und dem Farbverstärker iVIEW®-COPPER (beides Ventana) erreicht. Anschließend wurden die Präparate unter fließendem Wasser mit Spülmittel gewaschen und die Kerngegenfärbung mit Hämatoxylin nach Mayer durchgeführt.

Vor der Eindeckung der Schnitte mit Canada-Balsam wurden diese erneut in einer aufsteigenden Alkoholreihe mit Xylol entwässert. Das Ergebnis der Färbung wurde durch einen mitgeführten Schnitt von nichttumorösem Lebergewebe als Positivkontrolle validiert.

### **3.2.1.4 Beurteilung der Ergebnisse der immunhistochemischen Reaktion**

Die Beurteilung der immunhistochemischen Reaktion gegen Syndecan-4 erfolgte bei 100-facher bis 400-facher Vergrößerung (Axioskop 50, Zeiss, Germany).

Ausgewertet wurde sowohl die zytoplasmatische Expression als auch das Muster der membranösen Syndecan-4-Expression in der Epithel- bzw. Tumorzellen der Karzinom- und Nichttumorpräparate. Für die zytoplasmatische Expression wurde die Intensität der Färbung (SI) und die Anzahl immunpositiver Epithelzellen entsprechend dem von Remmele et al.<sup>(147)</sup> etablierten Immunreaktiven Score bewertet. Die Skalierung der Farbintensität umfasste die Werte 0 bis 3, wobei 0 keine Färbreaktion, 1 schwache Färbreaktion, 2 mäßige Färbreaktion und 3 starke Färbreaktion darstellte. Die Einteilung der Anzahl gefärbter Zellen reichte von 1 bis 10 wobei der prozentuale Anteil

immunpositiver Zellen an der Gesamtzahl epithelialer Zellen in 10% Schritten erfolgte (z.B. 5 = 50% der Zellen waren immunpositiv). Sowohl die Farbintensität als auch der prozentuale Anteil immunpositiver Zellen wurde für jede der 4 Stenzen eines Falls bestimmt und anschließend der jeweilige Mittelwert gebildet. Aus diesem wurde der immunreaktive Score ( $IRS = SI \times PP$ ) berechnet. Die Membranfärbung (M) wurde in Anlehnung an die Empfehlungen zur Interpretation der membranösen Expression von EGFR, erstmals beschrieben durch Atkins D et al.<sup>(2)</sup> und empfohlen im Interpretation Manual for EGFR pharmDx™ von DakoCytomation, wie folgt bewertet 0 = negative, 1 = schwache inkomplette, 2 = schwache bis mäßiggradig komplette oder 3 = starke komplette membranöse Färbung beurteilt. Basierend auf vorausgegangen Studien zum kolorektalen Karzinom<sup>(90)</sup> erfolgte für die statistischen Betrachtungen zusätzlich eine Addition von zytoplasmatischem und membranösen Score zu einem Gesamtscore ( $gIRS = IRS + M$ ), wobei je Fall ein Maximalwert von 33 erreicht werden konnte. In den transmuralen Schnittpräparaten wurden drei repräsentative Areale der Invasionsfront und drei repräsentative Areale des Tumorzentrums ausgewertet, deren Mittelwert der Bestimmung des IRS diene.

### **3.2.2 Nachweis von Syndecan-4-RNA**

In 28 Magenkarzinomproben wurde die Syndecan-4-RNA mittels peqGOLD TriFast™ (peqlab, Erlangen) nach Angaben des Herstellers extrahiert, anschließend mit einer Reversen-Transkriptase (RT) in cDNA umgeschrieben und per Light Cycler™ (Roche, Darmstadt) in der quantitativen PCR vervielfältigt. Es wurden ausschließlich RNase-freie Plastikwaren und Lösungen eingesetzt. Als Positivkontrolle wurde die Zelllinie eines hepatozellulären Karzinoms (Hep G2, ATCC® HB-8065™, ATCC LGC Standards, Wesel) mitgeführt. Diese Zelllinie wird von den Herstellern von Syndecan-4-Antikörpern als Kontrolle empfohlen, da sie für eine hohe Syndecan-4-Expression bekannt ist.

#### **3.2.2.1 RNA-Präparation aus Frischgewebe**

Die RNA-Präparation besteht aus folgenden 5 Schritten:

Homogenisierung, Phasentrennung, RNA-Fällung, Waschen der RNA und Lösen der RNA.

Zunächst wurden aus den kryoasservierten Gewebeproben etwa 50-100mg entnommen, in ein mit 1ml Trifast™ (peqlab) und Keramikkügelchen gefülltes Schraubdeckelgefäß (2ml, Precellys Keramik-Kit 1,4mm, peqlab) gegeben und drei mal

bei 6500 Umdrehungen für 2x20 Sekunden homogenisiert (Precellys 24® Homogenisator, Peqlab).

Durch Inkubation der Proben über 5 Minuten bei Raumtemperatur wurde die Dissoziation der Nukleotidkomplexe gewährleistet.

Anschließend wurden 0,2ml Chloroform hinzugegeben und das Tube 15 Sekunden gut geschüttelt. Nach einer weiteren Inkubation von 3-10min bei Raumtemperatur wurden die Proben für 10min bei 12000 x g zentrifugiert (Heraeus, Megafuge), was zur Phasenaufftrennung führte. DNA und Proteine finden sich in der Inter- und Phenolphase, während RNA ausschließlich in der farblosen oberen Phase vorkommt. Letztere wurde anschließend in ein 1,5ml Tube überführt und zwecks Präzipitation der RNA 0,5ml Isopropanol hinzugegeben. Die Proben wurden daraufhin gemischt, für 5-15min bei Raumtemperatur inkubiert und für 10min bei 14000 x g und 4°C zentrifugiert. Das hierdurch entstandene Pellet wurde mit 1ml 80%-igem Ethanol gewaschen und nochmals für 10min bei 14000 x g und 4°C zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt.

Nachdem das Pellet 30min bei Raumtemperatur getrocknet war, konnte es je nach Größe in 50-300µl Diethylpyrocarbonat (DEPC)-Wasser gelöst werden. DEPC inaktiviert die RNasen, indem es mit Histidinresten Bindungen eingeht. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

### **3.2.2.2 RNA-Quantifizierung**

Die RNA-Konzentration wurde photometrisch bei einer Absorption von 260nm mittels Bio-Photometer (Eppendorf, Hamburg) gemessen. Die Reinheit wurde durch den Quotienten der Absorptionsspektren (Mindestanforderung:  $A_{260}:A_{280} >2$ ) bestimmt. Als Referenzwert und zur Einstellung der Endkonzentration wurde DEPC-H<sub>2</sub>O eingesetzt. Nach Eichung des Photometers wurden jeweils 1µl der Proben mit DEPC-Wasser auf ein Volumen von 70µl aufgefüllt und in die Quarzküvette pipettiert. Die ermittelten Konzentrationen wurden anschließend mit dem Faktor 70 multipliziert.

### **3.2.2.3 Reverse Transkription von RNA**

Bei der Reversen Transkription (RT) wird RNA mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben (Roche, Mannheim). Der Reaktionsansatz war wie folgte: 4µl 5x Reaktionspuffer, 0,5µl RNase Inhibitor, 2µl dNTP Mix, 1µl DTT, 1,1µl Transcriptor High Fidelity Reverse Transcriptase, 1µl oligo(dt)<sub>18</sub> –Primer, 2µg RNA und

20µl DEPC-H<sub>2</sub>O, RNA und Oligo(dt)<sub>18</sub>-Primer wurden bei 65°C für 10min inkubiert, anschließend auf Eis abgekühlt und der restliche Reaktionsansatz hinzu pipettiert. Danach wurden die Proben für etwa 30min bei 45°C-55°C erneut inkubiert und die Reverse Transkriptase durch fünfminütiges Erhitzen auf 85°C inaktiviert. Die cDNA kann bei -15°C bis -25°C gelagert oder sofort in die PCR eingesetzt werden.

### 3.2.2.4 Quantitative real-time-PCR am LightCycler™

Der verwendete Light Cycler™ ist mit einem Micro-Fluorimeter kombiniert. Durch den Einbau eines Fluorophores in das PCR-Produkt und Fluoreszenz-Monitoring konnte die Quantifizierung und Analyse der Ergebnisse bei laufender Amplifikation erfolgen (real-time-PCR). Das hier verwendete Fluorophor SYBR-Green I baut während der Amplifikation sequenzunabhängig einen interkalierenden Farbstoff in die dsDNA des PCR-Produkts ein.

Das Fluoreszenz-Signal von SYBR-Green I steigt proportional zur Menge des PCR-Produkts und wurde bei 530nm gemessen. Eine folgende Schmelzkurvenanalyse und die exakte Schmelzpunktbestimmung dienen der Charakterisierung des PCR-Produkts. Der Reaktionsansatz bestand aus: 4µl 5x SYBR Green I Mastermix (Bioline/Luckenwalde), 1µl sense Primer, 1µl anti-sense Primer, 4µl cDNA und 12µl dH<sub>2</sub>O.

Folgende Primer wurden verwendet:

SYN 4: ss 5'-CGGGCAGGAATCTGATGACTTTGA-3'  
 as 5'-GCTTCACGCGTAGAACTCATTGGT-3'  
 18s rRNA: ss 5'-CGGCTACCACATCCAAGG-3'  
 as 5'- GCTGGAATTACCGCGGCT-3'

Für die Syndecan-4- und 18s rRNA-Primer wurde folgendes Programm gewählt:

Prädenaturierung:		600sec	95°C	20°C/sec
Amplifikation:	Segment 1	15sec	95°C	20°C/sec
35 Zyklen	Segment 2	15sec	52°C	20°C/sec
	Segment 3	4sec	72°C	20°C/sec
Schmelzkurve:	Segment 1	0sec	95°C	20°C/sec
	Segment 2	10sec	65°C	20°C/sec
	Segment 3	0sec	99°C	0,2°C/sec
Abkühlen:		60sec	40°C	20°C/sec

Zur Quantifizierung der cDNA-Moleküle der einzelnen Proben wurde eine Standardverdünnungsreihe mit bekannter Konzentration der DNA-Moleküle eingesetzt. Um den spezifischen Standard herzustellen, wurde vorab das zu analysierende PCR-Fragment in einem geeigneten Plasmidvektor (Invitrogen) kloniert. Darüber hinaus wurden bei jedem Lauf 1-3 Standardverdünnungsstufen mit amplifiziert und eine Standardkurve erstellt.

Der Vergleich der RNA-Mengen untereinander erfolgte durch die Amplifikation eines housekeeping-Gens (18s rRNA) im Parallelansatz und dem Quotienten aus zu analysierenden cDNA-Molekülen und der Anzahl der housekeeping-Gen-Moleküle.

### **3.2.2.5 Gelelektrophorese**

Für die Herstellung der 1%-igen Agarosegele wurde die Agarose abgewogen, mit 1x TBE-Puffer ((5x TBE (pH 8,3): 54g Tris Base; 27,5g Borsäure (Na-Salz); 20ml 0,5M EDTA; ad 1l dH<sub>2</sub>O)) versetzt und bis zur vollständigen Lösung in der Mikrowelle erhitzt. Anschließend wurde das Gemisch unter kaltem Wasser abgekühlt, 5µl GelRed Nucleid Acid Gel Stain (Biotium/Hayward, USA) hinzugegeben und in die vorbereiteten Plastikgelträger mit Kamm gegossen. Nach Polymerisation des Gels und Entfernen des Kamms wurden die Elektrophoresekammern mit 1xTBE-Laufpuffer gefüllt. Im Anschluss wurden die Magenkarzinomproben mit 5µl Probenpuffer (5x DNA Loading Buffer, Bioline) versetzt und aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte für 60min bei 50 Volt. Das Ergebnis wurde unter UV-Licht fotografisch dokumentiert.

### **3.2.3 Nachweis von Syndecan-4-Protein**

Der Nachweis von Syndecan-4 Protein erfolgte an 28 repräsentativen Proben des Magenkarzinomkollektives mittels ELISAs (IBL, Human Syndecan-4 Assay Kit). Als Positivkontrolle wurde die Hep G2-Zelllinie, die eine hohe Syndecan-4-Expression aufweist, mitgeführt (Hep G2, ATCC® HB-8065TM, ATCC LGC Standards, Wesel).

#### **3.2.3.1 Präparation aus Frischgewebe**

Aus den 28 ausgewählten Magenkarzinomen wurden kryoasservierte Gewebstücke von jeweils 50-100mg entnommen, in ein Schraubdeckelgefäß mit Keramikkügelchen (2ml, Precellys Keramik-Kit 1,4mm, peqLab) gegeben, mit 500µl Lysispuffer aufgegossen und 3x bei 6500 U/min 2x20sec homogenisiert (Precellys®24 Homogenisator, Bertin Technologies, Frankreich).

Der Lysispuffer bestand aus (pro 50ml): 0,3g 50mM Tris HCL pH 8,0, 0,44g 150 mM NaCl, 0,02% Na azid, 0,05g 0,1% SDS, 500µl 1% Nonidet P-40, 0,25g 0,5% Na-deoxycholate. Anschließend wurden die Proben 20min auf Eis gekühlt, 3min bei 12.000g und 4°C zentrifugiert und der Überstand in ein 2ml Tube abpipettiert.

### **3.2.3.2 Quantifizierung mittels Photometer**

Die Quantifizierung des Syndecan-4-Proteins erfolgte mit dem DC Protein Assay (Biorad, München).

Zunächst wurde eine Standardreihe angesetzt in welcher 1µl, 2,5µl, 5µl, 10µl, 15 µl, 20µl, 30µl BSA (10mg/ml) auf 100µl mit Wasser verdünnt wurde um eine Lösung mit steigender BSA-Konzentration zu erhalten. Das erste Tube enthielt 100µl reines Wasser und diente als Leerwert. Zur Herstellung des Reagenzgemisches wurden 20µl des Reagenz A mit 1000µl des Reagenz S gemischt. Jeweils 5µl der Standardreihe bzw. der Proben wurden als Doppelbestimmung in die Microtiterplattenwells gegeben. Anschließend wurden je 25µl des Reagenzgemisches (Reagenz A+S) und 200µl von Reagenz B (verdünntes Folinreagenz) zu den Proben und der Standardreihe pipettiert. Nach 15min Durchmischung der Proben bei Raumtemperatur wurde die Proteinkonzentration bei 750nm photometrisch bestimmt (Promega, GloMax-Multi Detection System, Mannheim).

### **3.2.3.3 Human Syndecan-4-ELISA**

Beim ELISA wird eine Kunststoffplatte mit einem spezifischen Antikörper gegen das nachzuweisende Protein (Capture Antibody, hier gegen Syndecan-4) beschichtet und anschließend die Proteinlösung dazu gegeben. Nicht gebundenes Protein wird abgewaschen und verbleibende freie Bindungsstellen mit Blockierungspuffer blockiert. Durch Zugabe eines Detektionsantikörpers und einer Substrat/Chromogen-Lösung erfolgt die Identifizierung des gebundenen Proteins und ein konzentrationsäquivalenter Farbumschlag. Die Konzentration des Proteins kann anschließend mit Hilfe eines Photometers anhand der Standardkurve berechnet werden.

Zur Bestimmung der Syndecan-4-Proteinkonzentration wurde das Human Syndecan-4 Assay Kit-IBL nach Angaben des Herstellers verwendet (Immuno-Biological Laboratories Co., Ltd., Japan):

Zunächst wurden 50ml Waschpuffer-Konzentrat (0,05% Tween20 in Phosphatpuffer) mit 1950ml deionisiertem Wasser gemischt. Die Antikörperlösung wurde aus 0,3ml

Antikörper-Konzentrat (Anti-Human-Syndecan-4 Kaninchen IgG) und 8,7ml Lösung (1%BSA, 0,05% Tween20 in PBS) hergestellt.

Für die Standardreihe wurden zunächst 0,5ml deionisiertes Wasser mit dem Human-Syndecan-4-Standard (Komponente 3) gemischt um 2560pg/ml humanen Syndecan-4 Standard zu erhalten. Anschließend wurden 8 Tubes mit je 230µl EIA-Puffer vorbereitet und in das erste der Tubes 230µl der Syndecan-4-Standardlösung gegeben um hier eine Konzentration von 1280 pg/ml zu erhalten. Aus jedem der Tubes 2 bis 7 wurden nun 230µl in das Nächste gegeben um die Konzentration an Syndecan-4 mit jedem Mal zu halbieren. Die abpipettierten 230µl aus Tube 7 wurden verworfen, da Tube 8 als Leerwert lediglich den EIA-Puffer enthalten sollte.

Die Vertiefungen der Kunststoffplatte wurden markiert, mit jeweils 100µl der 28 Magenkarzinomproben und der Standardreihe befüllt und anschließend bei 37°C für 60min inkubiert, um die Antikörper-Antigen-Reaktion zu initiieren. Nach der Inkubation wurde die Platte 7 mal mit Waschpuffer gewaschen. Die Taschen der Platte wurden anschließend mit jeweils 100µl der hergestellten Antikörperlösung versehen und erneut für 30min bei 4°C inkubiert. Nach 9 weiteren Waschzyklen wurden 100µl Chromogen-TMB-Lösung in die Taschen gegeben und bei Raumtemperatur in Dunkelheit für 30min inkubiert. Anschließend wurden je 100µl Stop-Lösung (1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) in die Vertiefungen pipettiert, woraufhin sich ein Farbumschlag von blau zu gelb einstellte.

Die Syndecan-4-Proteinkonzentration konnte nun mit Hilfe eines Photometers bei 450nm gegen den Leerwert berechnet werden.

### **3.2.4 Statistische Datenverarbeitung und Fotodokumentation**

Die statistische Datenauswertung erfolgte unter Anwendung des Standard-t-Tests und Paardifferenz-t-Tests für Mittelwertsunterschiede unabhängiger und abhängiger Stichproben, des exakten Tests nach Fischer und chi-Quadrat-Tests nach Pearson für Häufigkeitsverteilungen und der Kaplan-Meier-Analyse als Test der Überlebensfunktion. Um den Zusammenhang zwischen der Protein- und RNA-Expression von Syndecan-4 zu prüfen, wurde eine Korrelationsanalyse nach Pearson durchgeführt. Zur Definition eines optimalen cut-off Wertes / Schwellenwertes der Syndecan-4-Expression, der zwischen einer low risk und einer high risk Gruppe im postoperativen Verlauf diskriminieren konnte, wurden Analysen auf der Grundlage von Receiver Operating Characteristics (ROC)- Kurven durchgeführt.

Die statistische Analyse erfolgte mittels SPSS-Software (SPSS-Incorporation, Version 18.0 für Windows, Chicago, USA). Das Signifikanzniveau lag bei  $p < 0,05$ .

Zur Fotodokumentation diente das Lichtmikroskop Olympus BH2-RFCA (Olympus, Hamburg, Deutschland) in 100-, 200-, und 400- facher Vergrößerung mit aufgesetzter Kamera Typ Infinity 2-1C und Fotodokumentations-Software Infinty-Analyse (Lumenera Corporation, Ottawa, Kanada). Zur Nachbearbeitung der ausgewählten Fotos diente die Software Picasa 3 (GoogleSoftwares, Mountain View, USA) und Adobe Photoshop (Adobe Systems Incorporate, San Jose, USA).

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Klinisch-pathologische Daten des Untersuchungskollektivs

Das zugrunde gelegte Magenkarzinomkollektiv (n=161) bestand aus 111 männlichen (68,9 %) und 50 weiblichen (31,1%) Individuen mit einem Geschlechtsverhältnis von 2,2:1 (m:w).

Das Durchschnittsalter lag bei 66,9 Jahren (SD:  $\pm 11,95$ ), wobei der jüngste Patient zum Zeitpunkt der Operation 26 Jahre und der Älteste 93 Jahre waren. Das Durchschnittsalter der männlichen Patienten zeigte mit 66,6 Jahren (Umfang: 26-85, SD:  $\pm 12,13$ ) keinen signifikanten Unterschied zu dem der weiblichen Patienten mit 67,7 Jahren (Umfang: 38-93, SD:  $\pm 11,60$ ). In der 8. Lebensdekade war die Inzidenz der Magenkarzinome mit 59 erkrankten Personen (36,6%) am größten. In der 7. Lebensdekade erkrankten mit 51 Personen 30,4% des Kollektivs. 111 der untersuchten Magenkarzinome (69,8%) befanden sich im proximalen Abschnitt des Magens und 48 Karzinome im distalen Abschnitt (31,7%). Zum Zeitpunkt der Diagnose waren bei 56 Patienten (35,0%) bereits Fernmetastasen vorhanden. Die weiteren klinisch-pathologischen Daten des Kollektivs sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Das Kollektiv ist im Vergleich zu den aktuellen epidemiologischen Daten (siehe Einleitungskapitel) in Bezug auf Alter, Geschlecht, Tumorstadium und Überleben repräsentativ.

### 4.2 Prognoseparameter

#### 4.2.1 Klinisch-pathologische Prognoseparameter

97 (60,2%) der 161 Patienten verstarben im Untersuchungszeitraum, so dass das Follow-up für 64 Patienten zum Zeitpunkt der letzten Datenerhebung noch nicht abgeschlossen war. Die 1-, 3-, und 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit betrug in der durchschnittlichen Nachbeobachtungszeit von 26,2 Monaten (min-max 0,2-145 Monate) 58,7%, 42,1% und 31,8%. Die mittlere Überlebenszeit lag bei 14,1 Monaten (Median: 8,7).

Postoperativ trat bei zwei Patienten (1,2%) des Gesamtkollektivs ein Lokalrezidiv nach durchschnittlich 6,8 Monaten (min-max 1-12 Monate) auf.

Metachrone Metastasen wurden bei 25 der 161 Patienten durchschnittlich nach 12 Monaten (min-max 1-86 Monate) beobachtet, wobei 12 in der Leber, 6 im Peritoneum, 3 im Knochen, 2 in der Lunge, 1 im Cerebrum und 1 in der Haut lokalisiert waren.

Ein signifikant schlechteres **Gesamtüberleben** war assoziiert mit einem fortgeschrittenem Tumorstadium (UICC I/II vs. UICC III/IV), einer fortgeschrittenen

Tumorausdehnung (pT1/2 vs. pT3/4), Vorhandensein von Lymphknoten- oder Fernmetastasen (pN0 vs pN1/2, M0 vs. M1), Infiltration von Venen, Lymphgefäßen oder Perineuralscheiden (V0 vs. V1, L0 vs. L1, Pn0 vs. Pn1), sowie mit einem geringen Differenzierungsgrad (G1/2 vs. G3), dem diffusen Typ nach Laurén und einer proximalen Lokalisation (Tab.1). Das Alter und Geschlecht der Patienten korrelierte hingegen nicht mit dem Gesamtüberleben (Tab. 1).

