

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

**Die Funktion von Syndecan-1 und Syndecan-4 bei der
epithelial-mesenchymalen Transformation und Migration
von Kolonkarzinomzellen und ihre Modulation durch
MAP-Kinasen**

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

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

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

vorgelegt von
aus
Magdeburg

Sascha Ussat
Lutherstadt Wittenberg
2016

Dokumentationsblatt

Bibliographische Beschreibung

Ussat, Sascha:

Die Funktion von Syndecan-1 und Syndecan-4 bei der epithelial-mesenchymalen Transformation und Migration von Kolonkarzinomzellen und ihre Modulation durch MAP-Kinasen. – 2016. – , 59 Bl., 37 Abb., 6 Tab., 4 Anl.

Kurzreferat:

Das kolorektale Karzinom (KRK) zählt zu den weltweit häufigsten malignen Erkrankungen. Seine Prognose wird durch sein Potential zur lokalen Invasion und Metastasierung bestimmt. Dies bedarf einer epithel-mesenchymalen Transformation und Migration der Tumorzellen der Invasionsfront. Die Involvierung der Heparansulfatproteoglykane Syn-1 und Syn-4 in Zelladhäsion, Zytoskelettumstrukturierung, Bildung fokaler Kontakte und multipler Signalkaskaden suggeriert ihre Beteiligung an diesen Tumorprozessen. Durch mehrtägige Videomikroskopie von Migrationsassays, Inhibierung von Syn-1 und Syn-4 mittels siRNA sowie Inhibierung von ERK1/2, JNK und p38 durch spezifische Inhibitoren wurde der Einfluß der Syndecane und MAP-Kinasen auf die morphologischen und motilen Eigenschaften der Kolonkarzinomzelllinien HT-29 und HCT-116 untersucht. Die Inhibierung von Syn-1 resultierte in einem Anstieg von Proliferationsrate, Migrationsgeschwindigkeit, mesenchymaler Transformation und Budding. Der Verlust von Syn-4 führte ebenso zur Steigerung von Zellproliferation und –migration, die Ausbildung von Tumorzellbuds war jedoch stark vermindert. Die Inhibierung der MAPK resultiert in einer Reduktion von Syndecan-mRNA-Expression, EMT und Budding im Migrationsassay, wobei eine differente Änderung der Migrationsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der jeweiligen MAP-Kinase vorlag. Die Arbeit zeigt, dass Syndecane und ihre transkriptionelle Regulation durch MAP-Kinasen zur Änderung der Tumorzelleigenschaften bezüglich Proliferation, Migration, EMT und Budding beitragen.

Schlüsselwörter: Kolonkarzinom, Syndecan, MAPK, epithelial-mesenchymale-Transformation, Migration

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	iii
Abkürzungsverzeichnis.....	vi
Abbildungsverzeichnis.....	x
Tabellenverzeichnis.....	xii
1 EINLEITUNG	1
1.1 Das Kolonkarzinom.....	1
1.1.1 Epidemiologie, Risikofaktoren und Vorstufen	1
1.1.2 Molekulare Genetik und Epigenetik.....	1
1.1.3 Lokalisation und Klassifikation	3
1.1.4 Metastasierungswege	3
1.1.5 Histologie.....	3
1.1.6 Klinisches Bild	4
1.1.7 Diagnose und Staging	4
1.1.8 Therapie.....	4
1.1.9 Prävention und Screening	5
1.1.10 Prognose.....	5
1.1.11 Epithelial-mesenchymale Transformation und Tumorinvasionszone	6
1.2 Die Syndecane	7
1.2.1 Aufbau der Syndecane	7
1.2.2 Verteilung der Syndecane	8
1.2.3 Funktion der Syndecane.....	9
1.2.4 Shedding.....	10
1.3 Syndecan-1	10

1.4	Syndecan-4	13
1.4.1	Funktionen als Rezeptor, Ko-Rezeptor und Bindungspartner für Proteine	13
1.4.2	Funktion in Zell-Zell-Kontakten und Zellpolarisation	14
1.4.3	Zell-Matrix-Interaktion und fokale Adhäsionen	14
1.4.4	Zellmigration	15
1.4.5	Funktion als Rezeptor für Pathogene	16
1.4.6	Funktionen bei Wundheilung und Angiogenese	17
1.5	Rolle der Syndecane im kolorektalen Karzinom	17
1.6	MAP-Kinasen und ihre Signalwege	18
1.7	Zielstellung	21
2	MATERIAL UND METHODEN	22
2.1	Zellkultur.....	22
2.1.1	Zelllinien (HCT-116, HT-29)	22
2.1.2	MAP-Kinase-Inhibitoren	23
2.1.2.1	U0126	23
2.1.2.2	SB203580.....	24
2.1.2.3	SP600125.....	24
2.1.3	Chemikalien und Lösungen	24
2.1.4	Kultivierung humaner Zelllinien	24
2.1.4.1	Herstellen des Nährmediums.....	24
2.1.4.2	Auftauen der Zellen.....	25
2.1.4.3	Passagieren der Zellen.....	25
2.1.4.4	Einfrieren der Zellen.....	25
2.1.5	Migrations-Assay.....	26
2.1.6	Stimulation/Manipulation der Zellen.....	26
2.2	Videomikroskopie.....	27
2.3	RNA-Analytik	29