Klinisch-pathologischer Faktor	n (%)	Überleben						
		1-Jahres Überleben (%)	3-Jahres Überleben (%)	5-Jahres Überleben (%)	Mittelwert	Standardfehler	95%-CI	P
<b>Alter</b>	<b>161</b>							
≤ 70 Jahre	85 (52,8)	66,5	42	37,1	60	7,68	44,9 – 75,0	0,120
> 70 Jahre	76 (47,2)	50,2	41,8	23,9	38	5,53	27,1 – 48,8	
<b>Geschlecht</b>	<b>161</b>							
Männlich	111 (68,9)	61	41,8	36,1	58	6,78	44,7– 71,3	0,66
Weiblich	50 (31,1)	53,7	42,8	25,7	40,1	6,52	27,9 – 53,4	
<b>Tumorausdehnung</b>	<b>159</b>							
pT1	22 (13,8)	100	94,4	82,6	127,3	11,5	104,8-150,0	< 0,001
pT2	68 (42,8)	71	55,7	36,8	52,86	6,5	40,1 – 65,6	
pT3	60 (37,7)	33,2	13,1	13,1	17,89	3,38	11,2 – 24,5	
pT4	9 (5,7)	44,4	22,2	11,1	16,77	5,65	5,7 – 27,8	
pT 1/2	90 (56,6)	78	65,1	48,1	79	7,99	63,3 – 94,7	
pT 3/4	69 (43,4)	34,7	14,5	12,4	18	3,1	11,9 – 24,0	
<b>LK-Metastasen</b>	<b>159</b>							
pN0	42 (26,4)	87,3	84,5	61,9	102,9	12,3	78,7- 127,0	< 0,001
pN1	54 (34,0)	68,9	46,7	40,8	44,8	5,4	34,2-55,3	
pN2	32 (20,1)	47,1	20,2	5,4	17,6	3,5	10,81-24,4	
pN3	31 (19,5)	13,5	3,4	0	6,9	1,3	4,5-9,3	
pN 0/1	96 (60,4)	76,8	62,3	50,5	80,7	7,7	65,7-95,7	
<b>Fernmetastasen</b>	<b>160</b>							
M0	104 (65,0)	72,9	58,1	44,5	75,9	7,4	61,5-90,4	< 0,001
M1	56 (35,0)	33,9	14,3	9,5	14	2,4	9,2-18,7	
<b>Veneninfiltration</b>	<b>161</b>							
V0	85 (52,8)	78,9	68,1	53,5	78	9,4	59,6-96,4	< 0,001
V1	76 (47,2)	36,5	13,6	8,2	13,9	1,9	10,1-17,6	
<b>Lymphgefäßinfiltration</b>	<b>161</b>							
L0	34 (21,1)	90,4	86,8	62,3	104,5	12,9	79,1-129,8	< 0,001
L1	127 (78,9)	50,9	31,3	24,4	32,5	3,6	25,4-39,6	
<b>Perineurale Karzinose</b>	<b>158</b>							
Pn0	71 (44,9)	75,6	62,6	46,1	78,6	9	60,9-96,3	< 0,001
Pn1	87 (55,1)	45,5	25,6	20,2	27,7	4	19,8-35,5	

Tumorstadium (UICC) 160								
Stadium I	38(23,8)	91,6	88,4	68,1	110,3	11,4	87,9-132,6	< 0,001
Stadium II	47(29,4)	77,3	57,3	43,6	51,7	5,98	39,9-63,4	
Stadium III	19(11,9)	28,2	5,6	0	10,7	1,99	6,8-14,6	
Stadium IV	56(35)	33,9	14,3	9,5	14	2,41	9,2-18,7	
Stadium I/II	85(53,1)	83,4	70,6	54	90,3	8,09	74,4-106,1	
Stadium III/IV	75(46,9)	32,6	12,2	8,1	13,5	1,97	9,6—17,3	
Grading (G) 161								
G1	7 (4,3)	68,6	51,4	51,4	54,2	21,2	12,6-95,7	0,001
G2	57 (35,4)	72,6	60,2	42,9	75,2	10,3	55,0-95,2	
G3	97 (60,3)	50,5	31,7	24	30,4	3,7	23,1-37,7	
Laurén-Typ 161								
intestinal	100(62,1)	64,8	47,8	36,2	55,6	7,7	40,6-70,6	0,13
diffus	34(21,2)	48,2	35,3	25,8	32,2	6,7	19,2-45,2	
Tumorklassifikation 159								
Proximal	111 (69,2)	55,6	37,8	29,1	49,41	6,4	36,8-61,9	0,12
Distal	48 (30,2)	64,3	52	36,4	45,11	5,92	33,5-56,7	
Invasionsfront 161								
<i>Invasionstyp</i>								
Expansiv	79 (49,1)	63,4	52,2	38,1	59,8	8,8	42,5-77,0	0,06
Infiltrativ	82 (50,9)	54,4	32,2	25,1	33	4,3	24,5-41,3	
<i>Budding-Typ</i>								
Negativ	72 (44,7)	69	55,2	39,7	63,24	9,1	45,3-81,1	0,01
Positiv	89 (55,3)	50,6	31,4	25,7	31,85	4,1	23,7-39,9	
<i>Lymphozyteninfiltration</i>								
Negativ	75(46,6)	52,2	31,5	25,9	32,5	4,8	23,1-41,9	0,03
Positiv	86(53,4)	64,3	51,2	36,6	64,7	7,9	49,3-80,1	

Tabelle 1: Klinisch-pathologische Überlebensdaten des Kollektivs

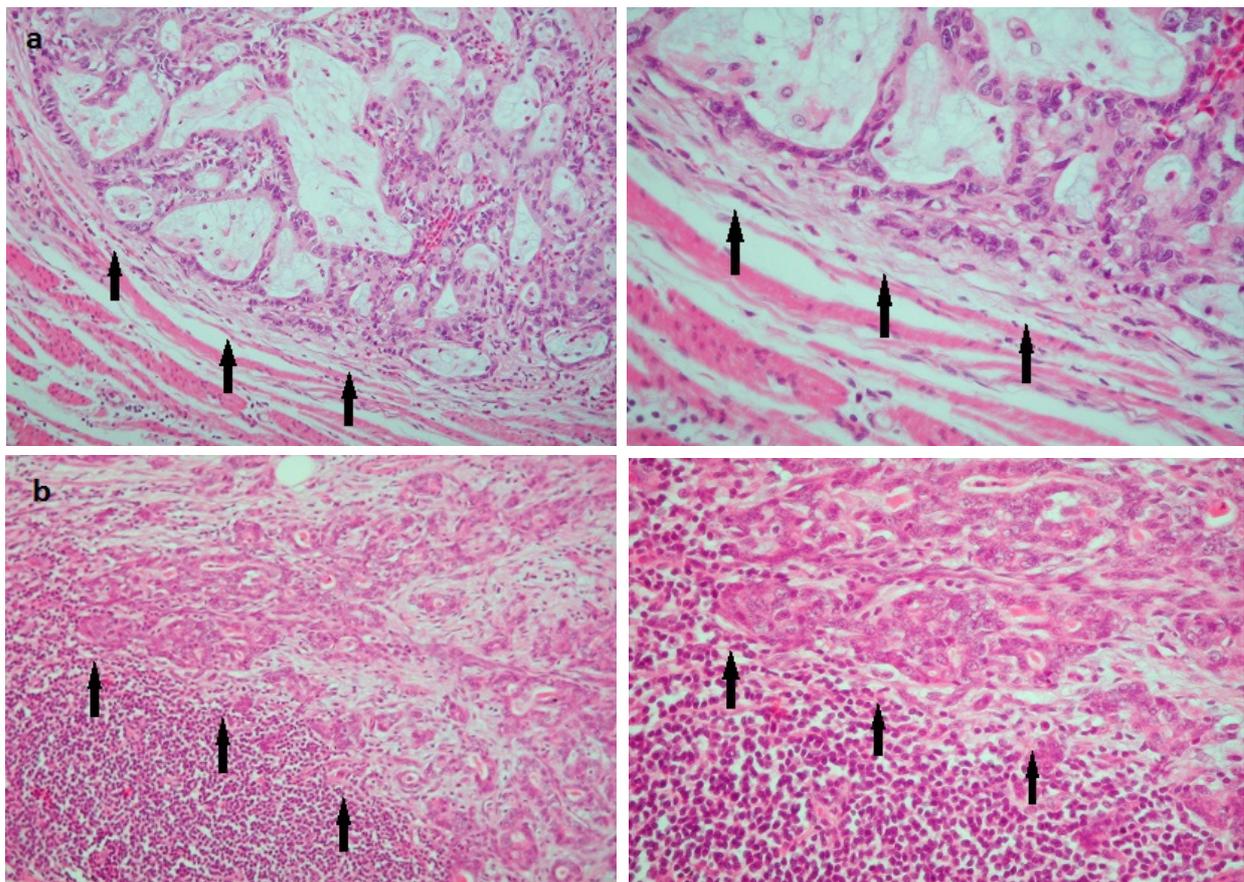
#### 4.2.2 Morphologische Prognoseparameter der Invasionsfront

Die Lymphozyteninfiltration der Invasionsfront, der Invasionstyp und das Tumorzellbudding wurden als mögliche Prognosefaktoren der Invasionsfront betrachtet (Tab.1). Die Abbildungen 4.2.2.a/b, 4.2.2.d/e und 4.2.2.g/h zeigen beispielhaft eine Lymphozyten-positive bzw. -negative Invasionsfront, die zwei Invasionstypen (infiltrativ und expansiv) und ein Karzinom mit positivem bzw. negativem Tumorzellbudding.

Bezüglich der **Lymphozyteninfiltration** der Invasionsfront war eine geringere Lymphozytendichte signifikant mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium nach UICC ( $p=0,004$ ), einem geringeren Differenzierungsgrad des Tumors ( $p=0,018$ ), dem Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen ( $p<0,001$ ), der Infiltration von Venen, Lymphgefäßen und Nerven ( $p=0,02$ ,  $p=0,001$ ,  $p<0,001$ ) und dem diffussem Typ nach Laurén assoziiert ( $p=0,016$ ) (Tab.1).

Eine weitere hochsignifikante Korrelation bestand zwischen einer geringen Lymphozyteninfiltration und einem infiltrativen Invasionsstyp bzw. dem Vorliegen von Tumorzellbudding ( $p < 0,001$ ).

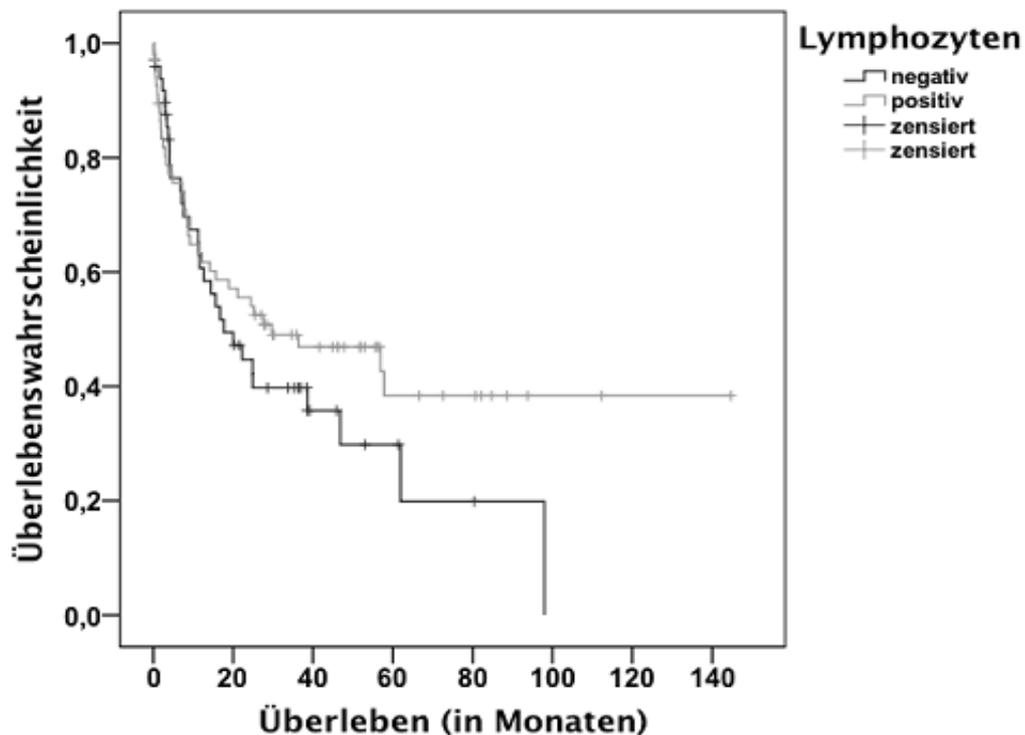
In der Überlebensanalyse nach Kaplan-Meier war eine hohe Lymphozytendichte der Invasionsfront mit einem besseren krankheitsfreien Überleben assoziiert (Abbildung 4.2.2.c). Die 1-, 3-, und 5- Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit betrug mit Infiltration 64,3%, 51,1% und 36,6% gegenüber 52,5%, 31,5% und 25,9% ohne Lymphozyteninfiltration ( $p = 0,027$ ) (Tab. 1, Abb. 4.2.2c).



**Abbildung 4.2.2.a/b :** Tumor ohne (a) und mit (b) Lymphozyteninfiltration der Invasionsfront (->) (100x, 200x, HE)

Klinisch-pathologischer Faktor	n (%)	Invasionstyp			Budding			Lymphozyteninfiltration		
		expansiv	infiltrativ	p	negativ	positiv	p	negativ	positiv	P
<b>Tumorausdehnung</b> 159										
pT1	22 (13,8)	14(17,9)	8(9,9)		14(19,7)	8(9,1)		5(6,8)	17(19,8)	0,11
pT2	68 (42,8)	35(44,9)	33(40,7)		33(46,5)	35(39,8)		32(43,8)	36(41,9)	
pT3	60 (37,7)	24(30,8)	36(44,4)	0,25	20(28,2)	40(45,5)	0,08	32(43,8)	28(32,6)	
pT4	9 (5,7)	5(6,4)	4(4,9)		4(5,6)	9(5,7)		4(5,5)	5(5,8)	
<b>Lymphknotenmetastasen</b> 159										
pN0	42 (26,4)	27(34,6)	15(18,5)		27(38)	15(17)		10(13,7)	32(37,2)	<0,001
pN1	54 (34,0)	25(32,1)	29(35,8)		22(31)	32(36,4)		22(30,1)	32(37,2)	
pN2	32 (20,1)	15(19,2)	17(21)	0,09	13(18,3)	19(21,6)	0,017	17(23,3)	15(17,4)	
pN3	31 (19,5)	11(14,1)	20(24,7)		9(12,7)	22(25)		24(32,9)	7(8,1)	
<b>Fernmetastasen</b> 160										
M0	104 (65)	53(67,9)	51(62,2)		52(73,2)	52(58,4)		44(59,5)	60(69,8)	0,17
M1	56 (35,0)	25(32,1)	31(37,8)	0,45	19(26,8)	37(41,6)	0,07	30(40,5)	26(30,2)	
<b>Veneninfiltration</b> 161										
V0	85 (52,8)	50(63,3)	35(42,7)		50(69,4)	35(39,3)		32(42,7)	53(61,6)	0,02
V1	76 (47,2)	29(36,7)	47(57,3)	0,009	22(30,6)	54(60,7)	<0,001	43(57,3)	33(38,4)	
<b>Lymphgefäßinfiltration</b> 161										
L0	34 (21,1)	25(31,6)	9(11)		25(34,7)	9(10,1)		7(9,3)	27(31,4)	0
L1	127 (78,9)	54(68,4)	73(89)	0,001	47(65,3)	80(89,9)	<0,001	68(90,7)	59(68,6)	
<b>Perineurale Karzinose</b> 158										
Pn0	71 (44,9)	53(68,8)	18(22,2)		53(75,7)	18(20,5)		18(24,7)	53(62,4)	<0,001
Pn1	87 (55,1)	24(31,2)	63(77,8)	<0,001	17(24,3)	70(79,5)	<0,001	55(73,3)	32(37,6)	
<b>Tumorstadium (UICC)</b> 160										
Stadium I	38(23,7)	23(29,5)	15(18,3)		23(32,4)	15(16,9)		10(13,5)	28(32,6)	0
Stadium II	47(29,4)	23(29,5)	24(29,3)		22(31)	25(28,1)		20(27)	27(31,4)	
Stadium III	19(11,9)	7(9)	12(14,6)	0,31	7(9,9)	12(13,5)	0,07	14(18,9)	5(5,8)	
Stadium IV	56(35)	25(32,1)	31(37,8)		19(26,8)	37(41,6)		30(40,5)	26(30,2)	
<b>Grading (G)</b> 161										
G1	7 (4,3)	5(6,3)	2(2,4)		6(8,3)	1(1,1)		4(5,3)	3(3,5)	0,02
G2	57 (35,4)	30(38)	27(32,9)		32(44,4)	25(28,1)		18(24)	39(45,3)	
G3	97 (60,2)	44(55,7)	53(64,6)	0,329	34(47,2)	63(70,8)	0,003	53(70,7)	44(51,2)	
<b>Laurén-Typ</b> 134										
intestinal	100(74,6)	54(84,4)	46(65,7)		53(88,3)	47(63,5)		37(63,8)	63(82,9)	0,016
diffus	34(25,4)	10(15,6)	24(34,3)	0,017	7(11,7)	27(36,5)	0,001	21(36,2)	13(17,1)	
<b>Invasionsfront</b> 161										
Invasionstyp										
0	79 (49,1)							20(26,7)	59(68,6)	<0,001
1	82 (50,9)							55(73,3)	27(31,4)	
Budding										
0	72 (44,7)	64(81)	8(9,8)					19(25,3)	53(61,6)	<0,001
1	89 (55,3)	15(19)	74(90,2)	<0,001				56(74,7)	33(38,4)	
Lymphozyten-infiltration										
0	75(46,6)	20(25,3)	55(67,1)		19(26,4)	56(62,9)				<0,001
1	86(53,4)	59(74,7)	27(32,9)	<0,001	53(73,6)	33(37,1)	<0,001			

**Tabelle 2: Klinisch-pathologische Daten und morphologische Parameter der Invasionsfront**



**Abbildung 4.2.2.c : Gesamtüberleben in Abhängigkeit von der Lymphozyteninfiltration**

Auch die beiden unterschiedlichen Typen der **Invasionsfront** zeigten Unterschiede im Gesamtüberleben. So liegt die Überlebenswahrscheinlichkeit bei expansiver Invasionsfront nach 1-, 3-, und 5 Jahren bei 63,4%, 52,2% und 38,1%, bei infiltrativer Invasionsfront hingegen bei nur 54,4%, 32,2% und 25,1% ( $p=0,06$ ) (Tab. 1, Abb. 4.2.2.f). Der infiltrative Invasionsstyp zeigt darüber hinaus signifikant häufiger eine Venen- und Lymphgefäßinfiltration sowie häufiger das Vorliegen einer perineuralen Karzinose als der expansive Typ ( $p=0,009$ ,  $p=0,001$ ,  $p<0,001$ ). Auch ist der infiltrative Typ hochsignifikant häufiger mit Budding und fehlender Lymphozyteninfiltration ( $p<0,001$ ) und tendenziell häufiger mit einer Lymphknotenmetastasierung ( $p=0,09$ ) assoziiert.

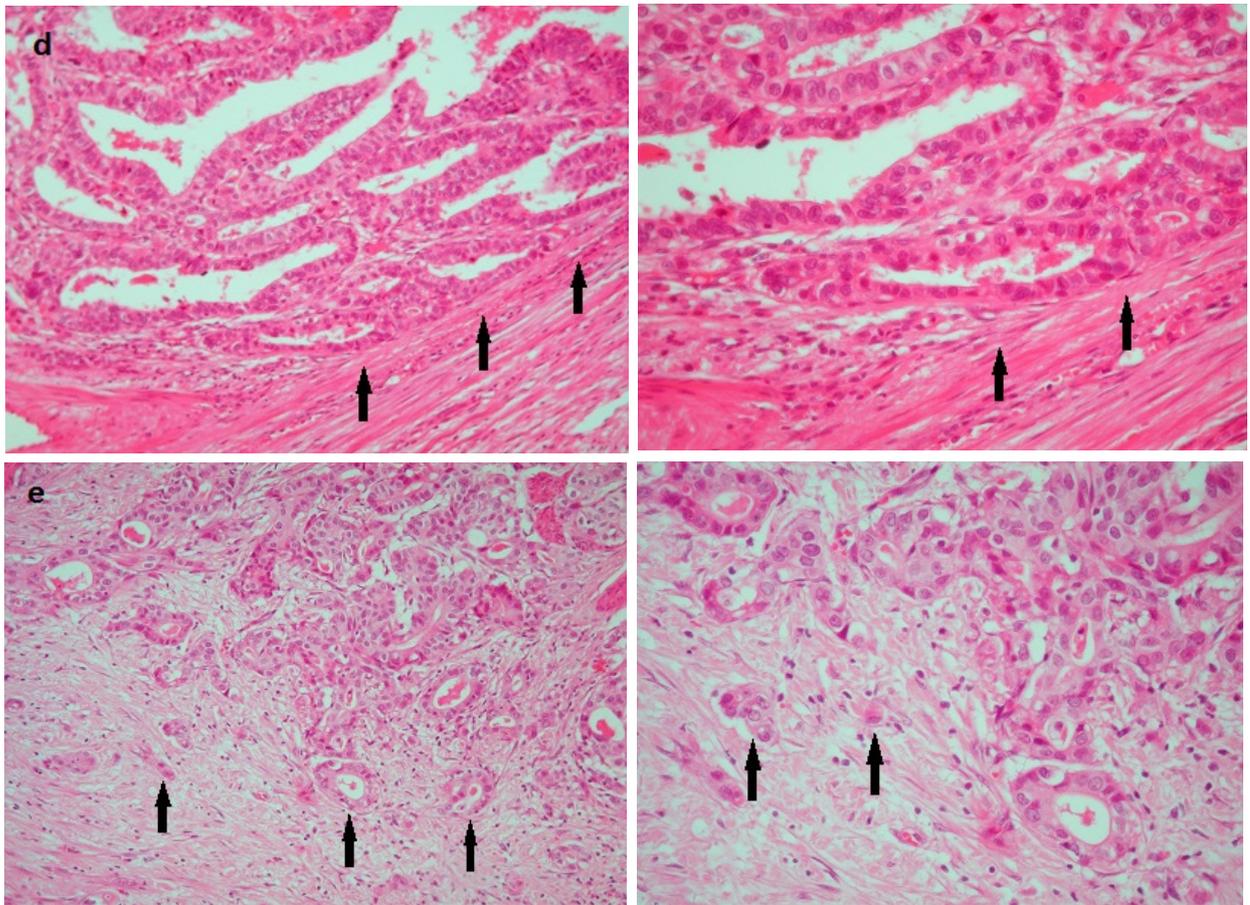


Abbildung 4.2.2.d/e: expansiver (d) und infiltrativer (e) Invasionstyp (100x,200x,HE)

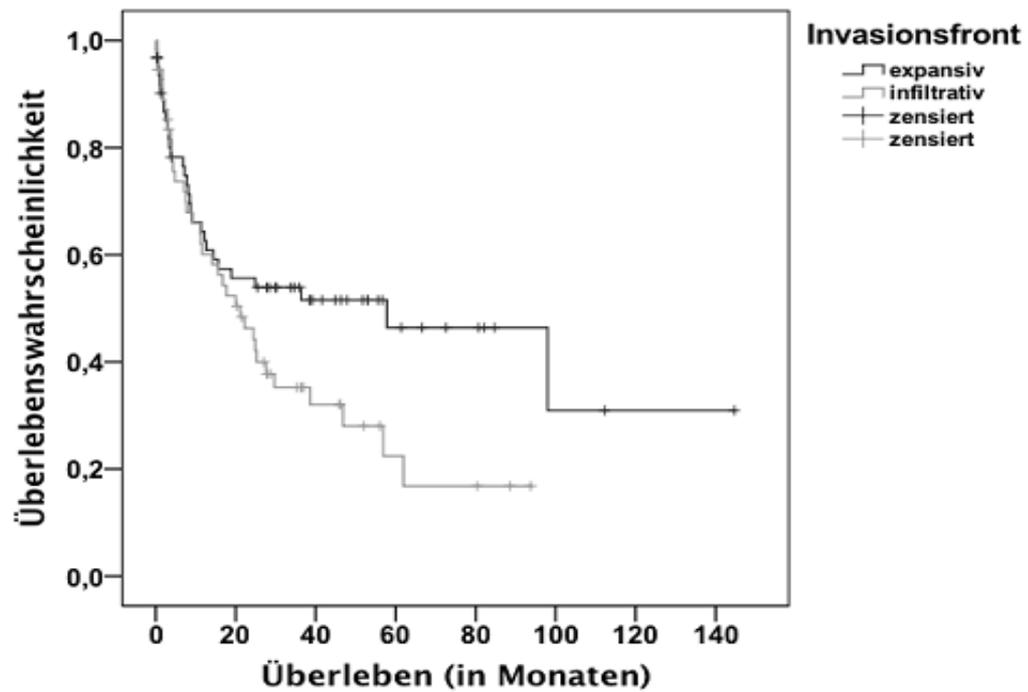
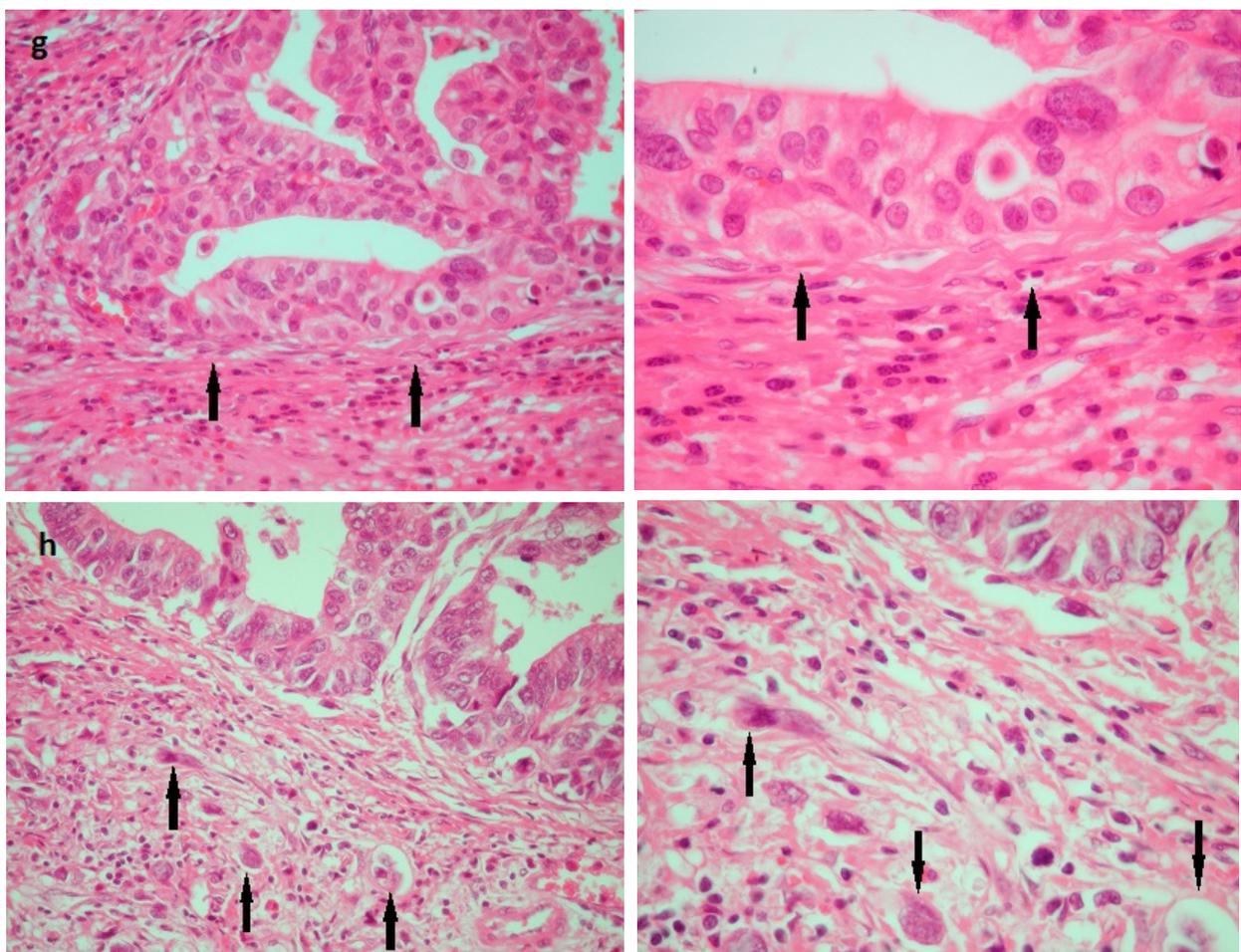
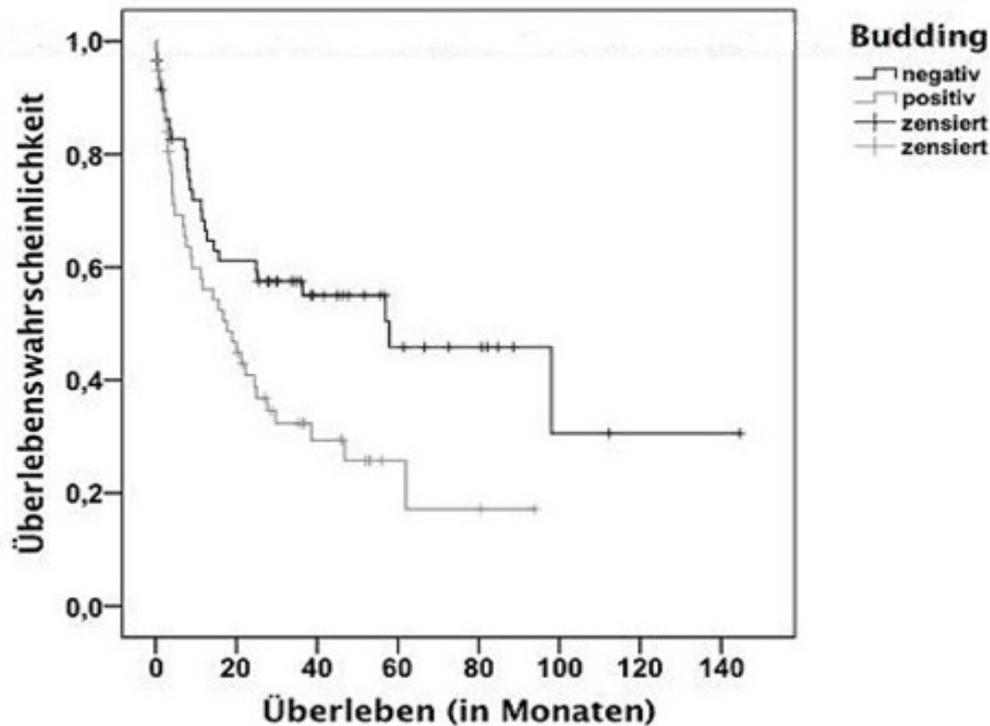


Abbildung 4.2.2.f : Gesamtüberleben in Abhängigkeit vom Invasionstyp

Das Gesamtüberleben ist ebenfalls mit dem **Budding-Verhalten** des Tumors assoziiert. So liegt die 1-, 3-, und 5- Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit bei negativem Budding bei 69,0%, 55,2%, und 39,7%, bei positivem Budding hingegen nur bei 50,6%, 31,4% und 25,7% ( $p=0,01$ ) (Tab 2, Abb. 4.2.2.i). Bezüglich der klinisch-pathologischen Daten zeigen Karzinome mit positivem Budding signifikant häufiger Lymphknotenmetastasen ( $p=0,017$ ), eine Venen- und Lymphgefäßinfiltration ( $p<0,001$ ), eine Nerveninfiltration ( $p<0,001$ ), haben einen signifikant geringeren Differenzierungsgrad ( $p=0,003$ ) und kommen häufiger bei Karzinomen vom diffusen Typ nach Laurén vor ( $p<0,001$ ) (Tab. 2). Tendenziell korreliert positives Budding ebenfalls mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium. Im Stadium I nach UICC gibt es 23 Fälle ohne Budding und 15 Fälle mit Budding. Im Stadium IV nach UICC hingegen 19 Fälle ohne und 37 Fälle mit Budding ( $p=0,07$ ).



**Abbildung 4.2.2.g/h :** Invasionsfront mit negativem (g) und positivem (h) Tumorzellbudding (200x, 400x, HE)



**Abbildung 4.2.2.i :** Korrelation des Gesamtüberlebens in Abhängigkeit vom Buddingverhalten des Tumors

### 4.3 Immunhistochemische Untersuchungsergebnisse

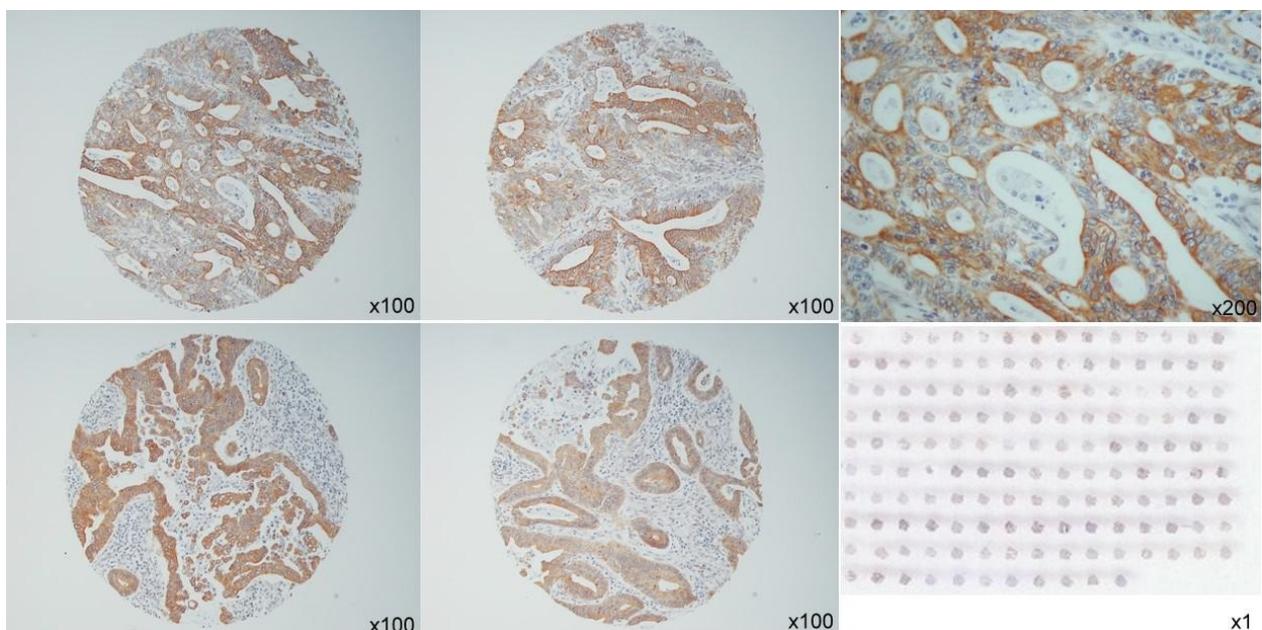
#### 4.3.1 Validierung der Untersuchungsmethoden

##### ***Tissue Microarrays und transmurale Schnittpräparate***

161 Magenkarzinome wurden per Tissue Microarray aufgearbeitet, immunhistochemisch gefärbt und immunhistologisch untersucht. Enthielt das Gewebe einer Stanze weniger als 10% Tumor, oder wurde durch die Verarbeitung beschädigt, so galt diese als nicht auswertbar. Um einen IRS für die im Tissue Microarray nicht auswertbaren Karzinome und für die nicht im Array aufgenommen pT1-Karzinome ergänzen zu können, erfolgte bei diesen Fällen eine immunhistologische Untersuchung transmuraler Schnittpräparate. Dabei zeigte sich zwar eine homogene Expression von Syndecan-4 innerhalb des Tumorzentrums (Abb. 4.1.3.1b). Jedoch fiel eine differentielle Expression zwischen Tumorzentrum und Invasionszone auf. Aufgrund dessen wurden von allen Karzinomen transmurale

Schnittpräparate ergänzt und hier ein wiederholtes Scoring für das Tumorzentrum durchgeführt. Die immunreaktiven Scores des Arrays und der transmuralen Präparate zeigten dabei eine hochgradige Übereinstimmung, wenn die Entnahme des Tumorgewebes aus dem Zentrum des Karzinoms erfolgte. Bei kleinen Tumoren, bei denen die Gewebeentnahme für die Herstellung der Arrays aus dem Rand- bzw. Invasionsbereich erfolgt, stellte sich die immunhistochemische Analyse am Tissue Microarray als ungeeignet heraus.

Die Abbildung 4.1.3.1.a zeigt vier Arraystanzen eines Tumorpräparats, einen Ausschnitt einer Arraystanze und eine Übersichtsaufnahme eines Tissue-Microarray-Blocks.



**Abbildung 4.3.1.a : Übersichtsaufnahme eines Arrayblocks und vier Stanzen eines Tumorpräparates sowie ein Arrayausschnitt (x1,x100,x200,Syn4)**

#### 4.3.2 Expression von Syndecan-4 in der Magenmukosa

Syndecan-4 wurde in den Zellen des Oberflächenepithels der nichtentzündlichen, nichtneoplastischen Magenmukosa zytoplasmatisch, betont am basalen Zellpol und der lateralen Zellmembran, exprimiert (Abb. 4.3.2.a/b). Eine zonale Expression innerhalb der Foveolen oder eine Expression des Drüsenepithels lag nicht vor. Für die mittlere Gesamtexpression des Epithels der Antrum- bzw. Corpusschleimhaut wurde ein IRS von  $12,8 \pm 3,2$  bzw.  $14,0 \pm 3,5$  ermittelt.

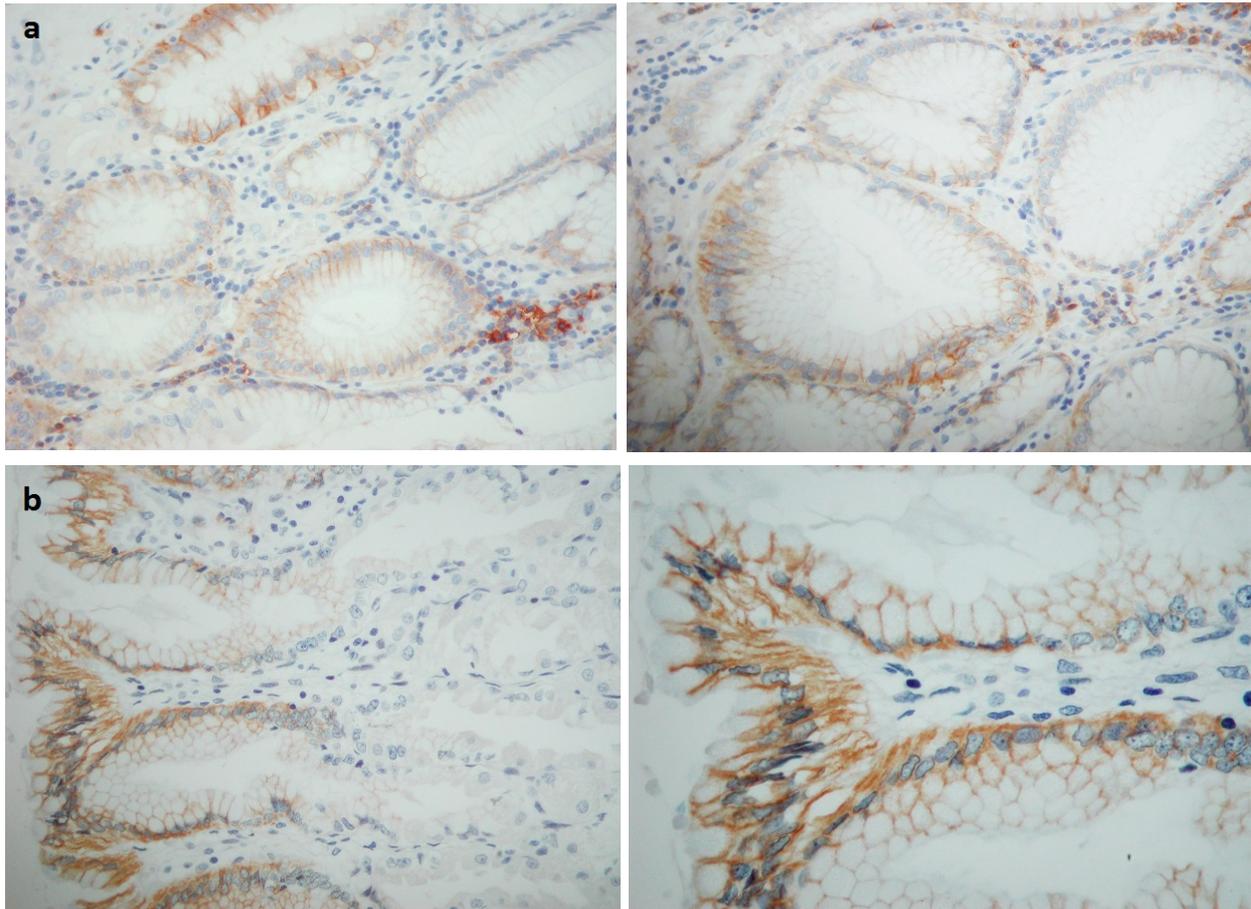


Abbildung 4.3.2.a/b : Nichtentzündliche, nichtneoplastische Antrum- (a) bzw. Corpusmukosa (b) (x200, x400, Syn4)

### 4.3.3. Expression von Syndecan-4 im Magenkarzinom

#### 4.3.3.1 Verteilungsmuster und morphologische Besonderheiten der Syndecan-4-Expression

Das Karzinomepithel wies im Vergleich zur nicht-neoplastischen Antrum- bzw. Corpusmukosa eine signifikant höhere Syndecan-4-Expression auf (IRS Antrum vs. TZ  $12,8 \pm 3,2$  vs.  $16,3 \pm 8,3$ , Corpus vs. TZ  $14,0 \pm 3,5$  vs.  $16,3 \pm 8,3$ , beides  $p < 0001$ , Abb. 4.3.3.1a).

Im Karzinom selbst war eine **zonale Expression** auffällig: Bei einer mittleren Syndecan-4-Expression mit einem IRS von  $16,3 \pm 8,3$ ,  $21,6 \pm 8,3$  und  $24,4 \pm 8,4$  für das Tumorzentrum, die Invasionsfront und die Tumorbuds lag eine signifikante Zunahme der Syndecan-Expression vom Tumorzentrum zur Invasionsfront hin zu ( $p < 0,001$ , Abb. 4.3.3.1a).

Auch hinsichtlich des **morphologischen Musters** der Syndecan-4-Expression fanden sich Unterschiede zwischen dem Tumorzentrum, der Invasionsfront und den Tumorbuds (Abb. 4.3.3.1b). Im Tumorzentrum zeigte sich meist eine membranöse Expression ohne Polarisierungstendenz mit im Vergleich zur Invasionsfront etwas geringer ausgeprägter zytoplasmatischer Syndecan-4-Expression. Bei vorliegender zusätzlicher zytoplasmatischer Expression war diese meist vesikulär. Im Bereich der Invasionsfront gab es neben einer stark ausgeprägten membranösen Expression mit Betonung des zur Invasionsfront gerichteten Zellpols meist auch eine stärker ausgeprägte zytoplasmatische Expression, welche sich morphologisch homogener zeigte (Abb. 4.3.3.1c). Tumorbuds zeigten eine stark ausgeprägte membranbetonte Syndecan-4-Expression (Abb. 4.3.3.1c).

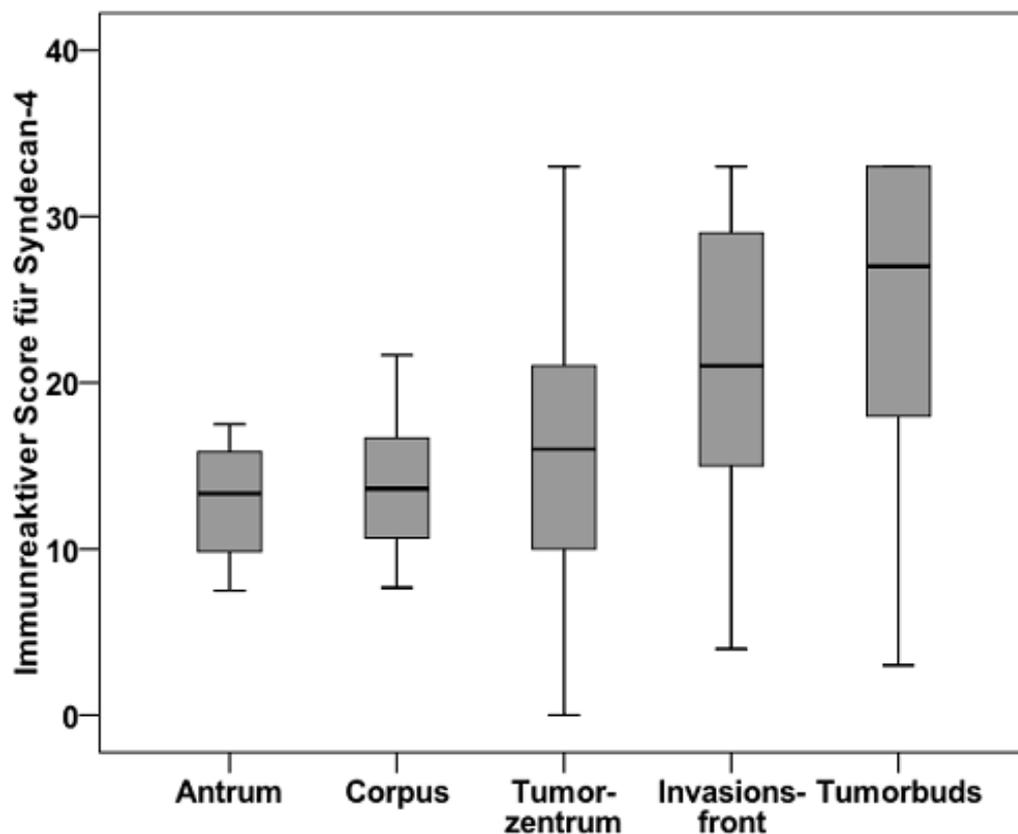


Abbildung 4.3.3.1a : Syndecan-4-Expression in der Magenmukosa sowie in den Tumorzonen

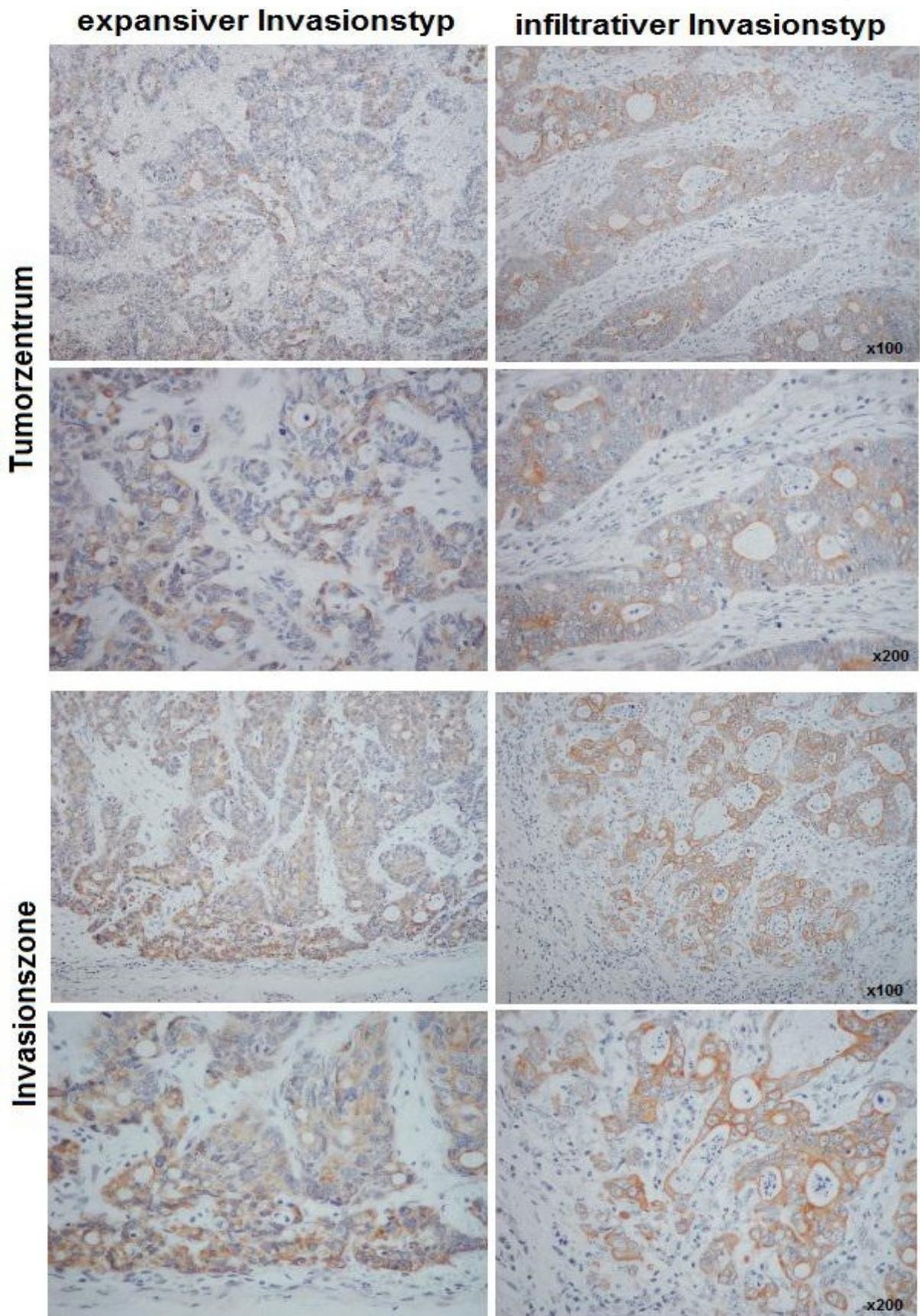
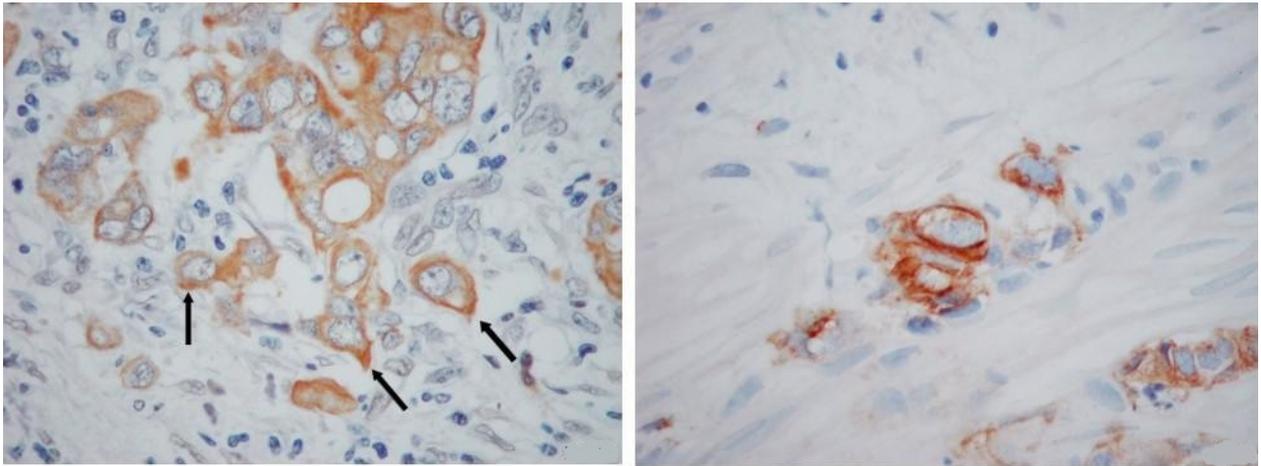
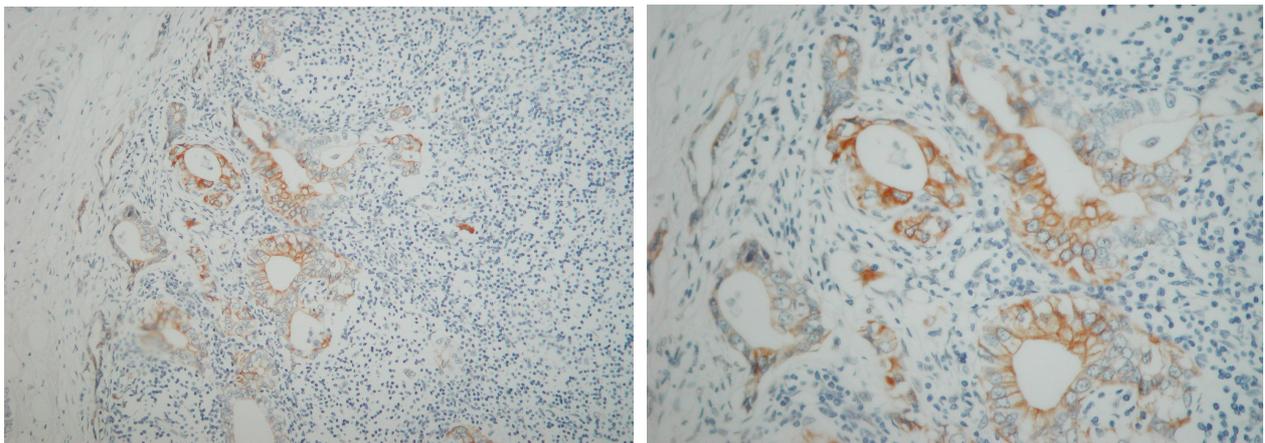


Abb. 4.3.3.1b: Zonale Syndecan-4-Expression im Tumorzentrum und an der Invasionszone bei einem Karzinom vom expansiven bzw. infiltrativen Invasionsstyp (-> Invasionszone, x100, x200, Syn4)



**Abbildung 4.3.3.1c :** polarisierte, zur Invasionsfront gerichtete Expression der Tumorzellen (->) und membranbetonte Expression der Tumorbuds (x400 Syn4)

In den untersuchten **Lymphknotenmetastasen** war sowohl im Tumorzentrum als auch an der Invasionsfront eine membranöse und eine zytoplasmatische Komponente der Syndecan-4-Expression zu beobachten (Abb. 4.3.3.d). Die Intensität der Expression stieg auch hier vom Tumorzentrum in Richtung Invasionsfront bzw. Randsinus tendenziell an.