2.3.1	Präparation von Gesamt-RNA aus kultivierten Zellen	29
2.3.2	Reverse Transkription	30
2.3.3	Quantitative Real-Time PCR am Light Cycler	30
2.3.4	Agarose-Gelelektrophorese	31
3	ERGEBNISSE	32
3.1	Ergebnisse der RT-PCR	32
3.1.1	Expressionsregulation von Syn-1 und Syn-4 in HCT-116.....	33
3.1.2	Expressionsregulation von Syn-1 und Syn-4 in HT29.....	34
3.2	Veränderungen von Morphologie und Motilität durch Inhibierung von MAP-Kinasen und Knockdown der Syndecane in der Videomikroskopie	35
3.2.1	HCT-116, unbehandelt	35
3.2.2	HCT-116 unter Zusatz von Syn-4-siRNA	37
3.2.3	HCT-116 unter Zusatz von Syn-1-siRNA	38
3.2.4	HCT-116 unter Zusatz von U0126	39
3.2.5	HCT-116 unter Zusatz von SB203580.....	41
3.2.6	HCT-116 unter Zusatz von SP600125	42
3.2.7	Buddingfähigkeit von HCT-116 plus Inhibitoren	43
3.2.8	HT-29 plus Inhibitoren.....	45
3.3	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	46
4	DISKUSSION.....	48
5	ZUSAMMENFASSUNG	58
	Literaturverzeichnis.....	60
	Danksagung	86
	Erklärung	87
	Lebenslauf	88
	Anlagen.....	89

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ADAM	a disintegrin and a metalloproteinase
APAF-1	apoptosis protease activating factor-1
APC-Gen	adenomatous polyposis coli-Gen
BMI	Body-Mass-Index
BMK-1	Big MAP Kinase-1
bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumin (Rinderserumalbumin)
CAM	Zelladhäsionsmolekül
CASK	Calcium /calmodulin-dependent serine protein kinase
Ca ⁺⁺	Calcium
CD	cluster of differentiation (Zelloberflächenantigene)
cDNA	copy Desoxyribonukleinsäure
CEA	carcinoembryonales Antigen
CED	chronic enteral disease (chronisch-entzündliche Darmerkrankung)
CIMP	CpG-Insel-Methylierungs-Phänotyp
COX	Cyclooxygenase
CpG	Cytosin-phosphatidyl-Guanin
CPS	Carbamoyl-Phosphatase-Synthetase
CS	Chondroitinsulfat
CT	Computertomographie
DCC	Deleted in Colorectal Cancer (Onkogen)
DEPC-Wasser	Diethylpyrocarbonat-Wasser, auch RNase-freies Wasser
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
ECM	extrazelluläre Matrix

EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	epidermal growth factor receptor
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
EMT	epithelial-mesenchymale Transition
ERK	Extracellular-signal Regulated Kinases
EZM	extrazelluläre Matrix
et al.	et alteres
FAK	focal adhesion kinase
FAP	familiäre adenomatöse Polyposis
FBS	Fetal Bovine Serum
FGF (-R)	Fibroblast Growth Factor (-Rezeptor)
FOBT	fecal occult blood test
GAG	Glykosaminoglykan
GLUT	Glucosetransporter
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony-stimulating factor
GPI	Glycophosphatidyl-Inositol
GSK	Glycogen-Synthase-Kinase
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HGF	hepatocyte growth factor
HGIN	high grade intraepitheliale Neoplasie
HIV	Human Immunodeficiency Virus
hMLH1	human MutL homolog 1
HNPCC	hereditary non-polyposis colorectal cancer (hereditäres kolorektales Karzinom)
HPV	humanes Papillomvirus
HS	Heparansulfat
HSPG	Heparansulfat-Proteoglycan
HSV	Herpes simplex-Virus
IL	Interleukin
IFN- γ	Interferon gamma
JNK	c-Jun amino terminal protein kinase
kDa	Kilo-Dalton
k-ras	Kirsten-ras (Onkogen)
KRK	Kolorektales Karzinom