**Abbildung 4.3.3.1d :** Lymphknotenmetastase eines Magenkarzinoms (x100, x200, Syn4)

#### 4.3.3.2. Korrelation der Syndecan-4-Expression mit den klinisch-morphologischen Daten

Tabelle 3 zeigt detailliert alle mittleren Werte der zytoplasmatischen, membranösen und Gesamtexpression von Syndecan-4 und deren Korrelation mit den einzelnen klinisch-pathologischen Gruppen.

Tendenziell waren eine fortgeschrittene lokale Tumorausdehnung sowie eine Lymphknotenmetastasierung, eine Fernmetastasierung und der diffuse Typ nach Laurén mit einer höheren Syndecan-4-Expression assoziiert. Die stärksten Gruppenunterschiede fanden sich bei Betrachtung der *zytoplasmatischen Expression*, insbesondere der Karzinominfiltrate der Invasionsfront. Beispielsweise lagen der zytoplasmatische IRS für eine Tumorausdehnung im Stadium pT1 im Tumorzentrum bei  $11,9 \pm 9,2$  und an der Invasionsfront bei  $17,6 \pm 10$ . Demgegenüber liegt der IRS im Tumorstadium pT4 bei  $17,0 \pm 10,4$  im Tumorzentrum und  $21,9 \pm 8,1$  an der Invasionsfront ( $p=0,365$  bzw.  $p=0,507$ ). Auch bei Vorliegen einer Lymphknoten- oder Fernmetastasierung lag der zytoplasmatische IRS der Gesamtexpression, insbesondere an der Invasionsfront, tendenziell höher als bei fehlender Lymphknoten- oder Fernmetastasierung (pN3 vs. pN0:  $20,9 \pm 7,3$  vs.  $17,2 \pm 8,3$ ,  $p=0,252$ ; M1 vs. M0:  $20,2 \pm 7,8$  vs.  $18,6 \pm 7,8$ ,  $p=0,247$ ). Da das Tumorstadium nach UICC das T-, N-, und M-Stadium beinhaltet, spiegelte sich auch hier die oben beschriebene Tendenz wider. Des Weiteren ließen sich bei einer Venen-, Lymphgefäß-, und Nerveninfiltration sowie bei positivem Budding eine leicht erhöhte Syndecan-4-Expression im Vergleich zu Fällen, die diese Merkmale nicht aufwiesen, nachweisen.

Auch in der Syndecan-4-Gesamtexpression fanden sich die beschriebenen Unterschiede für die einzelnen Gruppen bzw. die Tendenz einer höheren Syndecan-4-Expression für klinisch-morphologische Parameter einer fortgeschrittenen Tumorausbreitung. Diese Unterschiede in der Gesamtexpression basierten jedoch im Wesentlichen auf der zytoplasmatischen Expression, da sich für die Werte der *membranösen Expression* keine wesentlichen Unterschiede fanden. Lediglich die Kategorie des histomorphologischen Tumortyps nach Laurén zeigte sowohl im zytoplasmatischen als auch membranösen und Gesamtscore eine höhere Syndecan-4-Expression für diffuse Karzinome als für Karzinome vom intestinalen Typ.

Generell ließ sich kein Zusammenhang zwischen Expression und Geschlecht der Patienten, Grading des Tumors, Tumorlokalisation oder Typ der Invasionsfront darstellen.

# Ergebnisse

Klinisch-pathologischer Faktor	n (%)	Immunohistochemische Expression von Syndecan-4											
		zytoplasmatische Expression				membranöse Expression				Gesamtexpression			
		Tumorzentrum	p	Invasionsfront	p	Tumorzentrum	p	Invasionsfront	p	Tumorzentrum	p	Invasionsfront	P
<b>Alter</b>	147												
≤ 70 Jahre	78(53)	16,1±8,1	0,013	20,96±7,6	0,003	1,7±0,8	0,011	2,3±0,7	0,003	17,7±8,7	0,012	23,2±8,2	0,003
> 70 Jahre	69(47)	13,0±6,9		17,2±7,5		1,3±0,8		1,9±0,8		14,3±7,5		19,1±8,1	
<b>Geschlecht</b>	147												
Männlich	102(69)	14,9±7,9	0,586	19,3±7,9	0,744	1,5±0,8	0,908	2,1±0,8	0,869	16,3±8,5	0,628	21,4±8,5	0,816
Weiblich	45(31)	14,1±7,2		18,9±7,5		1,5±0,9		2,2±0,7		15,6±7,8		21±8,1	
<b>Tumor-ausdehnung</b>	145												
pT1	18(13)	11,9±9,2	0,365	17,6±10	0,507	1,8±1	0,594	2,1±0,9	0,466	13,6±10,1	0,48	19,6±10,9	0,711
pT2	64(44)	14,3±6,9		19,1±7,1		1,4±0,8		2,2±0,7		15,7±7,4		21,3±7,6	
pT3	54(37)	15,2±7,4		19,1±7,8		1,4±0,8		2±0,8		16,6±8		21,1±8,3	
pT4	9(6)	17±10,4		21,9±8,1		1,6±0,9		2±0,9		18,6±11,2		23,9±8,8	
<b>Lymphknoten-metastasen</b>	145												
pN0	38(26)	13,9±7,8	0,668	17,2±8,3	0,252	1,6±0,9	0,152	2±0,8	0,441	15,5±8,5	0,655	19,2±9	0,333
pN1	50(35)	13,8±7		19,6±7,1		1,3±0,8		2,2±0,7		15,1±7,6		21,7±7,6	
pN2	29(20)	14,9±8,2		18,9±8,5		1,4±0,8		2±0,8		16,2±8,8		20,7±9,1	
pN3	28(19)	16±8		20,9±7,3		1,7±0,9		2,3±0,8		17,7±8,6		23,2±7,7	
<b>Fern-metastasen</b>	146												
M0	97(66)	14,2±7,6	0,385	18,6±7,8	0,247	1,6±0,8	0,421	2,2±0,8	0,295	15,7±8,2	0,445	20,7±8,4	0,297
M1	49(34)	15,4±7,8		20,2±7,8		1,4±0,9		2±0,8		16,8±8,5		22,2±8,4	
<b>Venen-infiltration</b>	147												
V0	78(53)	14,5±8	0,858	18,8±8	0,535	1,6±0,9	0,3	2,2±0,8	0,606	16,1±8,6	0,953	20,9±8,7	0,599
V1	69(47)	14,8±7,4		19,6±7,5		1,4±0,8		2,1±0,8		16,1±8		21,7±7,9	
<b>Lymphgefäß-infiltration</b>	147												
L0	30(20)	14,1±8,1	0,653	18,3±8,2	0,504	1,7±0,9	0,198	2±0,8	0,408	15,7±8,8	0,768	20,3±8,9	0,480
L1	117(80)	14,8±7,6		19,4±7,7		1,5±0,8		2,2±0,8		16,2±8,2		21,5±8,2	
<b>Perineurale Karzinose</b>	144												
Pn0	64(44)	15±8,2	0,463	18,7±8,5	0,600	1,6±0,9	0,153	2,2±0,8	0,678	16,5±8,8	0,451	20,8±9,1	0,585
Pn1	80(56)	14,1±7,2		19,4±7,1		1,4±0,8		2,1±0,7		15,5±7,8		21,5±7,6	
<b>Tumorstadium</b>	146												
Stadium I	34(23)	13,3±7,8	0,465	17,6±8,3	0,442	1,6±1	0,266	2,1±0,8	0,547	14,9±8,6	0,51	19,6±9	0,635
Stadium II	44(30)	13,9±7		19±7,7		1,4±0,7		2,2±0,8		15,2±7,5		21,1±8,4	
Stadium III	19(13)	16,5±8,6		19,6±7		1,8±0,7		2,3±0,8		18,2±9		21,8±7,3	
Stadium IV	49(34)	15,4±7,8		20,2±7,8		1,4±0,9		2±0,8		16,8±8,5		22,2±8,4	
<b>Grading (G)</b>	147												
G1	7(5)	17,8±10	0,067	20,4±9,9	0,098	2±0,8	0,187	2,4±0,8	0,564	19,9±10,7	0,061	22,9±10,6	0,182
G2	54(36)	12,9±6,9		17,6±7,4		1,4±0,8		2,1±0,7		14,2±7,5		19,6±8,1	
G3	86(59)	15,5±7,8		20,1±7,8		1,5±0,9		2,1±0,8		17±8,5		22,2±8,3	

Laurén-Typ	121												
intestinal	92(76)	13,9±7,1	0,164	18,3±7,5	0,133	1,4±0,8	0,091	2,1±0,7	0,734	15,2±7,6	0,146	20,3±8	0,153
diffus	29(24)	16,1±8,9		20,7±8,3		1,7±0,9		2,2±0,9		17,8±9,6		22,9±8,8	
Tumorlokalisation	145												
Proximal	104(72)	14,4±7,6	0,844	19,5±7,4	0,264	1,5±0,8	0,355	2,1±0,7	0,788	15,8±8,2	0,780	21,6±7,9	0,291
Distal	41(28)	14,7±7,8		17,9±8,6		1,6±0,9		2,1±0,9		16,2±8,6		20±9,4	
Invasionsfront	147												
Invasionstyp													
Expansiv	72(49)	14,9±8,4	0,662	19,3±8,3	0,853	1,5±0,9	0,590	2,1±0,8	0,564	16,3±9,1	0,772	21,3±8,9	0,945
Infiltrativ	75(51)	14,4±7		19,1±7,3		1,6±0,8		2,2±0,7		15,9±7,6		21,2±7,9	
Budding-Typ													
Negativ	67(46)	15,2±8,2	0,450	18,8±8,5	0,562	1,5±0,9	0,867	2,2±0,8	0,795	16,6±8,8	0,511	20,8±9,1	0,542
Positiv	80(54)	14,2±7,2		19,5±7,2		1,5±0,8		2,1±0,8		15,7±7,9		21,7±7,7	
Lymphozyteninfiltration													
Negativ	69(47)	15,4±8,2	0,612	18,6±7,2	0,898	1,6±0,7	0,375	2,2±0,8	0,263	17,0±8,8	0,584	20,8±7,9	0,371
Positiv	78(53)	13,6±8,7		18,1±9,6		1,2±0,9		1,7±1,2		14,8±9,6		19,8±10,6	

**Tabelle 3: Klinisch-pathologische Daten und immunhistochemische Syndecan-4-Expression**

#### 4.3.3.3 Korrelation der Syndecan-4-Expression mit den Überlebensdaten

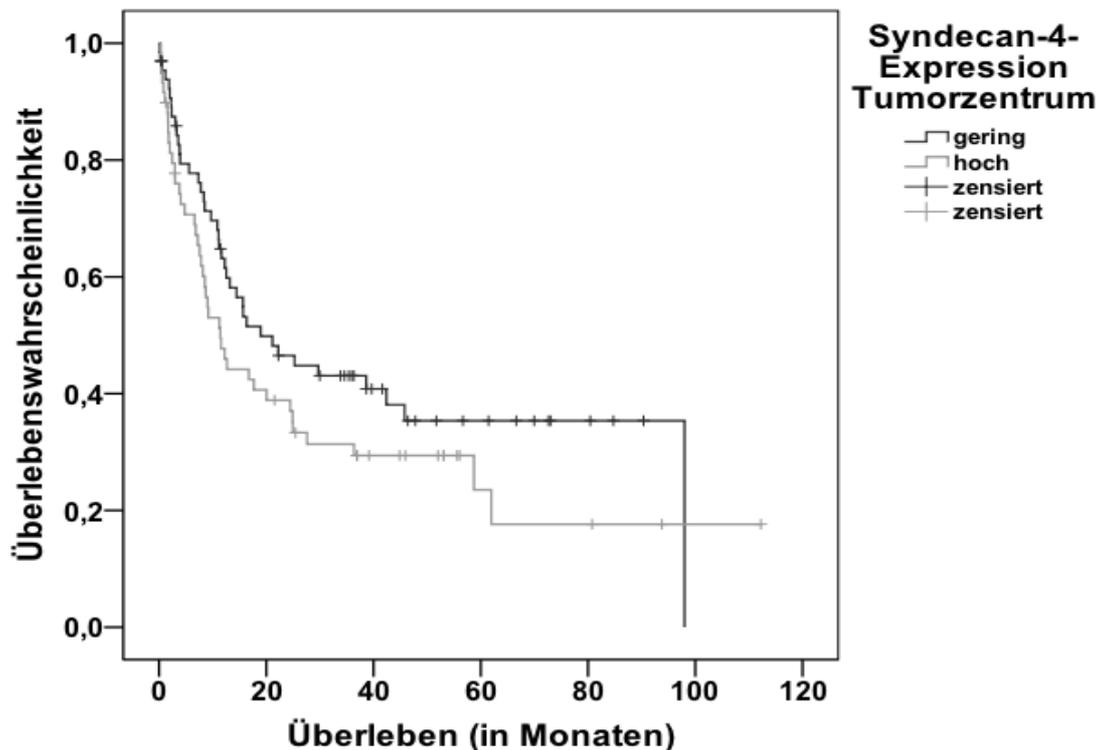
Durch eine Kaplan-Meier-Analyse sollte der Zusammenhang zwischen der Syndecan-4-Expression im Tumorzentrum bzw. an der Invasionsfront und dem Gesamtüberleben untersucht werden. Mit Hilfe der ROC-Analyse („Receiver Operating Characteristics“) wurde ein geeigneter cut-off Wert für die immunhistochemische Expression von Syndecan-4 definiert, der bei bestmöglicher Kombination von Sensitivität und Spezifität zwischen einer low risk und high risk Gruppe bezüglich des Gesamtüberlebens diskriminieren konnte. Als Schwellenwert ließ sich ein Immunreaktiver Score von 15 für das Tumorzentrum und ein IRS von 14 für die Invasionsfront identifizieren, so daß Fälle mit einem IRS <14 bzw. 15 der gering-exprimierenden und Fälle mit einem IRS ≥ 14 bzw. 15 der hoch-exprimierenden Gruppe zugeordnet wurden.

Die Analyse zeigte, dass sich die Prognose der beiden Gruppen unterscheidet (Abb. 4.3.3.3a/b). Eine höhere Syndecan-4-Expression korrelierte dabei mit einem kürzeren Gesamtüberleben der Patienten, wobei sich die Gruppen am deutlichsten durch die Expressionsdaten an der Invasionsfront diskriminieren ließen.

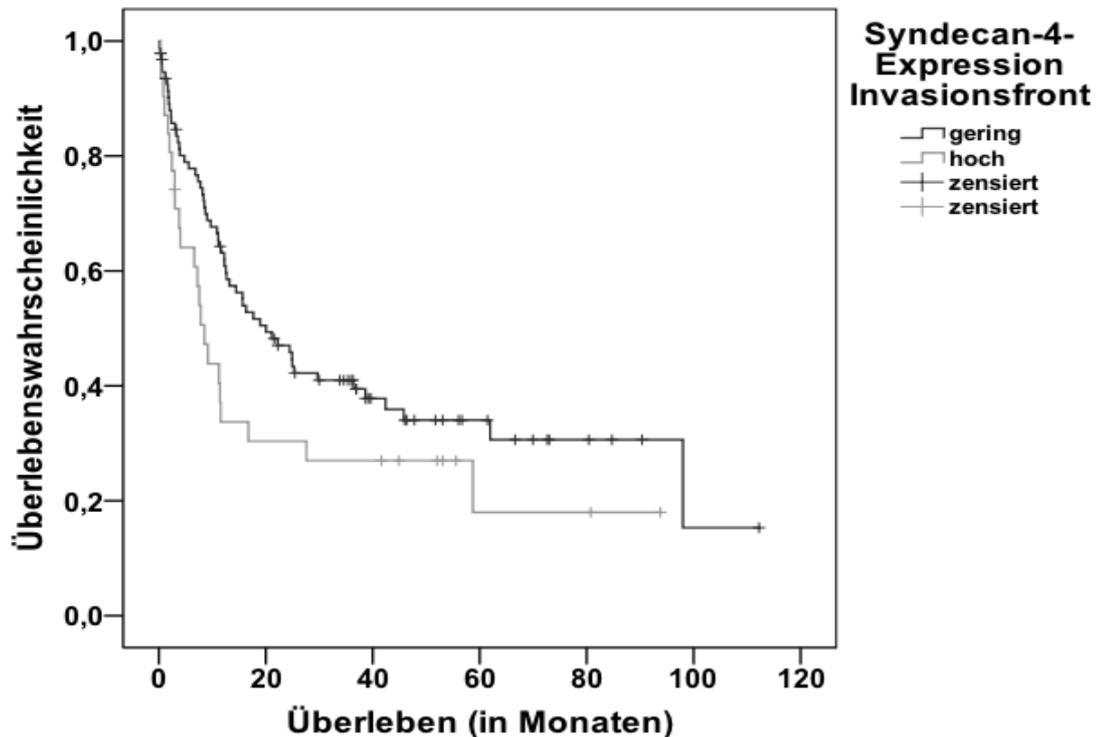
Die 1-, 3- und 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit betrug bei niedriger Expression im Tumorzentrum 85,8%, 49,8% und 35,5% bei einer mittleren Überlebenszeit von 43,5 Monaten (min-max 32,6-54,4 Monate) gegenüber 81,2%, 40,6% und 17,6% bzw. 33,5

Monaten (min-max 21,5-45,6 Monaten) bei hoher Expression ( $p=0,143$ ).

An der Invasionsfront lag die 1-, 3- und 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit bzw. die mittlere Überlebenszeit bei geringer Syndecan-4-Expression bei 91,3%, 65,4% und 42,2% bzw. 43,2 Monaten (min-max 33,1-53,2), in der Gruppe mit hoher Syndecan-4-Expression hingegen bei 64,1%, 18,0% und 14,3% bzw. 27,2 Monaten (min-max 13,9-40,2) ( $p=0,071$ ).



**Abbildung 4.3.3.3.a : Gesamtüberleben in Abhängigkeit von der Syndecan-4-Expression im Tumorzentrum**



**Abbildung 4.3.2.3.b: Gesamtüberleben in Abhängigkeit von der Syndecan-4-Expression an der Invasionsfront**

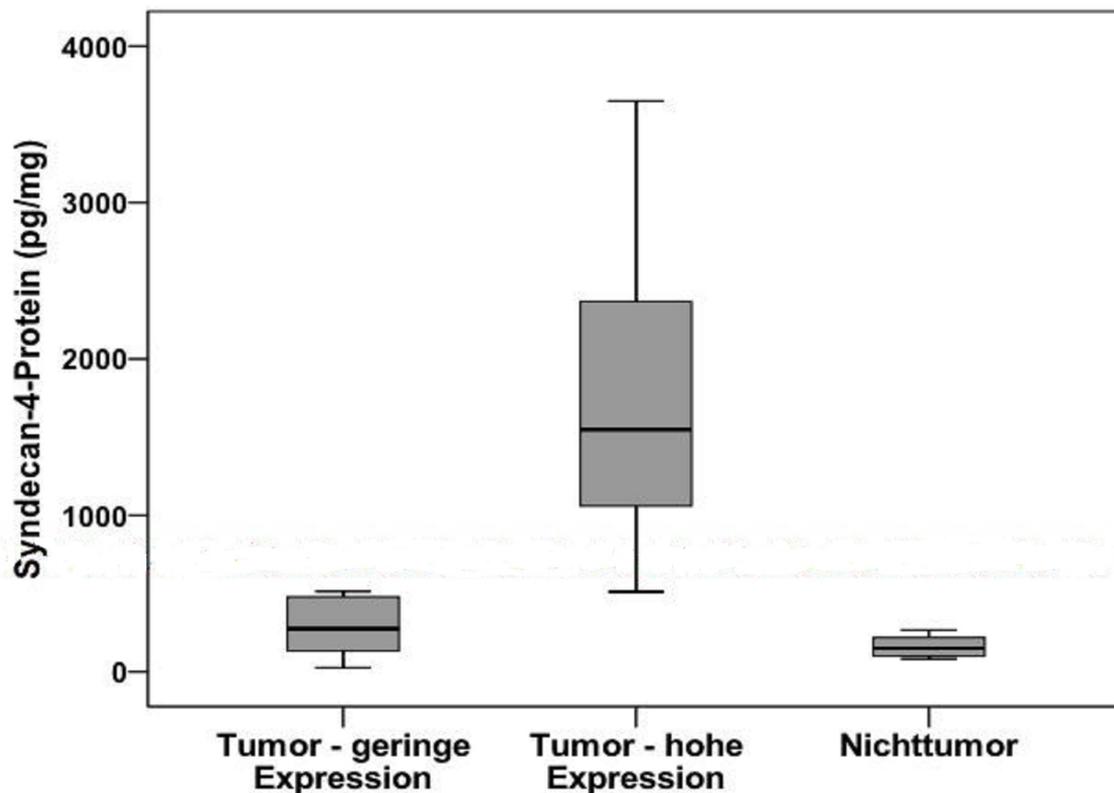
#### 4.4. Syndecan-4 mRNA- und-Proteinexpression

Die immunhistologische Bewertung der Syndecan-4-Expression im Magenkarzinom mittels Immunreaktivem Score stellt ein semiquantitatives Verfahren dar. Um das Ergebnis der histologischen Auswertung zu validieren, wurden die Proteinexpression mittels ELISA und die mRNA-Konzentration mittels LC-PCR als quantitative Verfahren an 28 repräsentativen Karzinomproben des Kollektivs bestimmt.

Der Cutt-off Wert für den Immunreaktiven Score wurde orientierend am Mittelwert bei 14 festgelegt und untergliedert das exemplarische Kollektiv in eine Gruppe mit geringem immunohistochemischen Expressionsscore (IRS=0-14) und eine Gruppe mit hohem Expressionsscore (IRS=14,1-33).

Der Vergleich der beiden Gruppen hinsichtlich der Syndecan-4-**Proteinkonzentration** ergab einen hochsignifikanter Unterschied ( $p < 0,001$ , Abb.4.4.1): Während in der Gruppe der Karzinome mit einem geringen Expressionsscore die mittlere Syndecan-4-Proteinkonzentration bei  $289,1 \pm 181,7$  pg Syndecan-4/mg Gesamtprotein (min-max 26,1-514,1 pg/mg) lag, betrug die mittlere Proteinkonzentration in der Gruppe mit einem hohen Expressionsscore  $2014,4 \pm 1533,6$  pg Syndecan-4/mg Gesamtprotein

(min-max 510,9-6713,6). Für das Nichttumorgewebe ließ sich mit  $221,5 \pm 35,1$  pg/mg (min-max 182,1-267,0 pg/mg) eine insgesamt geringere Syndecan-4-Proteinkonzentration im Vergleich zum Tumorgewebe mit  $1274,9 \pm 1440,9$  pg/mg (min-max 26,1-6713,6 pg/mg) nachweisen ( $p=0,16$ ).

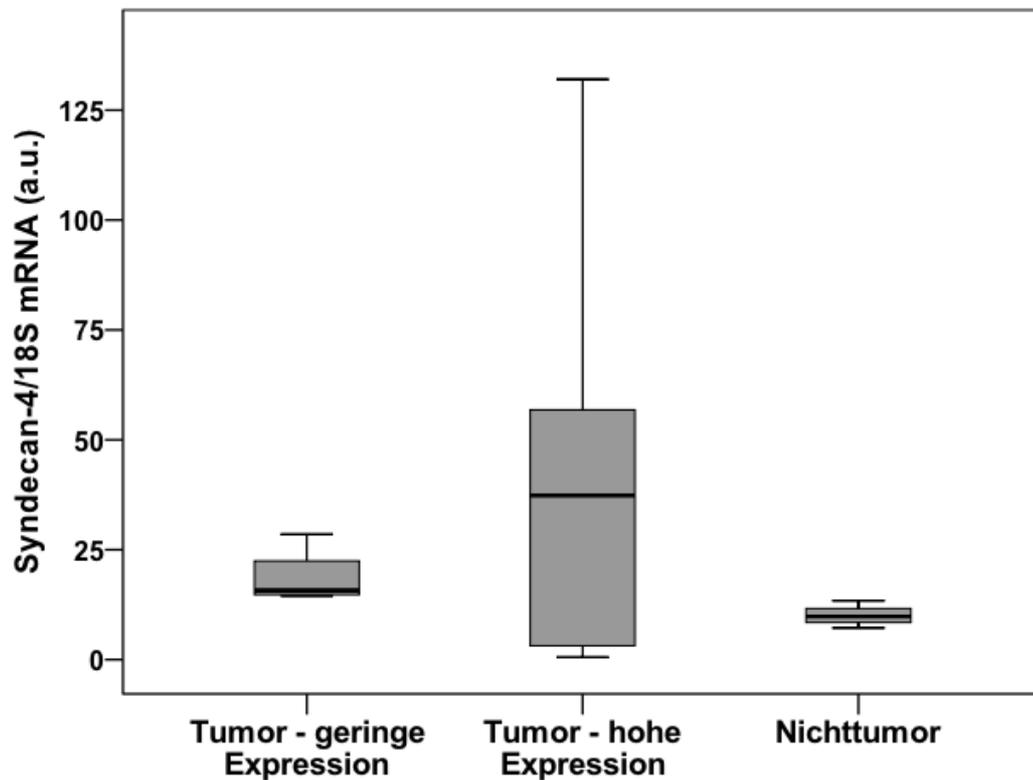


**Abbildung 4.4.1: Korrelation der immunhistochemischen Expression und Proteinexpression von Syndecan-4**

Die spektrophotometrischen Analysen bestätigten, daß alle RNA-Proben rein und ohne Lösungsmittel- oder Proteinenverunreinigungen waren. Dennoch war bei der Analyse der mRNA mittels LC-PCR von den 28 untersuchten Proben 16 nicht meßbar, so dass 12 Proben für die Korrelationsanalyse zur Verfügung standen. Der Mittelwertvergleich zeigte auch hier eine Korrelation von immunreaktiven Score und Syndecan-4-mRNA-Expression, wenngleich der Unterschied aufgrund der geringen Fallzahl auch keine statistische Signifikanz aufwies (Abb. 4.4.2.): Der mittlere Syndecan-4-mRNA Gehalt der Gruppe mit niedrigem Expressionsscore lag bei  $18,63 \pm 6,6 \cdot 10^{-7}$  Kopien (min-max  $14,5-28,6 \cdot 10^{-7}$ ) im Vergleich zum mittleren Syndecan-4-mRNA Gehalt der Gruppe mit hohem Expressionsscore mit  $40,91 \pm 43,9 \cdot 10^{-7}$  Kopien (min-max  $0,6-132,0 \cdot 10^{-7}$ ) ( $p=0,348$ ). Das Nichttumorgewebe wies mit  $9,15 \pm 3,0 \cdot 10^{-7}$  Kopien (min-max  $5,6-13,4 \cdot 10^{-7}$ )

<sup>7)</sup> eine deutlich geringere Syndecan-4-mRNA-Expression als das Tumorgewebe mit durchschnittlich  $36,0 \pm 37,6 \cdot 10^{-7}$  Kopien (min-max  $0,6 - 132,0 \cdot 10^{-7}$ ) auf ( $p=0,14$ ).