LGIN	low grade intraepitheliale Neoplasie
MAPK	mitogen-activated protein-Kinase
MEK	Mitogen / Extra-cellular signal-regulated Kinase
MMP	Matrix-Metalloproteinase
MRT	Magnetresonanztomographie
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MSI	Mikrosatelliteninstabilität
mTOR	mammalian/mechanistic target of rapamycin
NSCLC	non small cell lung cancer
p	Kurzer Arm eines Chromosoms
PBS	phosphate buffered saline (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDZ	stehend für PSD-95, Disc large und Zonula occludens-1 Protein
PG	Proteoglycane
PIP ₂	Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphat
PKC	Proteinkinase C
px	Pixel
q	Langer Arm eines Chromosoms
Rac-1	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
Raf	rapidly accelerated fibrosarcoma oder rat fibrosarcoma
RANKL	Receptor Activator of NF-κB Ligand
RhoA	Ras homolog gene family member A
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RPMI	Roswell Park Memorial Institute (Nährmedium)
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RSK	ribosomale Kinase
RT	Raumtemperatur
SAPK	stress activated protein kinase
siRNA	small interfering RNA
SMAD	Zusammensetzung aus Gen sma (small body size) und Gen MAD (mothers against decapentaplegic)
Syn	Syndecan

Tab.	Tabelle
TACE	tumor-necrosis-factor-alpha-converting enzyme
TBE	Tris/Borat/EDTA-Puffer
TGF- β	Transforming Growth Factor- β
TIMP	Tissue Inhibitors of Metalloproteinases (Gewebeinhibitoren der Metalloproteinasen)
TNF- α	Tumor Necrosis Factor- α
TNM	Tumorklassifikationssystem (Tumor, Nodes, Metastasis)
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-aminomethan
UICC	Union International Contre Cancer
uPAR	Urokinase-Rezeptor
UV	ultraviolett
U/min	Umdrehungen/ Minute
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
vs.	versus
WHO	World Health Organization
Wnt	Wingless / Int-1

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Schematische Darstellung des Core- Proteins der Syndecane mit den Glykosaminoglykan-Ketten	8
Abb. 2 Vereinfachte Darstellung des MAPK/ERK Signalweges	19
Abb. 3 HCT-116 (links) und HT-29 in Kultur	22
Abb. 4 HCT-116 (A,B) und HT-29 (C, D) mit epithelialem (A, C) und mesenchymalem (B, D) Wachstum	23
Abb. 5 Strukturformel von U0126.....	23
Abb. 6 Strukturformel von SB203580	24
Abb. 7 Strukturformel von SP600125	24
Abb. 8 ibidi Culture Insert	26
Abb. 9 HCT-116 nach 24h Wachstum im ibidi Culture Insert (10x Vergrößerung).....	26
Abb. 10 Bildbearbeitungsprozess mit ImageJ	28
Abb. 11 Gelelektrophorese der PCR-Produkte von Syn-4 und 18s für HCT-116 + MAPK-Inhibitoren.....	32
Abb. 12 Fluoreszenz der PCR-Produkte in Abhängigkeit von der Zykluszahl (links) und Wertetabelle der anhand der Eichgerade errechneten Werte, Angabe erfolgt in artifiziellen Einheiten.....	32
Abb. 13 Regressionsgerade, Verdünnungsreihe der Syn-4-Plasmide.....	33
Abb. 14 Expression von Syndecan 1 und 4 in HCT-116 + Inhibitoren.....	33
Abb. 15 Expression von Syndecan 1 und 4 in HT-29 + Inhibitoren	34
Abb. 16 HCT-116 nach 0, 24, 48, 72 und 96 Stunden Wachstum	35
Abb. 17 Bewachsene Fläche nach Bearbeitung mit ImageJ bei 0, 24, 48 und 53 Stunden	35
Abb. 18 Gleichzeitiges Vorliegen von Zellen mit epithelialem (*) und mesenchymalem (+) Charakter sowie Übergangsformen (#)	35
Abb. 19 Prozentuale Zunahme der bewachsenen Fläche über die Zeit bei HCT-116	36
Abb. 20 HCT-116 + Syn-4 siRNA nach 0, 24, 48 und 72 Stunden Wachstum.....	37
Abb. 21 Prozentuale Zunahme der bewachsenen Fläche über die Zeit bei HCT-116 + Syn-4 siRNA	37

Abb. 22 Unvollständige EMT an der Invasions-front von HCT-116 + Syn-4 siRNA	37
Abb. 23 HCT-116 + Syn-1 siRNA nach 0, 24, 48 und 72 Stunden Wachstum.....	38
Abb. 24 Prozentuale Zunahme der bewachsenen Fläche über die Zeit bei HCT-116 + Syn-1 siRNA	38
Abb. 25 „Riesenzellen“ unter Behandlung mit Syn-1 siRNA.....	39
Abb. 26 HCT-116 + U0126 nach 0, 24, 48, 72 und 96 Stunden Wachstum	40
Abb. 27 Prozentuale Zunahme der bewachsenen Fläche über die Zeit bei HCT-116 + U0126	40
Abb. 28 Apoptotische Zellen (Pfeile) nach Verlust der Anbindung zur Zellfront	40
Abb. 29 HCT-116 + SB203580 nach 0, 24, 48 und 72 Stunden Wachstum.....	41
Abb. 30 Prozentuale Zunahme der bewachsenen Fläche über die Zeit bei HCT-116 + SB203580	41
Abb. 31 EMT mit anschließender Apoptose bei einer mit SB203580 behandelten HCT-116 Zelle (Pfeil).	42
Abb. 32 HCT 116 + SB600125 nach 0, 24, 48 und 72 Stunden Wachstum	42
Abb. 33 Prozentuale Zunahme der bewachsenen Fläche über die Zeit bei HCT-116 + SP600125	42
Abb. 34 Frustraner Versuch der Loslösung einer Zelle aus dem Zellverband	43
Abb. 35 Grafische Darstellung des zeitlichen Verlaufs an freien Zellen/Zellclustern.....	44
Abb. 36 HT-29 nach 0, 24, 48, 72, 96, 120 und 144 h Wachstum.....	45
Abb. 37 Vergleich der behandelten Zelllinien zum Zeitpunkt von 0, 24, 48 und 72 h Wachstum	47

Tabellenverzeichnis

Tab. 1 Verwendete Primer der RT-PCR	31
Tab. 2 Lightcycler Protokoll der RT-PCR.....	31
Tab. 3 Prozentuale Zunahme der bewachsenen Fläche in Zahlen	36
Tab. 4 Anzahl an Zellen bzw. Zellclustern, die sich zum jeweiligen Zeitpunkt aus dem Zellverband herausgelöst haben	44
Tab. 5 Übersicht der Ergebnisse an der Zellreihe HCT-116	46
Tab. 6 Tumorstadien des KRK nach UICC, TNM und Dukes	91

1 Einleitung

1.1 Das Kolonkarzinom

1.1.1 Epidemiologie, Risikofaktoren und Vorstufen

Nach dem Bronchialkarzinom bei Männern und dem Mammakarzinom bei Frauen stellt das kolorektale Karzinom (KRK) bei beiden Geschlechtern die Neoplasie mit den zweitmeisten Krebssterbefällen pro Jahr dar. Die Inzidenz liegt in Deutschland bei ca. 20 - 40 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner (Stand 2010) mit seit 2008 leicht rückläufiger Tendenz. Zuvor zeigte sich seit 1980 ein stetiger Anstieg der jährlichen Neuerkrankungen bei jedoch fallender Mortalitätsrate. Das mittlere Erkrankungsalter liegt zwischen 70 und 75 Jahren [1, 2].

Es konnte bisher eine Vielzahl an Risikofaktoren für das Auftreten eines KRK gefunden werden. Definierte Krankheitsbilder mit genetischer Disposition, wie z. B. das hereditäre nichtpolypöse kolorektale Karzinom (HNPCC, Lynch-Syndrom), die familiäre adenomatöse Polyposis (FAP) oder das Peutz-Jeghers-Syndrom, machen etwa 5 – 10 % der Neuerkrankungen aus. Am stärksten wirkt sich der Lebensstil auf das Erkrankungsrisiko aus: Tabakkonsum, Übergewicht, Bewegungsmangel, ballaststoffarme Ernährung, häufiger Verzehr von rotem Fleisch und verarbeiteten Wurstwaren sowie regelmäßiger Alkoholkonsum erhöhen die Wahrscheinlichkeit an einem KRK zu erkranken [3]. Personen mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (CED) wie Colitis ulcerosa und Morbus Crohn und Verwandte ersten Grades von Patienten mit Darmkrebs sind überdurchschnittlich häufig betroffen [4]. Ein weiterer Risikofaktor scheint die therapeutische Bestrahlung der Beckenregion zu sein [5].