Eine positive Korrelation zwischen der RNA- und Proteinkonzentration von Syndecan-4 konnte im Paarvergleich der 12 für beide Analysen auswertbaren Proben nachgewiesen werden ( $r=0,477$ ,  $p=0,062$ ).



**Abbildung 4.4.2: Korrelation der immunhistochemischen Expression und mRNA- Expression von Syndecan-4**

## 5. Diskussion

### **Methoden**

Die Auswertung der immunhistochemischen Darstellung der Syndecan-4-Expression erfolgte zunächst mittels **Tissue Microarray-Technik** (TMA). Diese Methode ermöglicht das gemeinsame Färben von bis zu 36 Tumoren à vier Stenzen auf einem Paraffinblock und spart darüber hinaus Material und Ressourcen<sup>(19,40,100)</sup>.

Die zu einem jeweiligen Karzinom gehörigen Einzelstanzen, allesamt entnommen aus dem Tumorzentrum, zeigten vergleichbare immunistochemische Expressionswerte. Dies spricht für eine homogene Syndecan-4-Expression im Zentrum des Magenkarzinoms und dafür, daß die TMA-Technik geeignet ist, um die Expression eines Proteins in einem größeren Tumorkollektiv zeit- und kosteneffektiv darzustellen und zu quantifizieren.

Bei der Ergänzung transmuraler Schnittpräparate für die pT1-Karzinome und für im Array nicht auswertbare Tumoren fiel jedoch eine differentielle Syndecan-4-Expression für Tumorzentrum und Invasionszone auf. Hier stellte sich die Frage, ob diese zonale Expression bezüglich der Ausprägung klinisch-pathologischer Faktoren und hinsichtlich der Prognose von Bedeutung ist. Die Fragestellung der vorliegenden Arbeit wurde dementsprechend spezifiziert, was bedeutete daß nicht nur die Intensität und das Expressionsmuster der Syndecan-4-Expression der Zellen des Tumorzentrums betrachtet, sondern auch die Expression der Zellen der Invasionsfront einschließlich der Tumorzellbuds und somit pro Tumor zwei verschiedene Zonen bewertet werden mussten. Hier stößt die Tissue Microarray-Technik an ihre Grenzen, da eine Entnahme von Gewebestücken aus der Invasionsfront auch bei exakter Markierung auf dem H&E-Übersichts-Schnittpräparat zu ungenau und viele Fälle nicht ausreichend beurteilbar wären. Zudem würde eine zusätzliche Entnahme von Stanzen aus dem Donorblock die Verwertbarkeit des Paraffinblockes für weitere Untersuchungen stark herabsetzen. Aus diesem Grund wurde von jedem der 161 Karzinompräparate des Kollektivs ein transmurales Schnittpräparat angefertigt und unter Aufsicht einer erfahrenen Pathologin (DJ) sowohl Tumorzentrum als auch Invasionsfront ausgewertet. In den meisten Fällen stimmten die Ergebnisse der Array-Auswertung und die Ergebnisse der transmuralen Schnittpräparate überein. Gab es Abweichungen in den Ergebnissen wurde letztendlich zu Gunsten des transmuralen Schnittpräparates entschieden, da hier die Betrachtung des gesamten Tumorabschnitts möglich war.

Um die **immunhistochemische Färbreaktion** zu validieren wurden bei jedem immunhistochemischen Färbegang, wie vom Hersteller des Antikörpers empfohlen, auch Paraffinschnitte von nichttumorösem Lebergewebe mitgeführt, um die Qualität der Färbung zu beurteilen. Stellte sich diese ohne Artefakte und homogen dar, galt die Färbung als methodisch einwandfrei. Durch die oben genannten Schritte wurde versucht eine möglichst genaue und objektive immunhistochemische Darstellung von Syndecan-4 zu erreichen.

Die **molekularbiologischen Methoden** zur Gewebepreparation und zum Nachweis von Syndecan-4-RNA und -Protein mittels Photometer, PCR, Gelelektrophorese und ELISA waren alle etabliert. Verwendet wurden ausschließlich Materialien von renomierten Herstellern unter Beachtung der vorgeschriebenen Hygienestandards um eine Kontamination mit Fremdprotein oder -RNA zu vermeiden.

Der **Nachweis von Syndecan-4-Protein und -mRNA** aus Gewebeproben unseres Kollektivs diente der Validierung des immunreaktiven Scores (IRS) als semiquantitativen Verfahren. Es sollte also überprüft werden, ob die Ergebnisse der immunhistochemischen Auswertung, welche letztendlich auch eine Bestimmung des Syndecan-4-Gehalts einer Probe darstellt, mit einer objektiven Quantifizierung mittels ELISA oder LC-PCR übereinstimmt.

Der Syndecan-4-Proteingehalt korrelierte signifikant mit den Ergebnissen des immunreaktiven Scores ( $p=0,003$ ), so dass man davon ausgehen kann, daß durch den immunreaktiven Score der Syndecan-4-Gehalt der Probe quantitativ erfasst wird. Im Rahmen der Syndecan-4-mRNA-Bestimmung hingegen mussten nach Analyse der LightCycler-PCR-Daten 16 der 28 Proben als nicht auswertbar eingestuft werden. Die Auswertung der übrigen 12 Proben zeigt eine Korrelation von immunreaktivem Score und RNA-Gehalt, obgleich die Ergebnisse aufgrund der geringen Probenzahl statistisch nicht signifikant waren. Die Nichtauswertbarkeit von 16 Proben legt die Vermutung nahe, dass durch die lange Kryokonservierung der Proben im Institut für Pathologie der Universität Magdeburg oder durch schon mehrfach stattgefundene Auftauprozesse im Rahmen vorausgegangener Untersuchungen durch weitere Arbeitsgruppen des Institutes die fragile mRNA beschädigt wurde und somit nicht mehr nachweisbar war. Auch könnte die Zeitspanne zwischen Gewebeentnahme in der chirurgischen Klinik und Konservierung der Proben zu einer Beeinträchtigung der RNA-Qualität geführt haben. Trotz aller Sorgfalt bei der Aufarbeitung des Gewebes ist auch eine Beschädigung der RNA im Rahmen unserer Untersuchung als Störquelle prinzipiell möglich. Die problemlos auswertbare Analyse der mitgeführten Kontrollen (Hep G2-Zelllinie eines

hepatozellulären Karzinoms) spricht jedoch dagegen. Des Weiteren bestand eine positive Korrelation der Syndecan-4-RNA- und -Proteinkonzentration der 12 paarweise auswertbaren Fälle, was die Erhebung realer Werte in der RNA-Analyse bestätigt und eher für eine RNA-Schädigung der nicht-auswertbaren Fälle als für eine technische Fehlerquelle spricht. Auch ist durch das deutlich signifikante Ergebnis der Syndecan-4-Proteinbestimmung die beabsichtigte Validierung der immunhistochemischen Auswertung gegeben, zumal Proteinkonzentration von Syndecan-4 eine wesentlich höhere funktionelle und somit auch prognostischere Bedeutung haben als RNA-Konzentrationen.

### ***Patientenkollektiv und Prognose***

Im Mittel wurde bei den männlichen Patienten in dem untersuchten Kollektiv mit 67 Jahren und bei den weiblichen Patienten mit 68 Jahren ein Magenkarzinom diagnostiziert. Die aktuellen Daten des Robert Koch-Institutes und der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (GEKID) hingegen postulieren ein **mittleres Erkrankungsalter** von 71 Jahren für Männer und 75 Jahren für Frauen ([www.rki.de](http://www.rki.de), Krebs in Deutschland 2005/2006 7. Ausgabe (02/2010)). Dieser deutliche Unterschied im mittleren Erkrankungsalter kann mehrere Gründe haben. Zum einen wurden in unserem Kollektiv nur Patienten berücksichtigt, für die die Operation die Primärtherapie darstellte. Mutmaßlich ältere Patienten, für die eine Operation nicht mehr in Frage kam, oder die diese Form der Therapie ablehnten, wurden nicht mit eingeschlossen. Zum anderen besteht unser Kollektiv größtenteils aus Patienten des Universitätsklinikums Magdeburg. Als Zentrum werden hier möglicherweise besonders junge Patienten behandelt. Eine weitere Möglichkeit ist die frühzeitige Diagnostik bei Verdacht auf ein Malignom, da im Universitätsklinikum Ressourcen wie Endoskopie und andere Methoden der Bildgebung zeitnah zur Verfügung stehen, und Screeningprogramme häufiger in universitären Zentren durchgeführt werden. So liegt beispielsweise in einer koreanischen universitären Studie mit über 12.300 Magenkarzinompatienten das mittlere Erkrankungsalter bei 67 Jahren und entspricht damit annähernd den Ergebnissen dieser Untersuchung<sup>(87)</sup>. Eine Studie der Universität Kiel mit 338 Patienten bestätigt diese mittlere Erkrankungsalter für das Magenkarzinom<sup>(176)</sup>.

Das **Geschlechterverhältnis** des untersuchten Kollektivs liegt bei 2,2:1 Männer zu Frauen. Laut Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (GEKID) erkrankten 2008 21,6/100.000 Männer und 10,2/100.000 Frauen in Sachsen-

Anhalt an einem Magenkarzinom. Dies entspricht einem Geschlechterverhältnis von 2,1:1 Männer zu Frauen und damit annähernd dem untersuchtem Kollektiv ([www.gekid.de](http://www.gekid.de), Daten aus 2011).

Mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von 20-30% hat das Magenkarzinom auch heute noch eine schlechte **Prognose**<sup>(91,120)</sup>. Die Inzidenz des Magenkarzinoms hat in den letzten Jahren und Jahrzehnten deutlich abgenommen. Dies wird vor allem auf die verstärkte Helicobacter-Eradikation zurück geführt<sup>(30,63)</sup>. Durch Massenscreening-Programme vor allem in Japan, aber auch anderen asiatischen Ländern lässt sich die 5-Jahres-Überlebensrate auf über 45% anheben<sup>(53)</sup>. Hier wird das Magenkarzinom in deutlich früheren Stadien diagnostiziert.

In Deutschland und anderen Industrienationen hingegen ist bei Diagnosestellung meist schon ein fortgeschritteneres Tumorstadium erreicht und die Prognose dadurch reduziert<sup>(160)</sup>.

Die 5-Jahres-Überlebensrate des untersuchten Kollektivs lag mit 32% leicht höher als der bundesdeutsche Durchschnitt. Gründe hierfür könnten die erfolgte Therapie an einem Zentrum (Universitätsklinikum Magdeburg) und vor allem das Fehlen von inoperablen bzw. palliativ betreuten Patienten im Kollektiv sein.

### ***Klinisch-pathologische Parameter***

Eine Reihe von klinisch-pathologischen Einflussfaktoren sind eng mit der Prognose des Magenkarzinoms assoziiert.

Die meisten Patienten im untersuchten Kollektiv hatten ein Magenkarzinom im T2-Stadium (42,8%) gefolgt von einem T3-Stadium (37,7%). Das T1-Stadium war mit 13,7% vertreten. Das am weitesten fortgeschrittene T4-Stadium lag bei 5,7% der Patienten vor. Diese Verteilung entspricht in etwa einer multizentrischen Studie von Siewert et al.<sup>(160)</sup> an 1654 Patienten. Hier waren die einzelnen Tumorstadien nach der TNM-Klassifikation mit 38,5% (T2), 35,3% (T3), 20,8% (T1), 5,4% (T4) vertreten. Lag in unserem Kollektiv die mittlere 1-, 3-, und 5-Jahres-Gesamtüberlebensrate bei Vorliegen eines T1-Stadiums noch bei 100%, 94,4% und 82,6%, so sank diese bei einem Karzinom im T4 Stadium auf 34,7%, 14,5% bzw. 3,1 % ab. In der Vergleichsstudie von Siewert et al.<sup>(160)</sup> lag die 5-Jahres- Gesamtüberlebensrate bei einem T1-Stadium bei ca. 81,2% und bei einem weiter fortgeschrittenem T4-Stadium bei ca. 13,0%. Somit entsprechen die Überlebensdaten für Tumoren mit geringer lokaler Ausbreitung (T1) den Daten unseres Kollektivs, wohingegen Patienten mit lokal fortgeschrittenen Karzinomen (T4) in unserem Kollektiv wesentlich bessere Überlebensdaten aufwiesen.

Dies ist am ehesten darauf zurückzuführen, daß die von Siewert et al.<sup>(160)</sup> untersuchten Patienten zwischen 1986 und 1989 diagnostiziert und behandelt worden sind, dahingegen die in der vorliegenden Arbeit eingeschlossenen Patienten zwischen 1997 und 2009 behandelt wurden und so möglicherweise von einer zwischenzeitlich verbesserten Diagnostik und Therapie profitiert haben.

Die wichtigsten Faktoren hinsichtlich des Gesamtüberlebens ist das Ausmaß der Lymphknotenbefalls und das Vorliegen von Fernmetastasen.

Bei negativem Lymphknotenstatus liegt die 1-, 3-, und 5-Jahres-Gesamtüberlebensrate bei 87,3%, 84,5%, und 61,9% und reduziert sich bei einem N3-Stadium auf 13,5%, 3,4% und 0% ( $p < 0,001$ ). Ohne eine Fernmetastasierung liegt die 1-, 3-, und 5-Jahres-Gesamtüberlebensrate bei 72,9%, 58,1% und 44,5% um dann bei Vorliegen einer Fernmetastasierung auf 33,9%, 14,3% und 9,5% zu sinken ( $p < 0,001$ ). Zu diesem Ergebnis einer Verschlechterung der Prognose in Abhängigkeit von Lymphknoten- und Fernmetastasierung kamen auch Studien von Siewert et al.<sup>(160)</sup> bzw. Lazar et al.<sup>(105)</sup>

Auch eine Infiltration von Lymphgefäßen ist in dem hier untersuchten Kollektiv signifikant mit einem schlechteren Überleben korreliert (siehe Tabelle 1).

In einigen anderen Studien wurde diese Korrelation ebenfalls bestätigt<sup>(86,102,104)</sup>. Kunisaki et al.<sup>(102)</sup> konnten sogar zeigen, dass Patienten mit N0-Status trotz Lymphgefäßinfiltration von einer adjuvanten Chemotherapie profitieren. Die Veneninfiltration ist in dem untersuchten Kollektiv ebenfalls signifikant mit einer schlechteren Prognose assoziiert. Dieses Ergebnis deckt sich mit Untersuchungen von Gabbert et al.<sup>(55)</sup> und Setälä et al.<sup>(157)</sup>. Gabbert et al.<sup>(55)</sup> konnten in einer Mainzer Studie mit 529 Magenkarzinompatienten zeigen, dass Patienten mit Veneninvasion eine 5-Jahres-Gesamtüberlebensrate von 15% im Gegensatz zu 55% bei Patienten ohne Veneninvasion aufweisen. In der Multivariatanalyse von Setälä et al.<sup>(157)</sup> mit 321 finnischen Patienten wurde die Lymphgefäßinfiltration als unabhängiger negativer prognostischer Faktor identifiziert. In unserem Kollektiv liegen die 5-Jahres-Gesamtüberlebensrate bei 8,2% mit Veneninfiltration und 53,5% ohne Invasion und sind damit vergleichbar ( $p < 0,001$ ). Die Angioinvasion in Magenkarzinomen ist folglich ebenfalls ein wichtiger prognostischer Faktor und sollte entsprechend der S3-Leitlinie zur Diagnostik und Therapie des Magenkarzinoms als unabhängiger Parameter zur Prognoseabschätzung beitragen<sup>(124)</sup>.

Bilici et al.<sup>(13)</sup> konnten darüber hinaus die Signifikanz einer perineuralen Tumordinfiltration für die Prognoseabschätzung belegen. So lag die 3-Jahres-Gesamtüberlebensrate bei

38,5% mit einer perineuralen Infiltration und 69,8% ohne diese. Auch in unserem Kollektiv war die perineurale Karzinose mit einer 1-, 3- und 5-Jahres-Gesamtüberlebensrate von 45,5% 25,6% und 20,2% im Vergleich zu 75,6%, 62,6% und 46,1% ohne Nervenscheideninfiltration ein negativer Prognosefaktor ( $p < 0,001$ ).

Übereinstimmend mit der Literatur wiesen auch in der vorliegenden Arbeit Patienten mit einem Karzinom vom diffusen Typ nach Laurén eine signifikant schlechtere Überlebenszeit als Patienten mit einem Karzinom vom intestinalen Typ auf ( $p < 0,001$ ). Die bekannten Unterschiede der beiden Karzinomtypen bezüglich Ätiologie, Epidemiologie und Tumorausbreitung und die damit einhergehende schlechtere Prognose der diffusen Karzinome hat dazu geführt, daß nach den aktuellen Leitlinien zur Behandlung des Magenkarzinoms die Laurén-Klassifikation richtungsgebend für Therapieentscheidungen wie beispielsweise die Auswahl des OP-Verfahrens ist<sup>(156,179)</sup>.

Auch der Differenzierungsgrad des Tumors stand im ausgewerteten Kollektiv in direktem Zusammenhang mit dem Gesamtüberleben. 60,3% der Karzinome waren schlecht differenziert (G3), 35,4% mäßig differenziert (G2) und lediglich 4,3% gut differenziert (G1). Betrug die 1-, 3- und 5-Jahres-Gesamtüberlebensrate bei gut differenzierten Karzinomen noch 68,6%, 51,4% und 51,4%, sanken die Zahlen bei schlecht differenzierten Karzinomen auf 50,5%, 31,7% und 24,0% ( $p < 0,001$ ). Die Studienlage zum Zusammenhang von Grading und Prognose sind nicht eindeutig. Während bei Siewert et al.<sup>(160)</sup> das Grading keinen signifikanten Einfluss auf die Prognose hat, bestätigen die Ergebnisse einer Multizenterstudie von Isobe et al.<sup>(86)</sup> an 12004 japanischen Patienten eine herabgesetzte Prognose bei schlechtem Differenzierungsgrad.

### ***Prognosefaktoren der Invasionsfront***

Verschiedene morphologische Charakteristika der Invasionsfront reflektieren die Tumorphgnose oftmals eher als Eigenschaften der Zellen des Tumorzentrums. Tatsächlich zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit einen deutlichen Zusammenhang zwischen morphologischen Parametern der Invasionsfront wie Tumorzellbudding, Lymphozyteninfiltration und Invasionstyp und der mittleren Überlebenszeit der Patienten als auch eine Korrelation dieser Parameter mit anderen prognosebestimmenden, klinisch-pathologischen Faktoren.

Diskutiert werden muß hier zunächst, ob die Parameter Tumorzellbudding und Invasionstyp nicht bereits in den Subtypen der Laurén-Klassifikation abgebildet sind. Die Laurén-Klassifikation differenziert Magenkarzinome entsprechend ihrem mikroskopi-

schen Wachstumsverhalten in einen diffusen oder intestinalen Subtyp<sup>(104)</sup>. Per definitionem zeigen intestinale Karzinome zusammenhängende kohäsive Tumorzellgruppen mit meist drüsiger Anordnung und verdrängendem Tumorrand. Diffuse Karzinome sind definiert als unscharf begrenzte Tumore mit diskohäsiv gelagerten Tumorzellen, die meist diffus die Magenwand infiltrieren. Die Klassifizierung nach Laurén erfolgt grundsätzlich nach dem prädominanten Wuchsmuster. Das Wachstumsverhalten der Tumorzellen am Tumorrand, welches beispielsweise bei der aktuell nicht gebräuchlichen Ming-Klassifikation<sup>(123)</sup> beurteilt wird, wird hier nicht einbezogen. Somit sind bei Berücksichtigung der Definition des Tumorbuddings und der Vorgaben für die Laurén-Klassifikation diffuse Karzinome nicht mit positivem Budding oder infiltrativem Invasionsstyp gleichzusetzen, auch wenn sie dieses Phänomen gehäuft aufweisen. Vielmehr stellt die Beurteilung von Invasionsstyp und Buddingverhalten ergänzende Informationen zum Wachstumsverhalten des Tumors bereit und hat möglicherweise prognostische Bedeutung. Aktuelle Studien zum Tumorbudding im Magenkarzinom teilen diese Ansicht<sup>(99,169)</sup>. Tatsächlich zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit einen vom Laurén-Typ unabhängigen deutlichen Zusammenhang zwischen morphologischen Parametern der Invasionsfront wie Tumorzellbudding, Lymphozyteninfiltration und Invasionsstyp und der mittleren Überlebenszeit der Patienten als auch eine Korrelation dieser Parameter mit anderen prognosebestimmenden, klinisch-pathologischen Faktoren. Es erscheint daher sinnvoll, Tumorzellbudding und den Invasionsstyp als ergänzende prognostische Marker für das Magenkarzinom zu betrachten und für Therapieentscheidungen heranzuziehen.

### ***Rolle des Tumorzellbudding und Einfluss auf die Prognose***

„Tumorbudding“ ist definiert als das Vorhandensein von isolierten oder aus maximal 5 Zellen bestehender Cluster undifferenzierter Tumorzellen eingebettet im Stroma der Invasionsfront<sup>(128)</sup>. Es reflektiert den Prozess der epithelial-mesenchymalen Transformation, der der Tumorzelle eine Dissoziation und Mobilisierung aus dem Tumorzellverband ermöglicht, ihr die Fähigkeit zur Matrix-Degradation, zur Abwehr der lokalen Immunreaktionen und letztlich zur Invasion von Lymph- und Blutgefäßen und damit zur Fernmetastasierung verleiht<sup>(42,110)</sup>.

So wird das Tumorzellbudding im kolorektalem Karzinom seit längerem als wichtigster histomorphologischer Faktor für Hochrisikopatienten und als unabhängiger Prognosefaktor angesehen<sup>(145,174)</sup>. Verschiedene Autoren konnten für das Kolonkarzinom zeigen, daß positives Budding nicht nur mit einer schlechteren Prognose assoziiert ist, sondern auch als Prognosefaktor für Lymphknotenmetastasen und eine vermehrte

Venen-, Lymphgefäß- und Nerveninfiltration geeignet ist<sup>(118,145,174)</sup>. Auch für das Pankreaskarzinom und Karzinome des Ösophagus und gastroösophagealen Überganges konnte der Zusammenhang zwischen Tumorzellbudding und einer schlechten Prognose nachgewiesen werden<sup>(18,94)</sup>.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass Tumorzellbudding im Magenkarzinom signifikant häufiger mit einer schlechten Prognose assoziiert ist (siehe Tabelle 1). Patienten mit positivem Budding wiesen vermehrt eine Lymph- und Angioinvasion, Lymphknotenmetastasen, ein fortgeschrittenes Tumorstadium sowie ein kürzeres 1-, 3- und 5-Jahres-Überleben bzw. kürzeres Gesamtüberleben auf als Patienten mit einem Karzinom ohne Budding ( $p < 0,001$ ,  $p = 0,017$ ,  $p = 0,07$  bzw.  $p = 0,01$ ). Vor kurzem hat eine Arbeitsgruppe um Tanaka et al.<sup>(169)</sup> unsere Beobachtungen bzw. Tumorzellbudding als negativen prognostischen Marker für das Magenkarzinom bestätigt.

### ***Rolle des Invasionstypes und Einfluss auf die Prognose***

Die Beurteilung des Wachstumsmusters der tiefsten Infiltrationszone eines Karzinoms, d.h. die Einteilung in eine expansive bzw. infiltrative Invasionsfront, ist v.a. als das 1986 von Jass et al.<sup>(88)</sup> vorgeschlagene Gradingssystem für Rektumkarzinome bekannt. Tatsächlich wurde bereits 1977 ein analoges Gradingssystem für das Magenkarzinom – die sog. Ming-Klassifikation – vorgeschlagen<sup>(123)</sup>.

Daß dieses Grading auch für das Magenkarzinom prognostische Relevanz hat, zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit: Es bestand eine deutliche Assoziation zwischen dem Invasionstyp und dem Gesamtüberleben. Die Gesamtüberlebensewahrscheinlichkeit bei expansiver Invasionsfront liegt nach 1-, 3-, und 5 Jahren bei 63,4%, 52,2% und 38,1%. Bei infiltrativer Invasionsfront hingegen nur bei 54,4%, 32,2% und 25,1% ( $p = 0,06$ ). Auch zeigte der infiltrative Typ signifikant häufiger eine Venen-, Nerven- und Lymphgefäßinfiltration ( $p = 0,009$ ,  $p < 0,001$ ,  $p < 0,001$ ), Tumorzellbudding ( $p < 0,001$ ) und eine Lymphknotenmetastasierung ( $p = 0,09$ ).

Übereinstimmend mit unseren Ergebnissen konnten auch andere Studien zeigen, dass Tumoren des Magens mit diffusem, infiltrativem Wachstum an der Invasionsfront eine schlechtere Prognose aufweisen als jene Karzinome mit expansivem Wachstum<sup>(24,105,157)</sup>. 2005 zeigten Luebke et al.<sup>(109)</sup>, dass ein infiltrativ wachsendes Magenkarzinom im Gegensatz zu expansivem Wachstum nicht nur eine signifikant schlechtere Prognose aufweist, sondern auch hochsignifikant mit einem fortgeschrittenem Tumorstadium (nach TNM und nach UICC), einer vermehrten

Lymphknotenmetastasierung und einem geringeren Differenzierungsgrad (Grading) assoziiert ist. Diese Autoren konnten außerdem eine Tendenz zu vermehrter Fernmetastasierung feststellen.

Außerdem korrelierte der infiltrative Invasionsstyp signifikant häufiger mit dem diffusen Wachstumsmuster nach Laurén, wohingegen Karzinome vom intestinalen Typ nach Laurén häufiger eine expansive Invasionsfront aufweisen ( $p=0,017$ ). Diese Korrelation von Infiltrations- und Histotyp ist von Luebke et al.<sup>(109)</sup> bestätigt worden. Ursächlich hierfür könnte der für den diffusen Typ charakteristische Verlust des Adhäsionsmoleküls E-cadherin sein, was zur epithelial-mesenchymalen Transformation beiträgt und das Herauslösen der Tumorzelle aus dem Verband und die Bildung infiltrativer Tumorformation, Cluster und Buds begünstigt.

### ***Rolle der Lymphozyteninfiltration und Einfluss auf die Prognose***

In der vorliegenden Arbeit geht eine verminderte Lymphozyteninfiltration im Tumorgewebe nicht nur mit einer signifikant schlechteren 1-, 3-, und 5-Jahres-Gesamtüberlebensrate einher (64,3%, 51,1% und 36,6% gegenüber 52,5%, 31,5% und 25,9%,  $p=0,027$ ), sondern sie korreliert auch signifikant mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium nach UICC ( $p=0,004$ ), einem geringeren Differenzierungsgrad des Tumors (Grading) ( $p=0,018$ ), Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen ( $p<0,001$ ), der Infiltration von Venen, Lymphgefäßen und Nerven ( $p=0,02$ ,  $=0,001$ ,  $<0,001$ ). Die Lymphozyteninfiltration scheint also eine wichtige Rolle bezüglich Tumorprogression, Metastasierung und Infiltration zu spielen.

Der prognostisch günstige Einfluss einer Lymphozyteninfiltration bei Patienten mit Magenkarzinom konnte in diversen anderen Studien belegt werden<sup>(1,71,95,157)</sup>. Speziell ein Zusammenhang zwischen einer hohen Infiltrationsrate mit natürlichen Killerzellen und weniger Lymphknotenmetastasen, einer geringeren Anzahl von Lymphgefäß-, und Veneninfiltrationen und einer höheren Zahl von Patienten mit Magenfrühkarzinomen, d.h. mit früheren Tumorstadien, lies sich nachweisen<sup>(81)</sup>. Darüber hinaus scheint die Infiltration mit MHC I-restriktiven, CD8-positiven T-Lymphozyten für die spezifische Tumorzellerkennung eine Rolle zu spielen<sup>(16,17)</sup>. Dieser prognostische Vorteil scheint das Ergebnis einer körpereigenen Immunreaktion gegen Tumorantigene zu sein. Es konnte gezeigt werden, dass durch lokale Expression von immunsuppressiven Zytokinen wie Interleukin-10 und TGF-beta in Magenkarzinomen die Immunantwort unterdrückt werden kann<sup>(127)</sup> bzw., dass Tumorzellen durch Sekretion von immunsuppressiven Zytokinen eine suffiziente Immunantwort verhindern<sup>(142)</sup>.

Auch bei anderen Tumorentitäten konnte eine Korrelation zwischen der Lymphozyteninfiltration und dem Gesamtüberleben gezeigt werden wie beispielsweise bei Karzinomen des Kolorektums<sup>(25,133)</sup>, des Ösophagus<sup>(155)</sup>, der Nieren<sup>(134)</sup>, der Prostata<sup>(175)</sup>, der Mamma<sup>(185)</sup> und dem Bronchialkarzinom<sup>(72)</sup>.

Das Tumorzellbudding, der Invasionstyp und die Lymphozyteninfiltration der Invasionsfront eignen sich somit offenbar als negativer prognostische Marker für das Magenkarzinom. Inwiefern diese Parameter jedoch im klinischen Alltag bzw. für die Prognoseabschätzung und Therapieentscheidungen berücksichtigt werden, bleibt abzuwarten.

### ***Syndecan-4-Expression im Magenkarzinom***

Mit der hier vorliegenden Arbeit wurde erstmals die Syndecan-4-Expression und seine Bedeutung für die Prognose in einem umfangreichen Kollektiv von 161 Magenkarzinomen untersucht. Hauptergebnisse waren dabei eine Überexpression im Vergleich zum Nichttumorgewebe, eine zonale Expression innerhalb des Karzinoms sowie eine Korrelation von hohen Syndecan-4-Expressionswerten mit klinisch-pathologischen Parametern eines fortgeschrittenen Tumorstadiums bzw. einer ungünstigen Prognose.

### ***Zonale und membranöse Expression von Syndecan-4***

In der aktuellen Literatur finden sich keine Angaben über die Syndecan-4-Expression in Magenkarzinomen. Übereinstimmend mit unseren Ergebnissen zeigen jedoch Untersuchungen zu anderen Tumorentitäten, wie beispielsweise dem malignen Melanom, dem hepatozellulären Karzinom, dem Mammakarzinom und dem Kolonkarzinom, eine Überexpression von Syndecan-4 im Karzinomgewebe im Vergleich zum nichttumorös veränderten Ursprungsgewebe<sup>(43,67,150,158,188)</sup>. In einer großen Studie an 18 Zelllinien, darunter 5 maligne Mesotheliome, 4 Adenokarzinome (u.a. Bronchial-, Colon-, Mammakarzinom) und 9 benigne Zelllinien, konnten Gulyás et al.<sup>(67)</sup> nachweisen, dass in allen malignen Zelllinien die Syndecan-4-mRNA-Konzentration im Vergleich zu den benignen Zelllinien stark erhöht war. Marzioni et al.<sup>(117)</sup> verwiesen in diesem Zusammenhang auf eine signifikant erhöhte Syndecan-4-mRNA-Konzentration in invasiven Blasenkarzinomen.

Des Weiteren ergaben unsere immunhistochemischen Analysen eine Zunahme der Syndecan-4-Expression vom Tumorzentrum zur Invasionsfront hin mit stärkster Expression in den Tumorbuds. Damit einhergehend kam es zur Verschiebung der zytoplasmatischen Expression zu einer stark ausgeprägten membranösen Expression mit Betonung des zur Invasionsfront gerichteten Zellpols. Diese differentielle Betrachtung der Tumorzonen berücksichtigt die Tumorbiologie mit höchster invasiver und metastatischer Aktivität an der Invasionsfront und stellt eine Besonderheit der Arbeit dar. Das beschriebene Expressionsmuster spricht dabei für Beteiligung von Syndecan-4 am lokalen Invasions- und Metastasierungsprozess.

Die epithelial-mesenchymale Transformation der invasiven Tumorzellen bzw. der migrierenden Tumorzellbuds umfaßt die Aufhebung der Zell-Zell-Adhäsion, die Reorganisation des Zytoskeletts mit Ausbildung von Pseudopodien, die Expression von Adhäsionsmolekülen zur Anheftung an die extrazelluläre Matrix und die Initiierung der Matrixdegradation<sup>(145)</sup>. In all diese Prozesse ist Syndecan-4 involviert.

Syndecan-4 hat als Membranprotein mit seiner extrazellulären Domäne eine Vielzahl von Bindungspartnern und Interaktionsmöglichkeiten in Hinblick auf Zellmigration und Zell-Matrix-Adhäsion<sup>(32,52,122)</sup>. Somit ist eine gesteigerte bzw. vorwiegend membranöse Expression von Syndecan-4 in Tumorzellen naheliegend. Syndecan-4 ist an der Bildung fokaler Kontakte beteiligt, ist Bindungspartner für zahlreiche Komponenten der extrazellulären Matrix und unterstützt so die Migration von Tumorzellen<sup>(108,181)</sup>. Im Rahmen der Zellmigration erfolgt die Polarisierung der Zelle durch Reorganisation des Zytoskeletts und Formierung von Pseudopodien, was durch die Syndecan-4-induzierte Aktivierung von Rho-GTPasen gesteuert werden kann<sup>(154)</sup>. Syndecan-4 ist ebenfalls an diversen intrazellulären Signalprozessen beteiligt. Des Weiteren sind die Syndecane an endozytotischen Prozessen beteiligt und können nach Clusterbildung von der Zelloberfläche entfernt und internalisiert werden, was zum Abbau fokaler Kontakte und für die Migration unabdingbar ist<sup>(171,178)</sup>. Zusätzlich ist Syndecan-4 fähig, über seine extrazelluläre Domäne tumorfördernde Wachstums- und Entzündungsmediatoren zu binden und lokal zu konzentrieren<sup>(11,31,37,62)</sup>. Besonders die Rolle von Syndecan-4 im Rahmen von Zellmigration<sup>(75,122)</sup> und der Angiogenese<sup>(43,180)</sup> könnte ein Grund für die erhöhte, Membran-betonte, zur Invasionsfront gerichtete Expression an der Invasionsfront im Vergleich zum Tumorzentrum sein, da hier die Zelldynamik am größten ist und der Tumor expandiert bzw. mit der extrazellulären Matrix und Gefäßwänden interagiert.

**Syndecan-4-Expression und klinisch-pathologische Korrelationen bzw. Prognose**

In der vorliegenden Arbeit wurde die Intensität und Quantität der Syndecan-4-Expression mittels immunreaktivem Score (IRS) ausgewertet und in Bezug zu klinisch-pathologischen Tumorparametern gesetzt, um die Rolle von Syndecan-4 im Magenkarzinom zu beurteilen. Generell ließ sich eine Überexpression von Syndecan-4 für prognostisch ungünstigere Tumorkategorien beobachten: Bei fortgeschrittener lokaler Tumorausdehnung (pT-Kategorie nach TNM-Klassifikation) nahm die Intensität der Syndecan-4-Expression zu. Ebenso zeigten die Magenkarzinome mit einer Angioinvasion, Nerveninfiltration oder mit Lymphknoten- und/oder Fernmetastasen eine höhere Expression auf als die Karzinome ohne diese Tumoreigenschaften. In allen Kategorien waren die Unterschiede an der Invasionsfront stets stärker als im Tumorzentrum ausgeprägt.

Daß eine Überexpression von Syndecan-4 im Magenkarzinom mit einer ungünstigen Prognose einhergeht, bestätigte sich darin, daß Patienten mit hohen Expressionswerten eine geringere 1-, 3- und 5-Jahresüberlebenswahrscheinlichkeit und ein kürzeres Gesamtüberleben als Patienten mit geringeren Expressionswerten aufwiesen. Die Patientengruppe mit schlechterer Prognose ließ sich v.a. durch die Expressionswerte der Invasionsfront diskriminieren.

Die Parameter Tumorausdehnung, Angio- und Nerveninfiltration, Lymphknoten- und Fernmetastasierung bedürfen der Zellmigration. Hier nimmt Syndecan-4 durch die Ausbildung fokaler Kontakte und als Bindungspartner für Komponenten der extrazellulären Matrix eine migrationsfördernde Rolle ein<sup>(108,122,181)</sup>. Daß Syndecan-4 die Tumorprognose des Magenkarzinoms am ehesten über migrationsfördernde Eigenschaften beeinflusst, wird auch durch unsere Beobachtungen zur Syndecan-4-Expression in den unterschiedlichen histologischen Tumortypen nach Laurén gestützt: Der diffuse Typ zeigte insbesondere an der Invasionsfront eine deutlich stärkere Expression als der intestinale Typ nach Laurén. Bekannt ist, daß der intestinale Typ oft mit einer expansiven Invasionsfront, d.h. einer Invasionsfront im bestehenden Zellverband mit geringerer Metastasierungsneigung und meist besserer Differenzierung, vergesellschaftet und der diffuse Typ meist mit infiltrativem Wachstum, also aggressiven Tumorzapfen und der Ausbildung von Tumorbuds, assoziiert sind. Folglich könnte die erhöhte Syndecan-4-Expression beim diffusen Typ nach Laurén zu einer erhöhten Zelldynamik und Migrationsneigung der Tumorzellen führen und so den Zusammenhang zwischen diesem histopathologischen Typ, einer vermehrten Lymphknoten- und Fernmetastasierung und einer schlechteren Prognose begründen.

Die Annahme, daß Syndecan-4 im Magenkarzinom migrations- und invasionsfördernd wirkt wird auch dadurch unterstützt, da mit vorliegender Arbeit insbesondere eine hohe Syndecan-4-Expression in Karzinomen mit positivem Budding bzw. in den Tumorzellbuds selbst nachgewiesen worden ist. Unabhängig vom histologischen Subtyp nach Laurén verfügen offenbar Karzinome über die Bildung Syndecan-4-positiver Tumorzellbuds über aggressivere Migrationseigenschaften, was wiederum in einer schlechteren Prognose resultiert.

Ein Syndecan-4-Mangel führt zudem zu einer verminderten Endothelzellmigration und damit zu einer defizitären Angiogenese, welche für Tumorwachstum ebenfalls essentiell ist<sup>(43,180)</sup>. Eine hohe Syndecan-4-Expression im Seminomen des Hodens steht so in Zusammenhang mit einer gesteigerten Angiogenese<sup>(170)</sup>. Die tumor-assoziierte Neovaskularisation war jedoch nicht Gegenstand der Untersuchungen dieser Arbeit.

Aktuell gibt es noch keine Veröffentlichungen bezüglich der Syndecan-4-Expression in Magenkarzinomen. Auch existieren nur wenige Studien zur prognostischen Bedeutung einer Syndecan-4-Überexpression in anderen malignen Tumoren. Mundhenke et al.<sup>(130)</sup> beschrieb einen signifikanten Anstieg der Syndecan-4-Expression im Vergleich zum Nichttumorgewebe in immunhistochemisch aufgearbeiteten Mammakarzinomen ( $p=0,003$ ). Hier wurde besonders die hohe Expression in infiltrierenden Tumorzellen der Invasionsfront herausgestellt. Baba et al.<sup>(3)</sup> konnten ebenfalls einen signifikanten Anstieg der Syndecan-4-Konzentration in Mammakarzinomen feststellen. Hier korrelierte das Syndecan-4-Level mit der Tumorausdehnung, dem Grading und einem negativen Östrogen-Rezeptorstatus.

Funktionelle Studien, die die genaue Rolle von Syndecan-4 für die Tumorinvasion und –metastasierung untersuchen, gibt es derzeit nur spärlich. Anhand einer Leberkrebszellreihe wiesen Sutton et al.<sup>(166)</sup> nicht nur eine erhöhte Syndecan-4-Konzentration nach, sondern auch, dass eine SDF-1 (stromal cell-derived factor-1) induzierte Migration und Infiltration der Tumorzellen unbedingt Syndecan-4-abhängig ist, und eine Syndecan-4-Downregulation den biologischen Effekt von SDF-1 reduziert. Untersuchungen an der Zelllinie eines metastasierten malignen Melanoms kamen zu dem Ergebnis, dass ein erhöhter Syndecan-4-Level durch Aktivierung von Wnt5A, einem Signalprotein der Wnt-Familie, zu einer erhöhten Metastasierungsneigung der Zellen führt<sup>(136)</sup>. Auch konnte hier gezeigt werden, dass eine Downregulation von Syndecan-4 eine gehemmte Motilität und Invasionsneigung der Melanomzellen zur Folge hat. Des Weiteren konnten Zvibel et al.<sup>(193)</sup> anhand zweier Kolonkarzinomzelllinien zeigen, dass Syndecan-4 signifikant die Konzentrationen von EGF (epidermal growth

factor) B2 und B3 erhöht, welche ihrerseits zu einer erhöhten Lebermetastasierung führen. Eine weitere Studie wies nach, dass Tenascin-C als Adhäsionsmodulierendes Protein der extrazellulären Matrix durch Interaktion mit der FNIII13-Bindungsstelle von Syndecan-4 dessen aktivierende Wirkung auf Fibronectin hemmt und somit eine verstärkte Proliferation von Glioblastom- und Brustkrebszellen zur Folge hat<sup>(78)</sup>.

Ungeklärt bleibt die Ursache und funktionelle Bedeutung des in der vorliegenden Arbeit nachgewiesenen Zusammenhanges zwischen einer hohen Syndecan-4-Expression der Tumorzellen und einer fehlenden oder geringen Lymphozyteninfiltration der Invasionsfront. Es ist bekannt, daß Syndecan-4 über seine Ektodomäne verschiedene Zytokine wie Interleukin-2, -3, -4, -5, -7, -8, -10, -12, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , GM-CSF oder IFN- $\gamma$  lokal konzentrieren und über das Shedding der Ektodomäne, das entzündliche Tumormikromilieu einschließlich der Zusammensetzung der Tumor-assoziierten Immunzellen modulieren, die antitumoralen Wirtsmechanismen beeinflussen und so die Tumorprogression fördern kann<sup>(62,85)</sup>. Beispielsweise hat lokal konzentriertes TGF- $\beta$  eine immunsuppressive und antiinflammatorische Wirkung und ist der Schlüsselregulator für die Proliferation und Funktion der regulatorischen T-Zellen, die die antitumorale Immunantwort des Wirtes unterdrücken<sup>(21,96)</sup>. Zudem wurde nachgewiesen, daß es die Invasion und Metastasierung gastraler Tumorzellen durch Aktivierung des JNK- und ERK-Signalweges und die Entwicklung eines diffusen Zelltypes fördert und zur vermehrten Migration und Invasion des Magenkarzinoms beiträgt<sup>(25,32)</sup>. Während es zahlreiche Untersuchungen zum Zusammenhang von Syndecan-4-Expression und der Funktion von Tumor-assoziierten Makrophagen und T- gibt<sup>(21,39,93,96)</sup>, findet sich keine aktuelle Literatur zur Regulation von Lymphozytenmigration und -funktion über Syndecan-4. Möglich ist, daß die Lymphozytendichte der Invasionsfront über Syndecan-4-vermittelte, Zytokin-induzierte Prozesse beeinflusst wird. Denkbar ist jedoch auch, daß zwischen hoher Syndecan-4-Expression und geringer Lymphozytendichte lediglich ein indirekter Zusammenhang besteht, da beide Faktoren mit einer schlechteren Prognose assoziiert sind<sup>(1,71,95,157)</sup>.

Die wenigen in der Literatur verfügbaren Studien zu Syndecan-4 und seiner Rolle für die Tumorprogression erlauben gegebenenfalls einen Rückschluss auf die Rolle von Syndecan-4 im Magenkarzinom. Jedoch lässt sich dieser Zusammenhang nur durch weiterführende funktionelle Studien zur Syndecan-4-abhängigen Migration und Invasion von Magenkarzinomzellen klären.

## 6. Zusammenfassung

Das Magenkarzinom ist bei Männern die 5. häufigste und bei Frauen die 8. häufigste Krebserkrankung und ist für 5% aller Krebstodesfälle verantwortlich. Die mittlere 5-Jahres-Überlebensrate ist mit 25-30% weiterhin ungünstig. Zur Entstehung des Magenkarzinoms trägt neben genetischen Veränderungen, Umweltfaktoren, Ernährungs- und Lebensstil vor allem eine *Helicobacter-pylori*-induzierte, chronische Gastritis bei. Auf Grund einer forcierten *Helicobacter*-Eradikation ist die Inzidenz seit Jahren rückläufig.

Das in dieser Studie untersuchte Syndecan-4 ist im Rahmen der Tumorgenese besonders durch seine Funktion für die Zellmigration, Zell-Matrix-Adhäsion und Angiogenese von Bedeutung. Syndecan-4 ist ein Bestandteil fokaler Kontakte und ist Bindungspartner zahlreicher Komponenten der extrazellulären Matrix und unterstützt so die Migration verschiedenster Zelltypen. Seine Überexpression ist für verschiedene Tumorentitäten beschrieben worden. Zur Expression von Syndecan-4 im Magenkarzinom liegen jedoch keine Daten vor.

In der vorliegenden Arbeit wurden die prognostische Bedeutung von morphologischen Parametern und der Syndecan-4-Expression von 161 Magenkarzinomen untersucht. Dabei erwiesen sich die morphologischen Parameter der Invasionsfront - Infiltrationstyp, Lymphozyteninfiltration und Tumorbudding – als Prognosefaktoren. Der infiltrative Invasionsstyp, eine fehlende oder geringe Lymphozyteninfiltration und positives Tumorbudding korrelierten sowohl mit einer lokal fortgeschrittenen Tumorausbreitung, einer Lymphknoten- und Fernmetastasierung, einer Venen-, Lymphgefäß und Nerveninfiltration und mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium nach UICC als auch mit einem geringeren 1-, 3- und 5-Jahresüberleben sowie Gesamtüberleben im Vergleich zu den prognostisch günstigeren Faktoren expansiver Infiltrationstyp, positive Lymphozyteninfiltration der Invasionsfront oder fehlendem Tumorbudding.

Die Expressionsanalyse zu Syndecan-4 erfolgte immunhistochemisch an unauffälliger Magenmukosa sowie an Tissue-Microarrays und an transmuralen Schnittpräparaten der Karzinome, die eine getrennte Betrachtung von Tumorzentrum und Invasionsfront ermöglichten. Im Vergleich zur nichttumorösen Magenmukosa fand sich im Tumorgewebe eine Überexpression von Syndecan-4. Im Karzinom ließ sich eine zonale

Expression, das heißt eine Zunahme der Syndecan-4-Expression vom Tumorzentrum zur Invasionsfront hin mit stärkster Expression in den Tumorbuds nachweisen. Diese zonale Expression lag auch in den Lymphknotenmetastasen vor, wobei die Syndecan-4-Expression am stärksten im Bereich der kapselüberschreitenden Infiltrate war. Die semiquantitativ mittels immunreaktivem Score erfaßte immunhistochemische Expression korrelierte dabei mit der per ELISA und LC-PCR ermittelten Syndecan-4-Protein- und -RNA-Expression. Eine Überexpression von Syndecan-4 korrelierte mit prognostisch ungünstigeren Tumorkategorien wie einer fortgeschrittenen lokalen Tumorausdehnung, einer Venen-, Lymphgefäß- oder Nerveninfiltration bzw. einer Lymphknoten- sowie Fernmetastasierung. Des Weiteren ließ sich für Patienten mit hoher Syndecan-4-Expression ein kürzeres 1-, 3- und 5-Jahresüberleben sowie Gesamtüberleben im Vergleich zu Patienten mit geringen Expressionswerten im Karzinom ermitteln, wobei die Werte der Invasionsfront die höhere prognostische Aussagekraft hatten.

Aufgrund des morphologischen Expressionsmusters und seiner Korrelationen mit prognostisch ungünstigen klinisch-pathologischen Parametern kann angenommen werden, daß Syndecan-4-Expression zur lokalen Invasion und Metastasierung des Magenkarzinoms beiträgt. Zur Bestätigung dieser These bedarf es jedoch weiterführender funktioneller Untersuchungen.

**LITERATURVERZEICHNIS**

1. Akiyoshi, T.; Koba, F.; Arinaga, S.; Wada, T.; Tsuji, H. Cell-mediated cytotoxic activity of spleen cells from patients with gastric carcinoma. *The Japanese journal of surgery*. 18. 164–171 (1988).
2. Atkins, D.; Reiffen, K.-A.; Tegtmeier, C. L.; Winther, H.; Bonato, M. S.; Störkel, S. Immunohistochemical detection of EGFR in paraffin-embedded tumor tissues: variation in staining intensity due to choice of fixative and storage time of tissue sections. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*. 52. 893–901 (2004).
3. Baba, F.; Swartz, K.; van Buren, R.; Eickhoff, J.; Zhang, Y.; Wolberg, W.; Friedl, A. Syndecan-1 and syndecan-4 are overexpressed in an estrogen receptor-negative, highly proliferative breast carcinoma subtype. *Breast cancer research and treatment*. 98. 91–98 (2006).
4. Baciú, P. C.; Goetinck, P. F. Protein kinase C regulates the recruitment of syndecan-4 into focal contacts. *Molecular biology of the cell*. 6. 1503–1513 (1995).
5. Baciú, P. C.; Saoncella, S.; Lee, S. H.; Denhez, F.; Leuthardt, D.; Goetinck, P. F. Syndesmos, a protein that interacts with the cytoplasmic domain of syndecan-4, mediates cell spreading and actin cytoskeletal organization. *Journal of cell science*. 113 Pt 2. 315–324 (2000).
6. Bass, M. D.; Humphries, M. J. Cytoplasmic interactions of syndecan-4 orchestrate adhesion receptor and growth factor receptor signalling. *The Biochemical journal*. 368. 1–15 (2002).
7. Bass, M. D.; Roach, K. A.; Morgan, M. R.; Mostafavi-Pour, Z.; Schoen, T.; Muramatsu, T.; Mayer, U.; Ballestrem, C.; Spatz, J. P.; Humphries, M. J. Syndecan-4-dependent Rac1 regulation determines directional migration in response to the extracellular matrix. *The Journal of cell biology*. 177. 527–538 (2007).
8. Bayer-Garner, I. B.; Sanderson, R. D.; Dhodapkar, M. V.; Owens, R. B.; Wilson, C. S. Syndecan-1 (CD138) immunoreactivity in bone marrow biopsies of multiple myeloma: shed syndecan-1 accumulates in fibrotic regions. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc.* 14. 1052–1058 (2001).
9. Beauvais, D. M.; Rapraeger, A. C. Syndecans in tumor cell adhesion and signaling. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E*. 2. 3 (2004).
10. Becker, K.; Mueller, J. D.; Schulmacher, C.; Ott, K.; Fink, U.; Busch, R.; Böttcher, K.; Siewert, J. R.; Höfler, H. Histomorphology and grading of regression in gastric carcinoma treated with neoadjuvant chemotherapy. *Cancer*. 98. 1521–1530 (2003).