Kolorektale Adenome sind benigne Neoplasien des Drüsenepithels und werden als Vorstufe des KRK angesehen. Histologisch werden tubuläre, villöse, tubulovillöse Adenome sowie Adenome mit pseudopapillären Epithelknospen („serrated adenoma“) unterschieden. Das größte Entartungsrisiko besitzen dabei die villösen Adenome. Je nach Differenzierungsgrad unterscheidet die WHO eine low grade bzw. eine high grade intraepitheliale Neoplasie (LGIN, HGIN) [6, 7].

1.1.2 Molekulare Genetik und Epigenetik

Kolorektale Karzinome weisen eine genetische Heterogenität auf, die durch drei teils eigenständige molekulare Pathomechanismen verursacht wird: die chromosomale

Instabilität, die Mikrosatelliteninstabilität und der CpG-Insel-Methylierungs-Phänotyp [8]. Bereits im Jahre 1974 beschrieben Morson et al. die Entstehung des KKR aus Adenomen im Rahmen der sogenannten Adenom-Karzinom-Sequenz [9], die in ihrer Erweiterung durch Fearon & Vogelstein noch heute als das klassische molekularpathologische Modell einer Multistep-Karzinogenese anerkannt ist [10]. Es beinhaltet die Transformation von gesundem Darmepithel in Adenome bis hin zur malignen Entartung der Zellen in einem mehrstufigen Prozess (= Sequenz) durch diverse genetische Veränderungen. Beginnend mit dem Verlust des APC-Gens, das ein essenzieller Bestandteil des Wnt-Signalweges ist, über K-Ras-Mutationen und Inaktivierung des p53-Tumorsuppressorgens, kommt es zur gesteigerten Transkription von Genen, die für Proliferation, Migration und Apoptoseresistenz zuständig sind [11]. Weiterhin kommt es zu gehäuften Strukturveränderungen an Chromosomen während der Zellteilung (Translokationen, Aneuploidie, Deletionen usw.), da die stabilisierende Wirkung des APC-Proteins auf Metaphase-Chromosomen fehlt, was in einer chromosomalen Instabilität resultiert [12] und weitere molekulare Defekte mit maligner Transformation und Tumorprogression zur Folge hat.

Ein weiterer molekularer Mechanismus ist die Mikrosatelliteninstabilität (MSI), welche bei 80 - 90 % der HNPCC-assoziierten Karzinome und bei 15 - 20 % der sporadischen KKR zu finden ist [13-15]. Hierbei kommt es durch Verlust oder Inaktivierung sogenannter Mismatch-Repair-Gene, deren Aufgabe es ist, Insertionen, Deletionen oder Fehlpaarungen einzelner Basen zu korrigieren, zu Längenpolymorphismen innerhalb neu gebildeter DNA-Stränge. Die Folge davon ist eine Verschiebung des Leserasters („frameshift“) oder die Entstehung funktionsloser Proteine. Betroffen sind dann unter anderem Gene der Signaltransduktion, der Apoptose oder der transkriptionellen Regulation.

Der dritte Pathomechanismus ist der CpG-Insel-Methylierungs-Phänotyp (CIMP). Dieser eigenständige epigenetische Prozess beinhaltet eine prinzipiell reversible Inaktivierung von Genen durch Cytosin-Methylierung von Cytosin-phosphatidyl-Guanin (CpG)-reichen Regionen der DNA (CpG-Inseln) [16]. Es werden zwei Typen unterschieden: CIMP1/CIMP-high-Karzinome gehen mit einer Methylierung des Mismatch-Repair-Gens hMLH1 und demnach einer hohen MSI einher. Sie weisen eine Vielzahl methylierter Gene auf und sind häufig mit einer B-Raf-Mutation assoziiert. Bei CIMP2/CIMP-low Karzinomen zeigt sich eine höhere Methylierungsdichte, die Gesamtanzahl der betroffenen Gene ist jedoch geringer. MSI kommt nicht vor, dafür wird in 92% der Fälle eine K-Ras-Mutation gefunden [17, 18].

1.1.3 Lokalisation und Klassifikation

Der Hauptanteil aller KRK ist im Rektum lokalisiert (60 %), im Sigma finden sich etwas über 20 % der Karzinome. Weitere 10 % der bösartigen Neubildungen des Dickdarmes sind im Caecum und Colon ascendens, die restlichen 10 % in den anderen Colon-Abschnitten verteilt [19]. Die Einteilung des KRK kann in verschiedenen Klassifikationen vorgenommen werden: nach der „Union International Contre le Cancer“ (UICC), nach der TNM-Klassifikation (T = Tumor, N = Nodes = regionärer Lymphknotenbefall, M = Metastasen) und nach Dukes (siehe Tab. 6 in Anlage IV) [20], wobei letztere klinisch kaum noch Anwendung findet.