11. Bernfield, M.; Kokenyesi, R.; Kato, M.; Hinkes, M. T.; Spring, J.; Gallo, R. L.; Lose, E. J. Biology of the syndecans: a family of transmembrane heparan sulfate proteoglycans. *Annual review of cell biology*. 8. 365–393 (1992).
12. Bernfield, M.; Götte, M.; Park, P. W.; Reizes, O.; Fitzgerald, M. L.; Lincecum, J.; Zako, M. Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Annual review of biochemistry*. 68. 729–777 (1999).
13. Bilici, A.; Seker, M.; Ustaalioglu, Bala Basak Oven; Kefeli, U.; Yildirim, E.; Yavuzer, D.; Aydin, F. M.; Salepci, T.; Oncel, M.; Gumus, M. Prognostic significance of perineural invasion in patients with gastric cancer who underwent curative resection. *Annals of surgical oncology*. 17. 2037–2044 (2010).
14. Bobardt, M. D.; Saphire, Andrew C S; Hung, H.-C.; Yu, X.; Van der Schueren, Bernadette; Zhang, Z.; David, G.; Gallay, P. A. Syndecan captures, protects, and transmits HIV to T lymphocytes. *Immunity*. 18. 27–39 (2003).
15. Bokhari, S. M.; Zhou, L.; Karasek, M. A.; Paturi, S. G.; Chaudhuri, V. Regulation of skin microvasculature angiogenesis, cell migration, and permeability by a specific inhibitor of PKC $\alpha$ . *The Journal of investigative dermatology*. 126. 460–467 (2006).
16. Boon, T.; Cerottini, J. C.; Van den Eynde, B; van der Bruggen, P; van Pel, A. Tumor antigens recognized by T lymphocytes. *Annual review of immunology*. 12. 337–365 (1994).
17. Brändle, D.; Bresseur, F.; Weynants, P.; Boon, T.; Van den Eynde, B. A mutated HLA-A2 molecule recognized by autologous cytotoxic T lymphocytes on a human renal cell carcinoma. *The Journal of experimental medicine*. 183. 2501–2508 (1996).
18. Brown, M.; Sillah, K.; Griffiths, E. A.; Swindell, R.; West, C. M.; Page, R. D.; Welch, I. M.; Pritchard, S. A. Tumour budding and a low host inflammatory response are associated with a poor prognosis in oesophageal and gastro-oesophageal junction cancers. *Histopathology*. 56. 893–899 (2010).
19. Bubendorf, L.; Nocito, A.; Moch, H.; Sauter, G. Tissue microarray (TMA) technology: miniaturized pathology archives for high-throughput in situ studies. *The Journal of pathology*. 195. 72–79 (2001).
20. Carey, D. J. Syndecans: multifunctional cell-surface co-receptors. *The Biochemical journal*. 327 (Pt 1). 1–16 (1997).
21. Chen, W.; Wahl, S. M. TGF- $\beta$ : the missing link in CD4+CD25+ regulatory T cell-mediated immunosuppression. *Cytokine & growth factor reviews*. 14. 85–89 (2003).

22. Choi, S.; Lee, E.; Kwon, S.; Park, H.; Yi, J. Y.; Kim, S.; Han, I.-O.; Yun, Y.; Oh, E.-S. Transmembrane domain-induced oligomerization is crucial for the functions of syndecan-2 and syndecan-4. *The Journal of biological chemistry*. 280. 42573–42579 (2005).
23. Chua, C. C.; Rahimi, N.; Forsten-Williams, K.; Nugent, M. A. Heparan sulfate proteoglycans function as receptors for fibroblast growth factor-2 activation of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2. *Circulation research*. 94. 316–323 (2004).
24. Cimerman, M.; Repse, S.; Jelenc, F.; Omejc, M.; Bitenc, M.; Lamovec, J. Comparison of Lauren's, Ming's and WHO histological classifications of gastric cancer as a prognostic factor for operated patients. *International surgery*. 79. 27–32 (1994).
25. Coca, S.; Perez-Piqueras, J.; Martinez, D.; Colmenarejo, A.; Saez, M. A.; Vallejo, C.; Martos, J. A.; Moreno, M. The prognostic significance of intratumoral natural killer cells in patients with colorectal carcinoma. *Cancer*. 79. 2320–2328 (1997).
26. Cornelison, D D W; Wilcox-Adelman, S. A.; Goetinck, P. F.; Rauvala, H.; Rapraeger, A. C.; Olwin, B. B. Essential and separable roles for Syndecan-3 and Syndecan-4 in skeletal muscle development and regeneration. *Genes & development*. 18. 2231–2236 (2004).
27. Correa, P. Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process--First American Cancer Society Award Lecture on Cancer Epidemiology and Prevention. *Cancer research*. 52. 6735–6740 (1992).
28. Correa, P.; Piazuelo, M. B. Helicobacter pylori Infection and Gastric Adenocarcinoma. *US gastroenterology & hepatology review*. 7. 59–64 (2011).
29. Correa, P.; Piazuelo, M. B. The gastric precancerous cascade. *Journal of digestive diseases*. 13. 2–9 (2012).
30. Correa, P. Helicobacter pylori and gastric cancer: state of the art. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. 5. 477–481 (1996).
31. Couchman, J. R.; Woods, A. Syndecans, signaling, and cell adhesion. *Journal of cellular biochemistry*. 61. 578–584 (1996).
32. Couchman, J. R. Syndecans: proteoglycan regulators of cell-surface microdomains? *Nature reviews. Molecular cell biology*. 4. 926–937 (2003).
33. Cunningham, D.; Allum, W. H.; Stenning, S. P.; Thompson, J. N.; Van de Velde, Cornelis J H; Nicolson, M.; Scarffe, J. H.; Lofts, F. J.; Falk, S. J.; Iveson, T. J.; Smith, D. B.; Langley, R. E.; Verma, M.; Weeden, S.; Chua, Y. J.; MAGIC Trial Participants. Perioperative chemotherapy versus surgery alone for resectable gastroesophageal cancer. *The New England journal of medicine*. 355. 11–20 (2006).

34. David, G. Integral membrane heparan sulfate proteoglycans. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 7. 1023–1030 (1993).
35. David, G.; Bai, X. M.; Van der Schueren, B; Cassiman, J. J.; Van den Berghe, H. Developmental changes in heparan sulfate expression: in situ detection with mAbs. *The Journal of cell biology*. 119. 961–975 (1992).
36. David, G.; Van der Schueren, B; Marynen, P.; Cassiman, J. J.; Van den Berghe, H. Molecular cloning of amphiglycan, a novel integral membrane heparan sulfate proteoglycan expressed by epithelial and fibroblastic cells. *The Journal of cell biology*. 118. 961–969 (1992).
37. Delehedde, M.; Lyon, M.; Sergeant, N.; Rahmoune, H.; Fernig, D. G. Proteoglycans: pericellular and cell surface multireceptors that integrate external stimuli in the mammary gland. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*. 6. 253–273 (2001).
38. Dobra, K.; Nurminen, M.; Hjerpe, A. Growth factors regulate the expression profile of their syndecan co-receptors and the differentiation of mesothelioma cells. *Anticancer research*. 23. 2435–2444 (2003).
39. Dodge, G. R.; Kovalszky, I.; Hassell, J. R.; Iozzo, R. V. Transforming growth factor beta alters the expression of heparan sulfate proteoglycan in human colon carcinoma cells. *The Journal of biological chemistry*. 265. 18023–18029 (1990).
40. Donati, V.; Faviana, P.; Dell'omodarme, M.; Prati, M. C.; Camacci, T.; Ieso, K. de; Giannini, R.; Lucchi, M.; Mussi, A.; Pingitore, R.; Basolo, F.; Fontanini, G. Applications of tissue microarray technology in immunohistochemistry: a study on c-kit expression in small cell lung cancer. *Human pathology*. 35. 1347–1352 (2004).
41. Dovas, A.; Yoneda, A.; Couchman, J. R. PKCbeta-dependent activation of RhoA by syndecan-4 during focal adhesion formation. *Journal of cell science*. 119. 2837–2846 (2006).
42. Duffy, M. J.; McGowan, P. M.; Gallagher, W. M. Cancer invasion and metastasis: changing views. *The Journal of pathology*. 214. 283–293 (2008).
43. Echtermeyer, F.; Streit, M.; Wilcox-Adelman, S.; Saoncella, S.; Denhez, F.; Detmar, M.; Goetinck, P. Delayed wound repair and impaired angiogenesis in mice lacking syndecan-4. *The Journal of clinical investigation*. 107. R9-R14 (2001).
44. El-Omar, E. M.; Carrington, M.; Chow, W. H.; McColl, K. E.; Bream, J. H.; Young, H. A.; Herrera, J.; Lissowska, J.; Yuan, C. C.; Rothman, N.; Lanyon, G.; Martin, M.; Fraumeni, J. F.; Rabkin, C. S. The role of interleukin-1 polymorphisms in the pathogenesis of gastric cancer. *Nature*. 412. 99 (2001).

45. El-Zimaity, Hala M T; Ota, H.; Graham, D. Y.; Akamatsu, T.; Katsuyama, T. Patterns of gastric atrophy in intestinal type gastric carcinoma. *Cancer*. 94. 1428–1436 (2002).
46. 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. 40764–40770 (2003).
47. Endoh, Y.; Tamura, G.; Motoyama, T.; Ajioka, Y.; Watanabe, H. Well-differentiated adenocarcinoma mimicking complete-type intestinal metaplasia in the stomach. *Human pathology*. 30. 826–832 (1999).
48. Ethell, I. M.; Hagihara, K.; Miura, Y.; Irie, F.; Yamaguchi, Y. Synbindin, A novel syndecan-2-binding protein in neuronal dendritic spines. *The Journal of cell biology*. 151. 53–68 (2000).
49. Etienne-Manneville, S.; Hall, A. Rho GTPases in cell biology. *Nature*. 420. 629–635 (2002).
50. Fears, C. Y.; Gladson, C. L.; Woods, A. Syndecan-2 is expressed in the microvasculature of gliomas and regulates angiogenic processes in microvascular endothelial cells. *The Journal of biological chemistry*. 281. 14533–14536 (2006).
51. Fox, J. G.; Dangler, C. A.; Taylor, N. S.; King, A.; Koh, T. J.; Wang, T. C. High-salt diet induces gastric epithelial hyperplasia and parietal cell loss, and enhances *Helicobacter pylori* colonization in C57BL/6 mice. *Cancer research*. 59. 4823–4828 (1999).
52. Freissler, E.; Meyer auf der Heyde, A; David, G.; Meyer, T. F.; Dehio, C. Syndecan-1 and syndecan-4 can mediate the invasion of OpaHSPG-expressing *Neisseria gonorrhoeae* into epithelial cells. *Cellular microbiology*. 2. 69–82 (2000).
53. Fukao, A.; Tsubono, Y.; Tsuji, I.; Hlsamichi, S.; Sugahara, N.; Takano, A. The evaluation of screening for gastric cancer in Miyagi Prefecture, Japan: a population-based case-control study. *International journal of cancer. Journal international du cancer*. 60. 45–48 (1995).
54. Fuster, M. M.; Wang, L.; Castagnola, J.; Sikora, L.; Reddi, K.; Lee, Phillip H A; Radek, K. A.; Schuksz, M.; Bishop, J. R.; Gallo, R. L.; Sriramarao, P.; Esko, J. D. Genetic alteration of endothelial heparan sulfate selectively inhibits tumor angiogenesis. *The Journal of cell biology*. 177. 539–549 (2007).
55. Gabbert, H. E.; Meier, S.; Gerharz, C. D.; Hommel, G. Incidence and prognostic significance of vascular invasion in 529 gastric-cancer patients. *International journal of cancer. Journal international du cancer*. 49. 203–207 (1991).
56. Gallay, P. Syndecans and HIV-1 pathogenesis. *Microbes and infection / Institut Pasteur*. 6. 617–622 (2004).

57. Gallo, A.; Cha, C. Updates on esophageal and gastric cancers. *World journal of gastroenterology : WJG*. 12. 3237–3242 (2006).
58. Gallo, R.; Kim, C.; Kokenyesi, R.; Adzick, N. S.; Bernfield, M. Syndecans-1 and -4 are induced during wound repair of neonatal but not fetal skin. *The Journal of investigative dermatology*. 107. 676–683 (1996).
59. Gallo, R. L.; 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 91. 11035–11039 (1994).
60. Gao, Y.; Li, M.; Chen, W.; Simons, M. Synectin, syndecan-4 cytoplasmic domain binding PDZ protein, inhibits cell migration. *Journal of cellular physiology*. 184. 373–379 (2000).
61. Goldenring, J. R.; Nomura, S. Differentiation of the gastric mucosa III. Animal models of oxyntic atrophy and metaplasia. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*. 291. G999-1004 (2006).
62. Götte, M. Syndecans in inflammation. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 17. 575–591 (2003).
63. Graham, D. Y.; Shiotani, A. The time to eradicate gastric cancer is now. *Gut*. 54. 735–738 (2005).
64. Granés, F.; Urena, J. M.; Rocamora, N.; Vilaró, S. Ezrin links syndecan-2 to the cytoskeleton. *Journal of cell science*. 113 (Pt 7). 1267–1276 (2000).
65. Greene, D. K.; Tumova, S.; Couchman, J. R.; Woods, A. Syndecan-4 associates with alpha-actinin. *The Journal of biological chemistry*. 278. 7617–7623 (2003).
66. Grootjans, J. J.; Zimmermann, P.; Reekmans, G.; Smets, A.; Degeest, G.; Dürr, J.; David, G. Syntenin, a PDZ protein that binds syndecan cytoplasmic domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 94. 13683–13688 (1997).
67. Gulyás, M.; Hjerpe, A. Proteoglycans and WT1 as markers for distinguishing adenocarcinoma, epithelioid mesothelioma, and benign mesothelium. *The Journal of pathology*. 199. 479–487 (2003).
68. Haenszel, W.; Kurihara, M.; Locke, F. B.; Shimuzu, K.; Segi, M. Stomach cancer in Japan. *Journal of the National Cancer Institute*. 56. 265–274 (1976).
69. Hamilton SR, Aaltonen LA. Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System. World Health Organization Classification of Tumours Lyon: IARC Press, (2000).

70. Hansson, L. E.; Engstrand, L.; Nyrén, O.; Evans, D. J.; Lindgren, A.; Bergström, R.; Andersson, B.; Athlin, L.; Bendtsen, O.; Tracz, P. *Helicobacter pylori* infection: independent risk indicator of gastric adenocarcinoma. *Gastroenterology*. 105. 1098–1103 (1993).
71. Heys, S. D.; Eremin, O. The relevance of tumor draining lymph nodes in cancer. *Surgery, gynecology & obstetrics*. 174. 533–540 (1992).
72. Hiraoka, K.; Miyamoto, M.; Cho, Y.; Suzuoki, M.; Oshikiri, T.; Nakakubo, Y.; Itoh, T.; Ohbuchi, T.; Kondo, S.; Kato, H. Concurrent infiltration by CD8+ T cells and CD4+ T cells is a favourable prognostic factor in non-small-cell lung carcinoma. *British journal of cancer*. 94. 275–280 (2006).
73. Hornig D, Hermanek P, Gall FP. The Significance of the Extent of Proximal Margins of Clearance in Gastric Cancer Surgery. *Scnad J Gastroenterol*; 22: 69–71 (1987).
74. Horowitz, A.; Tkachenko, E.; Simons, M. Fibroblast growth factor-specific modulation of cellular response by syndecan-4. *The Journal of cell biology*. 157. 715–725 (2002).
75. Horowitz, A.; Simons, M. Phosphorylation of the cytoplasmic tail of syndecan-4 regulates activation of protein kinase Calpha. *The Journal of biological chemistry*. 273. 25548–25551 (1998).
76. Horowitz, A.; Tkachenko, E.; Simons, M. Fibroblast growth factor-specific modulation of cellular response by syndecan-4. *The Journal of cell biology*. 157. 715–725 (2002).
77. Hu, P. J.; Mitchell, H. M.; Li, Y. Y.; Zhou, M. H.; Hazell, S. L. Association of *Helicobacter pylori* with gastric cancer and observations on the detection of this bacterium in gastric cancer cases. *The American journal of gastroenterology*. 89. 1806–1810 (1994).
78. Huang, W.; Chiquet-Ehrismann, R.; Moyano, J. V.; Garcia-Pardo, A.; Orend, G. Interference of tenascin-C with syndecan-4 binding to fibronectin blocks cell adhesion and stimulates tumor cell proliferation. *Cancer research*. 61. 8586–8594 (2001).
79. Imagawa, S.; Yoshihara, M.; Ito, M.; Yoshida, S.; Wada, Y.; Tatsugami, M.; Takamura, A.; Tanaka, S.; Haruma, K.; Chayama, K. Evaluation of gastric cancer risk using topography of histological gastritis: a large-scaled cross-sectional study. *Digestive diseases and sciences*. 53. 1818–1823 (2008).
80. Inokuchi K, Sugimachi K. Growth patterns of gastric cancer. In: Nishi M, Ichikawa H, Nakajima T, Maruyama K, Tahara E (eds) *Gastric Cancer*. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp 88-101 (1993)

81. Ishigami, S.; Natsugoe, S.; Tokuda, K.; Nakajo, A.; Che, X.; Iwashige, H.; Aridome, K.; Hokita, S.; Aikou, T. Prognostic value of intratumoral natural killer cells in gastric carcinoma. *Cancer*. 88. 577–583 (2000).
82. Ishiguro, K.; Kadomatsu, K.; Kojima, T.; Muramatsu, H.; Tsuzuki, S.; Nakamura, E.; Kusugami, K.; Saito, H.; Muramatsu, T. Syndecan-4 deficiency impairs focal adhesion formation only under restricted conditions. *The Journal of biological chemistry*. 275. 5249–5252 (2000).
83. Ishiguro, K.; Kadomatsu, K.; Kojima, T.; Muramatsu, H.; Nakamura, E.; Ito, M.; Nagasaka, T.; Kobayashi, H.; Kusugami, K.; Saito, H.; Muramatsu, T. Syndecan-4 deficiency impairs the fetal vessels in the placental labyrinth. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*. 219. 539–544 (2000).
84. Ishiguro, K.; Kojima, T.; Muramatsu, T. Syndecan-4 as a molecule involved in defense mechanisms. *Glycoconjugate journal*. 19. 315–318 (2002).
85. Ishiguro, K.; Kadomatsu, K.; Kojima, T.; Muramatsu, H.; Iwase, M.; Yoshikai, Y.; Yanada, M.; Yamamoto, K.; Matsushita, T.; Nishimura, M.; Kusugami, K.; Saito, H.; Muramatsu, T. Syndecan-4 deficiency leads to high mortality of lipopolysaccharide-injected mice. *The Journal of biological chemistry*. 276. 47483–47488 (2001).
86. Isobe, Y.; Nashimoto, A.; Akazawa, K.; Oda, I.; Hayashi, K.; Miyashiro, I.; Katai, H.; Tsujitani, S.; Kodera, Y.; Seto, Y.; Kaminishi, M. Gastric cancer treatment in Japan: 2008 annual report of the JGCA nationwide registry. *Gastric cancer : official journal of the International Gastric Cancer Association and the Japanese Gastric Cancer Association*. 14. 301–316 (2011).
87. Jang, J.-H.; Beron, R. I.; Ahn, H. S.; Kong, S.-H.; Lee, H.-J.; Kim, W.-H.; Lee, K. U.; Yang, H.-K. Clinicopathological Features of Upper Third Gastric Cancer during a 21-Year Period (Single Center Analysis). *Journal of gastric cancer*. 10. 212–218 (2010).
88. Jass, J. R.; Filipe, M. I. Sulphomucins and precancerous lesions of the human stomach. *Histopathology*. 4. 271–279 (1980).
89. Jass, J. R.; Love, S. B.; Northover, J. M. A new prognostic classification of rectal cancer. *Lancet*. 1. 1303–1306 (1987).
90. Jechorek D et al. Increased invasive potential of colorectal carcinomas expressing Syndecan-4. In preparation.
91. Jemal, A.; Siegel, R.; Ward, E.; Hao, Y.; Xu, J.; Thun, M. J. Cancer statistics, 2009. *CA: a cancer journal for clinicians*. 59. 225–249 (2009).
92. Kakinoki, R.; Kushima, R.; Matsubara, A.; Saito, Y.; Okabe, H.; Fujiyama, Y.; Hattori, T. Re-evaluation of histogenesis of gastric carcinomas: a comparative histopathological study between *Helicobacter pylori*-negative and *H. pylori*-positive cases. *Digestive diseases and sciences*. 54. 614–620 (2009).

93. Kaler, P.; Augenlicht, L.; Klampfer, L. Macrophage-derived IL-1 $\beta$  stimulates Wnt signaling and growth of colon cancer cells: a crosstalk interrupted by vitamin D3. *Oncogene*. 28. 3892–3902 (2009).
94. Karamitopoulou, E.; Gloor, B. Tumour budding is a strong and independent prognostic factor in pancreatic cancer. Reply to comment. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*. 49. 2458–2459 (2013).
95. Karimine, N.; Nanbara, S.; Arinaga, S.; Asoh, T.; Ueo, H.; Akiyoshi, T. Lymphokine-activated killer cell activity of peripheral blood, spleen, regional lymph node, and tumor infiltrating lymphocytes in gastric cancer patients. *Journal of surgical oncology*. 55. 179–185 (1994).
96. Kawaida, H.; Kono, K.; Takahashi, A.; Sugai, H.; Mimura, K.; Miyagawa, N.; Omata, H.; Ooi, A.; Fujii, H. Distribution of CD4+CD25<sup>high</sup> regulatory T-cells in tumor-draining lymph nodes in patients with gastric cancer. *The Journal of surgical research*. 124. 151–157 (2005).
97. Keller, G.; Rotter, M.; Vogelsang, H.; Bischoff, P.; Becker, K. F.; Mueller, J.; Brauch, H.; Siewert, J. R.; Höfler, H. Microsatellite instability in adenocarcinomas of the upper gastrointestinal tract. Relation to clinicopathological data and family history. *The American journal of pathology*. 147. 593–600 (1995).
98. Kim, C. W.; Goldberger, O. A.; Gallo, R. L.; Bernfield, M. Members of the syndecan family of heparan sulfate proteoglycans are expressed in distinct cell-, tissue-, and development-specific patterns. *Molecular biology of the cell*. 5. 797–805 (1994).
99. Koelzer, V. H.; Langer, R.; Zlobec, I.; Lugli, A. Tumor budding in upper gastrointestinal carcinomas. *Frontiers in oncology*. 4. 216 (2014).
100. Kononen, J.; Bubendorf, L.; Kallioniemi, A.; Bärklund, M.; Schraml, P.; Leighton, S.; Torhorst, J.; Mihatsch, M. J.; Sauter, G.; Kallioniemi, O. P. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nature medicine*. 4. 844–847 (1998).
101. Koo, B.-K.; Jung, Y. S.; Shin, J.; Han, I.; Mortier, E.; Zimmermann, P.; Whiteford, J. R.; Couchman, J. R.; Oh, E.-S.; Lee, W. Structural basis of syndecan-4 phosphorylation as a molecular switch to regulate signaling. *Journal of molecular biology*. 355. 651–663 (2006).
102. Kunisaki, C.; Makino, H.; Kimura, J.; Takagawa, R.; Kosaka, T.; Ono, H. A.; Akiyama, H.; Fukushima, T.; Nagahori, Y.; Takahashi, M. Impact of lymphovascular invasion in patients with stage I gastric cancer. *Surgery*. 147. 204–211 (2010).
103. La Vecchia, C.; Negri, E.; Franceschi, S.; Gentile, A. Family history and the risk of stomach and colorectal cancer. *Cancer*. 70. 50–55 (1992).

104. Lauren, P. The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so called- intestinal type carcinoma. An attempt at a histo-clinical classification. *Acta pathologica et microbiologica Scandinavica*. 64. 31–49 (1965).
105. Lazăr, D.; Tăban, S.; Sporea, I.; Dema, A.; Cornianu, M.; Lazăr, E.; Goldiș, A.; Vernic, C. Gastric cancer: correlation between clinicopathological factors and survival of patients (III). *Romanian journal of morphology and embryology = Revue roumaine de morphologie et embryologie*. 50. 369–379 (2009).
106. Lazăr, D.; Tăban, S.; Sporea, I.; Dema, A.; Cornianu, M.; Lazăr, E.; Goldiș, A.; Rațiu, I.; Vernic, C. The immunohistochemical expression of the p53-protein in gastric carcinomas. Correlation with clinicopathological factors and survival of patients. *Romanian journal of morphology and embryology = Revue roumaine de morphologie et embryologie*. 51. 249–257 (2010).
107. Li, L.; Couse, T. L.; Deleon, H.; Xu, C. P.; Wilcox, J. N.; Chaikof, E. L. Regulation of syndecan-4 expression with mechanical stress during the development of angioplasty-induced intimal thickening. *Journal of vascular surgery*. 36. 361–370 (2002).
108. Longley, R. L.; Woods, A.; Fleetwood, A.; Cowling, G. J.; Gallagher, J. T.; Couchman, J. R. Control of morphology, cytoskeleton and migration by syndecan-4. *Journal of cell science*. 112 (Pt 20). 3421–3431 (1999).
109. Luebke, T.; Baldus, S. E.; Grass, G.; Bollschweiler, E.; Thiele, J.; Dienes, H.-P.; Hoelscher, A. H.; Moenig, S. P. Histological grading in gastric cancer by Ming classification: correlation with histopathological subtypes, metastasis, and prognosis. *World journal of surgery*. 29. 1422-7; discussion 1428 (2005).
110. Lugli, A.; Karamitopoulou, E.; Zlobec, I. Tumour budding: a promising parameter in colorectal cancer. *British journal of cancer*. 106. 1713–1717 (2012).
111. Lundqvist, K.; Schmidtchen, A. Immunohistochemical studies on proteoglycan expression in normal skin and chronic ulcers. *The British journal of dermatology*. 144. 254–259 (2001).
112. Lynch, H. T.; Smyrk, T. C.; Watson, P.; Lanspa, S. J.; Lynch, J. F.; Lynch, P. M.; Cavalieri, R. J.; Boland, C. R. Genetics, natural history, tumor spectrum, and pathology of hereditary nonpolyposis colorectal cancer: an updated review. *Gastroenterology*. 104. 1535–1549 (1993).
113. Mackenzie, M.; Spithoff, K.; Jonker, D. Systemic therapy for advanced gastric cancer: a clinical practice guideline. *Current oncology (Toronto, Ont.)*. 18. e202-9 (2011).
114. Mahtouk, K.; Hose, D.; Raynaud, P.; Hundemer, M.; Jourdan, M.; Jourdan, E.; Pantesco, V.; Baudard, M.; Vos, J. de; Larroque, M.; Moehler, T.; Rossi, J.-F.; 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. 4914–4923 (2007).