1.1.4 Metastasierungswege

Das primäre Tumorwachstum erfolgt tendenziell zirkulär und quer zur Darmachse, nebenbei kann eine Infiltration über die Lamina muscularis propria in die Serosa erfolgen. Das Ausmaß der lymphogenen und hämatogenen Metastasierung hängt dabei direkt mit der Invasionstiefe des Karzinoms zusammen. Bei pT1-Tumoren beträgt das Risiko einer lymphogenen Ausbreitung ca. 4 %, pT2- und pT3-Tumoren liegen bei 12 % bzw. 60 % Metastasierungsrisiko [7]. Hämatogene Absiedlungen betreffen in aller Regel zunächst die Leber, dann die Lunge und von dort aus kann eine generalisierte Streuung in den gesamten Körper erfolgen. [21] Bei etwa 25% der Patienten liegt bei Diagnosestellung eine lymphogene bzw. Fernmetastasierung vor. Etwa 50% aller Patienten mit KRK entwickeln Lebermetastasen.

Beim Rektumkarzinom werden je nach Entfernung des Tumors von 12 - 16 cm, 6 - 12 cm bzw. < 6 cm ab Anokutanlinie eine zusätzliche lymphogene Metastasierung in die paraaortalen, die iliakalen bzw. inguinalen Lymphknoten beschrieben [22]. Beim Rektumkarzinom der tiefen Etage ist eine direkte hämatogene Absiedlung in die Lunge über die Vena cava inferior möglich.

1.1.5 Histologie

Histologisch gesehen sind etwa 80 % der KRK Adenokarzinome gefolgt von muzinösen Adenokarzinomen (5 – 10 %), Siegelringzellkarzinomen (1 %), undifferenzierten Karzinomen (1 %) sowie Karzinoiden/Lymphomen/Sarkomen (1%) [23]. Zusätzlich gibt der histologische Differenzierungsgrad eines Tumors (Grading, G1 = gut differenziert, G4 = undifferenziert) weitere Informationen über die Prognose der Erkrankung, wobei schlechtere Differenzierung mit einer ungünstigeren Prognose einhergeht.

1.1.6 Klinisches Bild

Leider gibt es beim KRK keine zuverlässigen Frühsymptome. Viele Patienten zeigen vor allem im Frühstadium ein asymptomatisches Erscheinungsbild. Beschwerden treten oftmals erst bei Tumorprogress auf, wie z. B. Änderung der Stuhlgewohnheiten (Diarrhoe, Obstipation, Tenesmen), Blutabgang im Stuhl (häufig bei Rektumkarzinom, aber nur bei etwa 1/6 der rechtsseitigen KRK, oft intermittierend [24]) und chronische Blutungsanämie. Bei größeren Tumoren kann es zu Ileuserscheinungen, tastbaren Geschwulsten und starken Bauchschmerzen kommen. Allgemeine Reaktionen wie Gewichtsabnahme, Müdigkeit, Leistungseinbruch, Fieber und Nachtschweiß können in allen Stadien auftreten [25, 26].

1.1.7 Diagnose und Staging

Zur Sicherung der Diagnose eines KRK sollten diverse Untersuchungen obligat sein. Dazu gehören die digitale rektale Untersuchung, eine komplette Koloskopie mit Biopsie, Abdomensonographie zur Suche nach Metastasen, Röntgenaufnahme des Thorax und Bestimmung des CEA (karzinoembryonales Antigen) –Serumspiegels. Beim Rektumkarzinom sollte zusätzlich die starre Rektoskopie, eine MRT- oder CT-Untersuchung des Beckens zur Angabe des Abstandes zur mesorektalen Faszie sowie eine Endosonographie bei lokal begrenztem Tumor erfolgen [27-29].

1.1.8 Therapie

Art und Umfang des chirurgischen Eingriffes und die Durchführung einer prä- bzw. postoperativen Chemotherapie werden durch Lokalisation und UICC-Stadium des Tumors definiert. In den Stadien I-III wird grundsätzlich mit kurativer Zielsetzung therapiert. Während früher im Stadium IV rein palliativ therapiert wurde, können mittlerweile ein Viertel der Patienten mit synchronen Lebermetastasen auch mit kurativer Absicht behandelt werden [30, 31].