115. Mali, M.; Jaakkola, P.; Arvilommi, A. M.; Jalkanen, M. Sequence of human syndecan indicates a novel gene family of integral membrane proteoglycans. *The Journal of biological chemistry*. 265. 6884–6889 (1990).
116. Marchet, A.; Mocellin, S.; Ambrosi, A.; Morgagni, P.; Garcea, D.; Marrelli, D.; Roviello, F.; Manzoni, G. de; Minicozzi, A.; Natalini, G.; Santis, F. de; Baiocchi, L.; Coniglio, A.; Nitti, D. The ratio between metastatic and examined lymph nodes (N ratio) is an independent prognostic factor in gastric cancer regardless of the type of lymphadenectomy: results from an Italian multicentric study in 1853 patients. *Annals of surgery*. 245. 543–552 (2007).
117. Marzioni, D.; Lorenzi, T.; Mazzucchelli, R.; Capparuccia, L.; Morroni, M.; Fiorini, R.; Bracalenti, C.; Catalano, A.; David, G.; Castellucci, M.; Muzzonigro, G.; Montironi, R. Expression of basic fibroblast growth factor, its receptors and syndecans in bladder cancer. *International journal of immunopathology and pharmacology*. 22. 627–638 (2009).
118. Masaki, T.; Muto, T. Predictive value of histology at the invasive margin in the prognosis of early invasive colorectal carcinoma. *Journal of gastroenterology*. 35. 195–200 (2000).
119. McFall, A. J.; Rapraeger, A. C. Identification of an adhesion site within the syndecan-4 extracellular protein domain. *The Journal of biological chemistry*. 272. 12901–12904 (1997).
120. Meyer, H.-J.; Wilke, H. Treatment strategies in gastric cancer. *Deutsches Ärzteblatt international*. 108. 698-705; quiz 706 (2011).
121. Meining, A.; Stolte, M. Close correlation of intestinal metaplasia and corpus gastritis in patients infected with *Helicobacter pylori*. *Zeitschrift für Gastroenterologie*. 40. 557–560 (2002).
122. Midwood, K. S.; Mao, Y.; Hsia, H. C.; Valenick, L. V.; Schwarzbauer, J. E. Modulation of cell-fibronectin matrix interactions during tissue repair. *The journal of investigative dermatology. Symposium proceedings / the Society for Investigative Dermatology, Inc. [and] European Society for Dermatological Research*. 11. 73–78 (2006).
123. Ming, S. C. Gastric carcinoma. A pathobiological classification. *Cancer*. 39. 2475–2485 (1977).
124. Moehler M, Al-Batran SE, Andus T, Anthuber M, Arends J, Arnold D, et al.: S3-Leitlinie „Magenkarzinom“ – Diagnostik und Therapie der Adenokarzinome des Magens und oesophagogastralen Übergangs. *Z Gastroenterol*; 49: 461–531 (2011)
125. Morgan, M. R.; Humphries, M. J.; Bass, M. D. Synergistic control of cell adhesion by integrins and syndecans. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 8. 957–969 (2007).

126. Moriguchi, S.; Maehara, Y.; Korenaga, D.; Sugimachi, K.; Nose, Y. Relationship between age and the time of surgery and prognosis after gastrectomy for gastric cancer. *Journal of surgical oncology*. 52. 119–123 (1993).
127. Morisaki, T.; Katano, M.; Ikubo, A.; Anan, K.; Nakamura, M.; Nakamura, K.; Sato, H.; Tanaka, M.; Torisu, M. Immunosuppressive cytokines (IL-10, TGF-beta) genes expression in human gastric carcinoma tissues. *Journal of surgical oncology*. 63. 234–239 (1996).
128. 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. 539–543 (1989).
129. Mostafavi-Pour, Z.; Askari, J. A.; Parkinson, S. J.; Parker, P. J.; Ng, Tony T C; Humphries, M. J. Integrin-specific signaling pathways controlling focal adhesion formation and cell migration. *The Journal of cell biology*. 161. 155–167 (2003).
130. Mundhenke, C.; Meyer, K.; Drew, S.; Friedl, A. Heparan sulfate proteoglycans as regulators of fibroblast growth factor-2 receptor binding in breast carcinomas. *The American journal of pathology*. 160. 185–194 (2002).
131. Murakami, M.; Horowitz, A.; Tang, S.; Ware, J. A.; Simons, M. Protein kinase C (PKC) delta regulates PKCalpha activity in a Syndecan-4-dependent manner. *The Journal of biological chemistry*. 277. 20367–20371 (2002).
132. Naccache, S. N.; Hasson, T.; Horowitz, A. Binding of internalized receptors to the PDZ domain of GIPC/synectin recruits myosin VI to endocytic vesicles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 103. 12735–12740 (2006).
133. Naito, Y.; Saito, K.; Shiiba, K.; Ohuchi, A.; Saigenji, K.; Nagura, H.; Ohtani, H. CD8+ T cells infiltrated within cancer cell nests as a prognostic factor in human colorectal cancer. *Cancer research*. 58. 3491–3494 (1998).
134. Nakano, O.; Sato, M.; Naito, Y.; Suzuki, K.; Orikasa, S.; Aizawa, M.; Suzuki, Y.; Shintaku, I.; Nagura, H.; Ohtani, H. Proliferative activity of intratumoral CD8(+) T-lymphocytes as a prognostic factor in human renal cell carcinoma: clinicopathologic demonstration of antitumor immunity. *Cancer research*. 61. 5132–5136 (2001).
135. Neuhaus P, Wittekind C, *Klassifikation maligner Tumoren des Gastrointestinaltrakts II*. Heidelberg: Springer Medizin Verlag (2007).
136. O'Connell, M. P.; Fiori, J. L.; Kershner, E. K.; Frank, B. P.; Indig, F. E.; Taub, D. D.; Hoek, K. S.; Weeraratna, A. T. Heparan sulfate proteoglycan modulation of Wnt5A signal transduction in metastatic melanoma cells. *The Journal of biological chemistry*. 284. 28704–28712 (2009).

137. O'Shaughnessy, J. A.; Kelloff, G. J.; Gordon, G. B.; Dannenberg, A. J.; Hong, W. K.; Fabian, et al. Treatment and prevention of intraepithelial neoplasia: an important target for accelerated new agent development. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 8. 314–346 (2002).
138. Oh, E.-S.; Couchman, J. R. Syndecans-2 and -4; close cousins, but not identical twins. *Molecules and cells*. 17. 181–187 (2004).
139. Oh, E. S.; Woods, A.; Couchman, J. R. Multimerization of the cytoplasmic domain of syndecan-4 is required for its ability to activate protein kinase C. *The Journal of biological chemistry*. 272. 11805–11811 (1997).
140. Park, P. W.; Reizes, O.; Bernfield, M. Cell surface heparan sulfate proteoglycans: selective regulators of ligand-receptor encounters. *The Journal of biological chemistry*. 275. 29923–29926 (2000).
141. Parkin, D. M.; Muir, C. S. Cancer Incidence in Five Continents. Comparability and quality of data. IARC scientific publications. 45–173 (1992).
142. Pawelec, G. Tumour escape: antitumour effectors too much of a good thing? *Cancer immunology, immunotherapy : CII*. 53. 262–274 (2004).
143. Peng, X.; Ueda, H.; Zhou, H.; Stokol, T.; Shen, T.-L.; Alcaraz, A.; Nagy, T.; Vassalli, J.-D.; Guan, J.-L. Overexpression of focal adhesion kinase in vascular endothelial cells promotes angiogenesis in transgenic mice. *Cardiovascular research*. 64. 421–430 (2004).
144. Polkowski, W.; van Sandick, J W; Offerhaus, G. J.; ten Kate, F J; Mulder, J.; Obertop, H.; van Lanschot, J J. Prognostic value of Laurén classification and c-erbB-2 oncogene overexpression in adenocarcinoma of the esophagus and gastroesophageal junction. *Annals of surgical oncology*. 6. 290–297 (1999).
145. Prall, F. Tumour budding in colorectal carcinoma. *Histopathology*. 50. 151–162 (2007).
146. Rapraeger, A. C.; Krufka, A.; Olwin, B. B. Requirement of heparan sulfate for bFGF-mediated fibroblast growth and myoblast differentiation. *Science (New York, N.Y.)*. 252. 1705–1708 (1991).
147. Remmele, W.; Stegner, H. E. Vorschlag zur einheitlichen Definition eines Immunreaktiven Score (IRS) für den immunhistochemischen Östrogenrezeptor-Nachweis (ER-ICA) im Mammakarzinomgewebe. *Der Pathologe*. 8. 138–140 (1987).
148. Richards, F. M.; McKee, S. A.; Rajpar, M. H.; Cole, T. R.; Evans, D. G.; Jankowski, J. A.; McKeown, C.; Sanders, D. S.; Maher, E. R. Germline E-cadherin gene (CDH1) mutations predispose to familial gastric cancer and colorectal cancer. *Human molecular genetics*. 8. 607–610 (1999).

149. Rioux, V.; Landry, R. Y.; Bensadoun, A. Sandwich immunoassay for the measurement of murine syndecan-4. *Journal of lipid research*. 43. 167–173 (2002).
150. Roskams, T.; Vos, R. de; David, G.; van Damme, B.; Desmet, V. Heparan sulphate proteoglycan expression in human primary liver tumours. *The Journal of pathology*. 185. 290–297 (1998).
151. Sanderson, R. D.; Bernfield, M. Molecular polymorphism of a cell surface proteoglycan: distinct structures on simple and stratified epithelia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 85. 9562–9566 (1988).
152. Saunders, S.; Jalkanen, M.; O'Farrell, S.; Bernfield, M. Molecular cloning of syndecan, an integral membrane proteoglycan. *The Journal of cell biology*. 108. 1547–1556 (1989).
153. Schlemper, R. J.; Riddell, R. H.; Kato, Y.; Borchard, F.; Cooper, H. S.; Dawsey, S. M.; Dixon, M. F.; Fenoglio-Preiser, C. M.; Fléjou, J. F.; Geboes, K.; Hattori, T.; Hirota, T.; Itabashi, M.; Iwafuchi, M.; Iwashita, A.; Kim, Y. I.; Kirchner, T.; Klimpfinger, M.; Koike, M.; Lauwers, G. Y.; Lewin, K. J.; Oberhuber, G.; Offner, F.; Price, A. B.; Rubio, C. A.; Shimizu, M.; Shimoda, T.; Sipponen, P.; Solcia, E.; Stolte, M.; Watanabe, H.; Yamabe, H. The Vienna classification of gastrointestinal epithelial neoplasia. *Gut*. 47. 251–255 (2000).
154. Schlunck, G.; Damke, H.; Kiosses, W. B.; Rusk, N.; Symons, M. H.; Waterman-Storer, C. M.; Schmid, S. L.; Schwartz, M. A. Modulation of Rac localization and function by dynamin. *Molecular biology of the cell*. 15. 256–267 (2004).
155. Schumacher, K.; Haensch, W.; Röefzaad, C.; Schlag, P. M. Prognostic significance of activated CD8(+) T cell infiltrations within esophageal carcinomas. *Cancer research*. 61. 3932–3936 (2001).
156. Sendler, A.; Siewert, J. R. Individualizing therapy in gastric cancer. *Expert review of anticancer therapy*. 3. 457–470 (2003).
157. Setälä, L. P.; Kosma, V. M.; Marin, S.; Lipponen, P. K.; Eskelinen, M. J.; Syrjänen, K. J.; Alhava, E. M. Prognostic factors in gastric cancer: the value of vascular invasion, mitotic rate and lymphoplasmacytic infiltration. *British journal of cancer*. 74. 766–772 (1996).
158. Shimazu, A.; Bachchu, M. A.; Morishita, M.; Noshiro, M.; Kato, Y.; Iwamoto, Y. Expression of syndecan-2, -4, and fibroblast growth factor receptor type 1 in human periodontal ligament fibroblasts and down-regulation of these membrane proteins during maturation in culture. *Journal of dental research*. 78. 1791–1799 (1999).
159. Shin, J.; Lee, W.; Lee, D.; Koo, B. K.; Han, I.; Lim, Y.; Woods, A.; Couchman, J. R.; Oh, E. S. Solution structure of the dimeric cytoplasmic domain of syndecan-4. *Biochemistry*. 40. 8471–8478 (2001).

160. Siewert, J. R.; Böttcher, K.; Stein, H. J.; Roder, J. D. Relevant prognostic factors in gastric cancer: ten-year results of the German Gastric Cancer Study. *Annals of surgery*. 228. 449–461 (1998).
161. Simons, M.; Horowitz, A. Syndecan-4-mediated signalling. *Cellular signalling*. 13. 855–862 (2001).
162. Sipponen, P.; Kosunen, T. U.; Valle, J.; Riihelä, M.; Seppälä, K. Helicobacter pylori infection and chronic gastritis in gastric cancer. *Journal of clinical pathology*. 45. 319–323 (1992).
163. Smith, M. F.; Novotny, J.; Carl, V. S.; Comeau, L. D. Helicobacter pylori and toll-like receptor agonists induce syndecan-4 expression in an NF-kappaB-dependent manner. *Glycobiology*. 16. 221–229 (2006).
164. Soares, T.; de Magalhães Queiroz, D M; Mendes, E. N.; Rocha, G. A.; Rocha Oliveira, A M; Alvares Cabral, M M; de Oliveira, C A. The interrelationship between Helicobacter pylori vacuolating cytotoxin and gastric carcinoma. *The American journal of gastroenterology*. 93. 1841–1847 (1998).
165. Stepp, M. A.; Gibson, H. E.; Gala, P. H.; Iglesia, Drina D Sta; Pajooohesh-Ganji, A.; Pal-Ghosh, S.; Brown, M.; Aquino, C.; Schwartz, A. M.; Goldberger, O.; Hinkes, M. T.; Bernfield, M. Defects in keratinocyte activation during wound healing in the syndecan-1-deficient mouse. *Journal of cell science*. 115. 4517–4531 (2002).
166. Sutton, A.; Friand, V.; Brulé-Donneger, S.; Chaigneau, T.; Ziol, M.; Sainte-Catherine, O.; Poiré, A.; Saffar, L.; Kraemer, M.; Vassy, J.; Nahon, P.; Salzmann, J.-L.; Gattegno, L.; Charnaux, N. Stromal cell-derived factor-1/chemokine (C-X-C motif) ligand 12 stimulates human hepatoma cell growth, migration, and invasion. *Molecular cancer research : MCR*. 5. 21–33 (2007).
167. Suzuki, H.; Nishizawa, T.; Tsugawa, H.; Mogami, S.; Hibi, T. Roles of oxidative stress in stomach disorders. *Journal of clinical biochemistry and nutrition*. 50. 35–39 (2012).
168. Takahashi, M.; Hasegawa, R. Enhancing effects of dietary salt on both initiation and promotion stages of rat gastric carcinogenesis. *Princess Takamatsu symposia*. 16. 169–182 (1985).
169. Tanaka, K.; Shimura, T.; Kitajima, T.; Kondo, S.; Ide, S.; Okugawa, Y.; Saigusa, S.; Toiyama, Y.; Inoue, Y.; Araki, T.; Uchida, K.; Mohri, Y.; Kusunoki, M. Tropomyosin-related receptor kinase B at the invasive front and tumour cell dedifferentiation in gastric cancer. *British journal of cancer*. 110. 2923–2934 (2014).
170. Theocharis, A. D.; Skandalis, S. S.; Tzanakakis, G. N.; Karamanos, N. K. Proteoglycans in health and disease: novel roles for proteoglycans in malignancy and their pharmacological targeting. *The FEBS journal*. 277. 3904–3923 (2010).

171. Tkachenko, E.; Elfenbein, A.; Tirziu, D.; Simons, M. Syndecan-4 clustering induces cell migration in a PDZ-dependent manner. *Circulation research*. 98. 1398–1404 (2006).
172. Tkachenko, E.; Rhodes, J. M.; Simons, M. Syndecans: new kids on the signaling block. *Circulation research*. 96. 488–500 (2005).
173. Uemura, N.; Okamoto, S.; Yamamoto, S. H. pylori infection and the development of gastric cancer. *The Keio journal of medicine*. 51 Suppl 2. 63–68 (2002).
174. Ueno, H.; Murphy, J.; Jass, J. R.; Mochizuki, H.; Talbot, I. C. Tumour 'budding' as an index to estimate the potential of aggressiveness in rectal cancer. *Histopathology*. 40. 127–132 (2002).
175. Vesalainen, S.; Lipponen, P.; Talja, M.; Syrjänen, K. Histological grade, perineural infiltration, tumour-infiltrating lymphocytes and apoptosis as determinants of long-term prognosis in prostatic adenocarcinoma. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*. 30A. 1797–1803 (1994).
176. Warneke, V. S.; Behrens, H.-M.; Hartmann, J. T.; Held, H.; Becker, T.; Schwarz, N. T.; Röcken, C. Cohort study based on the seventh edition of the TNM classification for gastric cancer: proposal of a new staging system. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 29. 2364–2371 (2011).
177. Wilcox-Adelman, S. A.; Denhez, F.; Goetinck, P. F. Syndecan-4 modulates focal adhesion kinase phosphorylation. *The Journal of biological chemistry*. 277. 32970–32977 (2002).
178. Wittrup, A.; Zhang, S.-H.; ten Dam, Gerdy B; van Kuppevelt, Toin H; Bengtson, P.; Johansson, M.; Welch, J.; Mörgelin, M.; Belting, M. ScFv antibody-induced translocation of cell-surface heparan sulfate proteoglycan to endocytic vesicles: evidence for heparan sulfate epitope specificity and role of both syndecan and glypican. *The Journal of biological chemistry*. 284. 32959–32967 (2009).
179. Wong, J E L; Ito, Y.; Correa, P.; Peeters, K C M J; van de Velde, C J H; Sasako, M.; Macdonald, J. Therapeutic strategies in gastric cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 21. 267s-269s (2003).
180. Woodman, S. E.; Ashton, A. W.; Schubert, W.; Lee, H.; Williams, T. M.; Medina, F. A.; Wyckoff, J. B.; Combs, T. P.; Lisanti, M. P. Caveolin-1 knockout mice show an impaired angiogenic response to exogenous stimuli. *The American journal of pathology*. 162. 2059–2068 (2003).
181. Woods, A.; Couchman, J. R. Syndecan 4 heparan sulfate proteoglycan is a selectively enriched and widespread focal adhesion component. *Molecular biology of the cell*. 5. 183–192 (1994).

182. Woods, A.; Longley, R. L.; Tumova, S.; Couchman, J. R. Syndecan-4 binding to the high affinity heparin-binding domain of fibronectin drives focal adhesion formation in fibroblasts. *Archives of biochemistry and biophysics*. 374. 66–72 (2000).
183. Wrenshall, L. E.; Cerra, F. B.; Singh, R. K.; Platt, J. L. Heparan sulfate initiates signals in murine macrophages leading to divergent biologic outcomes. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 154. 871–880 (1995).
184. Wrenshall, L. E.; Stevens, R. B.; Cerra, F. B.; Platt, J. L. Modulation of macrophage and B cell function by glycosaminoglycans. *Journal of leukocyte biology*. 66. 391–400 (1999).
185. Yakirevich, E.; Izhak, O. B.; Rennert, G.; Kovacs, Z. G.; Resnick, M. B. Cytotoxic phenotype of tumor infiltrating lymphocytes in medullary carcinoma of the breast. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc.* 12. 1050–1056 (1999).
186. Yamaguchi, H.; Goldenring, J. R.; Kaminishi, M.; Lee, J. R. Identification of spasmolytic polypeptide expressing metaplasia (SPEM) in remnant gastric cancer and surveillance postgastrectomy biopsies. *Digestive diseases and sciences*. 47. 573–578 (2002).
187. Yu, S.; Yang, M.; Nam, K. T. Mouse models of gastric carcinogenesis. *Journal of gastric cancer*. 14. 67–86 (2014).
188. Yung, S.; Woods, A.; Chan, T. M.; Davies, M.; Williams, J. D.; Couchman, J. R. Syndecan-4 up-regulation in proliferative renal disease is related to microfilament organization. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 15. 1631–1633 (2001).
189. Zaidel-Bar, R.; Cohen, M.; Addadi, L.; Geiger, B. Hierarchical assembly of cell-matrix adhesion complexes. *Biochemical Society transactions*. 32. 416–420 (2004).
190. Zanghieri, G.; Di Gregorio, C.; Sacchetti, C.; Fante, R.; Sassatelli, R.; Cannizzo, G.; Carriero, A.; Ponz de Leon, M. Familial occurrence of gastric cancer in the 2-year experience of a population-based registry. *Cancer*. 66. 2047–2051 (1990).
191. Zimmermann, D. R.; Ruoslahti, E. Multiple domains of the large fibroblast proteoglycan, versican. *The EMBO journal*. 8. 2975–2981 (1989).
192. Zimmermann, P.; David, G. The syndecans, tuners of transmembrane signaling. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 13 Suppl. S91-S100 (1999).
193. Zvibel, I.; Brill, S.; Halpern, Z.; Moskovitz, S.; Yayon, A.; Papa, M. Soluble and matrix-associated heparan sulfate proteoglycans increase expression of erb-B2 and erb-B3 in colon cancer cell lines. *International journal of cancer. Journal international du cancer*. 91. 316–321 (2001).

## **DANKSAGUNG**

Herzlicher Dank gilt Frau Privatdozentin Dr. Dörthe Jechorek, geb. Küster, und Frau Dr. Sabine Franke, geb. Krüger, welche mir mit der vorliegenden Arbeit die Möglichkeit gaben, in ihrem Team zu arbeiten, mich über vier Jahre betreut haben und mir zu jeder Zeit mit Rat und Tat zur Seite standen.

Darüber hinaus danke ich den Mitarbeiterinnen des immunhistochemischen Labors, Frau Claudia Kügler, Frau Claudia Miethke und Jessica Zajontz, und den Mitarbeiterinnen der Molekulargenetik, Frau Simone Staeck und Frau Doreen Medau, für ihre hervorragende Arbeit, ihre Geduld mit einem Labor-unerfahrenen Doktoranden und die netten Aufmunterungen.

Auch Frau Fähse war mir als Bibliothekarin des Instituts immer eine große Hilfe und reagierte auch trotz großer Literaturanfragen meinerseits kurz vor Weihnachten immer freundlich und gelassen.

Besonders möchte ich an dieser Stelle meiner Frau, meinen Eltern und meinem Bruder für die beispiellose Unterstützung in all den Jahren meines Studiums danken. Nur durch diesen Rückhalt war es mir möglich, diese Zeit zu einem guten Abschluss zu bringen und in schöner Erinnerung zu behalten. Angefangen bei der großen finanziellen Unterstützung, über den moralischen Beistand in den Lernphasen und beim Schreiben dieser Arbeit, bis hin zu den zahlreichen Fahrten zum Bahnhof war stets Verlass auf Euch. Dafür bin ich Euch sehr dankbar.

## **ERKLÄRUNG**

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

Die Ausprägung der Syndecan-4-Expression im Magenkarzinom und Korrelation mit klinisch-pathologischen Faktoren

im Institut für Pathologie mit Unterstützung durch Frau PD Dr. Dörthe Jechorek und Frau Dr. Sabine 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 02.02.2015

J. Hornig

## **LEBENS LAUF**

### **Persönliche Daten**

- Hornig, Johannes
- 15. Februar 1985 in Winterberg
- Beckstraße 2,48151 Münster
- verheiratet, 1 Sohn

### **Schulbildung**

- Von 1991 bis 1995 Grundschohle Hallenberg
- Von 1995 bis 2004 Gymnasium Winterberg
- Abschluss Abitur im Juni 2004
  
- 06/2004 bis 03/2005 Zivildienst im Seniorenzentrum Winterberg/Silbach

### **Studium**

- WS2005-SS2007 1.-4. Fachsemester Medizin an der Philipps-Universität Marburg  
mit Abschluss des ersten Staatsexamens (Physikum)
- WS2007-WS2011 5.-12. Fachsemester Medizin (klinischer Teil) an der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg
- Praktisches Jahr: 1. Tertial: Institut für Pathologie der Universität Magdeburg  
2. Tertial: Klinik für Allgemein- und Visceralchirurgie  
Klinikum Bielefeld Mitte  
3. Tertial: Klinik für Hämatologie/Onkologie  
Klinikum Bielefeld Mitte
- Abschluss des Medizinstudiums mit dem zweiten Staatsexamen und der Gesamtnote 1,5 (sehr gut), Exmatrikulation im November 2011

### **Beruflicher Werdegang**

- 01.02.2012 bis 14.08.2014 Klinikum Bielefeld Mitte, Assistenzarzt
- 01.02.2012 bis 31.01.2013: Klinik für Hämatologie, Onkologie und Palliativmedizin,
- 01.02.2013 bis 31.07.2013: Klinik für Pneumologie
- 01.08.2013 bis 31.01.2014: Klinik für Kardiologie
- 01.02.2014 bis 14.08.2014 kardiologisch-internistische Intensivstation
- seit 15.08.2014 Universitätsklinikum Münster, Medizinische Klinik D, allg. Innere, Nephrologie, Hypertensiologie und Rheumatologie

Magdeburg, den 02.02.2015

J. Hornig