Bei Einhaltung gewisser Grundsätze ist nach chirurgischer Intervention die Lokalrezidivrate gering. Dazu zählen die Entfernung von mehr als zwölf Lymphknoten aus dem regionären Abflussgebiet, ein angemessener Sicherheitsabstand zum gesunden Gewebe [32] sowie die En-Bloc-Resektion von tumoradhärenten Organen [29, 33]. Als chirurgische Verfahren kommen z. B. die Hemikolektomie links bzw. rechts, die Transversumresektion, die Sigmaresektion oder eine Proktokolektomie in Frage. Die anteriore Rektumresektion mit

totaler Mesorektumresektion, die abdominoperineale Rektumextirpation oder die transanale Lokalexzision finden beim Rektumkarzinom Anwendung. Bei erfahrenen Operateuren sind die laparoskopischen den offen chirurgischen Verfahren nicht unterlegen [34, 35]. Vorteile der laparoskopischen Operationen sind der geringere Blutverlust, das kosmetische Ergebnis und eine kürzere postoperative Erholungsdauer. Dem entgegen steht eine kürzere Operationszeit bei der offenen Chirurgie.

Ab Stadium II kann eine adjuvante Chemotherapie zur Verhinderung von Fernmetastasen durchgeführt werden [36]. Sind bereits Fernmetastasen vorhanden (UICC Stadium 4), so können diese bei Resektabilität entfernt werden oder durch Radiochemotherapie in einen resektablen Zustand gebracht werden, sofern es der Allgemeinzustand des Patienten zulässt [37, 38]. Auch stehen insbesondere bei Lebermetastasen neue lokalablative Therapien wie die Radiofrequenzablation, die Transarterielle Chemoembolisation oder die Selektive Interne Radiotherapie zur Verfügung.

1.1.9 Prävention und Screening

Neben der Vermeidung der bereits genannten Risikofaktoren (Tabak, rotes Fleisch, Alkohol, Übergewicht etc.) werden täglicher Obst- und Gemüseverzehr sowie eine kalzium- und folsäurereiche Ernährung [39-41] als protektive Faktoren genannt, wobei es allerdings auch Hinweise darauf gibt, dass Folsäure als Risikofaktor für k-Ras-Mutationen gelten könnte [42]. Screening-Methoden zielen auf Prävention bzw. Frühdiagnose eines KRK ab. Zur Erkennung kleinster Blutmengen im Stuhl wird von der EU der fecal occult blood test (FOBT; als Guajak- oder immunochemischer Test) derzeit als einzige Früherkennungsmaßnahme für Patienten ohne erhöhtes Erkrankungsrisiko empfohlen [43]. In vielen Ländern sind ab einem bestimmten Alter weitere Untersuchungen möglich, wie z. B. die flexible Koloskopie oder eine CT-Kolonographie [44], wodurch eine Reduktion der Inzidenz (76 % - 90 % für Koloskopie [45]) und Mortalität (16 % für FOBT [46], 22 % - 31 % für die Sigmoidoskopie [47]) erreicht werden konnte.

1.1.10 Prognose

Neben bestimmten genetischen Veränderungen im Karzinomgewebe (s.u.) wurden folgende Faktoren mit einer schlechteren Prognose in Verbindung gebracht: große Tumorausdehnung, regionale Lymphknotenmetastasen, R1-Resektion nach kurativer chirurgischer Intervention,

präoperative Erhöhung des CEA-Wertes [48], geringer Differenzierungsgrad [49, 50] Infiltration von Blut- und Lymphgefäßen [51], Konfiguration der Invasionszone [52], perineurale Invasion als auch eine inflammatorische Reaktion auf den Tumor [53].

Auf molekulargenetischer Ebene zeigen bestimmte Veränderungen Einfluss auf die Überlebensdauer von KRK-Patienten. Ein Verlust von diversen Chromosomenabschnitten, wie z. B. 1p, 5q, 8p, 17p und 18q, verschlechtern die Prognose ebenso wie eine verminderte Expression des dcc-Gens [54, 55] oder p27kip1, eine Überexpression von p53, K-ras-Genmutation [56] oder eine hohe Cyclin-A-Expression. Im Gegensatz dazu kann ein vermehrtes Vorliegen von Mikrosatelliteninstabilitäten (MSI) die Prognose verbessern [57, 58]. Auch Proteine, welche Signalkaskaden innerhalb der Tumorzelle regulieren, beeinflussen das Überleben. Dazu zählen Enzyme des Wnt-Signalweges (z. B. APC, β -Catenin, E-Cadherin) [4, 59], des transforming growth factor β (TGF- β)–Signalwegs (u. a. TGF- β -Rezeptoren I und II, SMAD-Proteine) [60-62] und des Ras-MAP-Kinase-Signalweges [63, 64]. Bestimmte metabolische Enzyme wurden bisher als Prognosemarker identifiziert, so z. B. Thymidylatsynthase [65], GLUT1, COX-2 oder Mangan-Superoxid-Dismutase [66-68]. Klinisch finden solche Biomarker bisher keine routinemäßige Anwendung [69-71].

1.1.11 Epithelial-mesenchymale Transformation und Tumorinvasionszone

Das Ausbreitungs- bzw. Infiltrationsmuster eines KRK ist mittlerweile ein anerkannter prädiktiver Prognosefaktor. Bereits 1987 schlugen Jass et al. ein Scoringssystem vor, das verschiedene histomorphologische Faktoren der Invasionsfront berücksichtigt (Jass-Klassifikation) [72]. Darin wird ein infiltrativ wachsender Tumortyp mit diffusem, strahlenartigem Ausbreitungsmuster von einem expansiven Typen unterschieden, der eine verdrängende, glatt umschriebene Invasionsfront zeigt. Karzinome vom infiltrativen Typ weisen in Abhängigkeit von der Lymphozyteninfiltration an der Invasionsfront eine signifikant geringere 5- bzw. 10-Jahres-Überlebensrate auf als expansiv wachsende KRK [72]. Ebenfalls von hoher prognostischer Aussagekraft ist das „tumor budding“ [73]. Es beschreibt das Auftreten von Einzelzellen oder Zellclustern aus bis zu fünf undifferenzierten Zellen vornehmlich - aber nicht ausschließlich - in der Nähe der Invasionsfront und wird als die eigentliche Invasionszone angesehen [74, 75].

Das Ausmaß des Buddings geht im klinischen Bereich mit einer erhöhten Lymphknotenmetastasierung sowie einem fortgeschrittenen TNM-Stadium einher [76] und führt somit zu einem kürzeren Gesamt- und rezidivfreien Überleben [77, 78].

Beim Verlassen des geschlossenen Epithelverbandes vollziehen die Zellen eine Transformation, welche als epithelial-mesenchymale Transition bezeichnet wird. In diesem neuen Zustand verlieren die Zellen typische epitheliale Eigenschaften wie Zell-Zell-Adhäsion oder Polarität und nehmen Charakteristika mesenchymaler Gewebe an. Dazu zählen Motilität, Invasivität sowie eine Reihe metabolischer Veränderungen innerhalb des Zellstoffwechsels [79, 80]. Auf molekularer Ebene kommt es zum Verlust des membranständigen Epithelmarkers E-Cadherin und zum Anstieg mesenchymaler Markerproteine, wie z. B. Vimentin, N-Cadherin oder Fibronectin [81]. Morphologisch kommt es nach Herauslösen aus dem Tumorzellverband zur Ausbildung von Lamellipodien, Filopodien und Invadopodien, die die Grundlage für eine aktive Migration darstellen [82].

1.2 Die Syndecane

Syndecane bilden eine Gruppe strukturverwandter, Zellmembran-assoziiertes Proteoglykane mit Heparansulfat-Seitenketten (=Heparansulfat-Proteoglykane, HSPG). Sie sind durch eine Transmembrandomäne in der Zellmembran verankert und zählen zu den Typ-I Transmembranproteinen [83]. Gibt es bei wirbellosen Lebewesen nur ein Syndecan, so wurden bei den Vertebraten bisher vier verschiedene Syndecane identifiziert: Syndecan-1, Syndecan-2 (Fibroglycan), Syndecan-3 (N-Syndecan) und Syndecan-4 (Ryodocan, Amphiglycan). Sie werden in unterschiedlicher Dichte auf allen Zellen des Körpers außer den B-Vorläuferzellen exprimiert [84] und fungieren dort für eine Vielzahl von Liganden als Bindungsstelle und Co-Rezeptoren.

1.2.1 Aufbau der Syndecane

Syndecane bestehen aus einem transmembranen Core-Protein mit einer variablen extrazellulären Domäne (Ektodomäne), an welche eine unterschiedliche Anzahl von Glykosaminglykan-Seitenketten (Heparansulfat – HS, Chondroitinsulfat – CS) kovalent gebunden ist (Abb. 1) [85]. Der kurze intrazelluläre Abschnitt besteht aus einer membrannahen C1- und distalen C2-Region (C für constant, common oder conserved).

Zwischen diesen Domänen liegt ein variabler Abschnitt (V), welcher für jedes der vier Syndecan-Mitglieder spezifisch ist. Die Größe der Core-Proteine beträgt 33 kDa für Syn-1, 23 kDa für Syn-2, 43 kDa für Syn-3 und 22 kDa für Syn-4 [86].

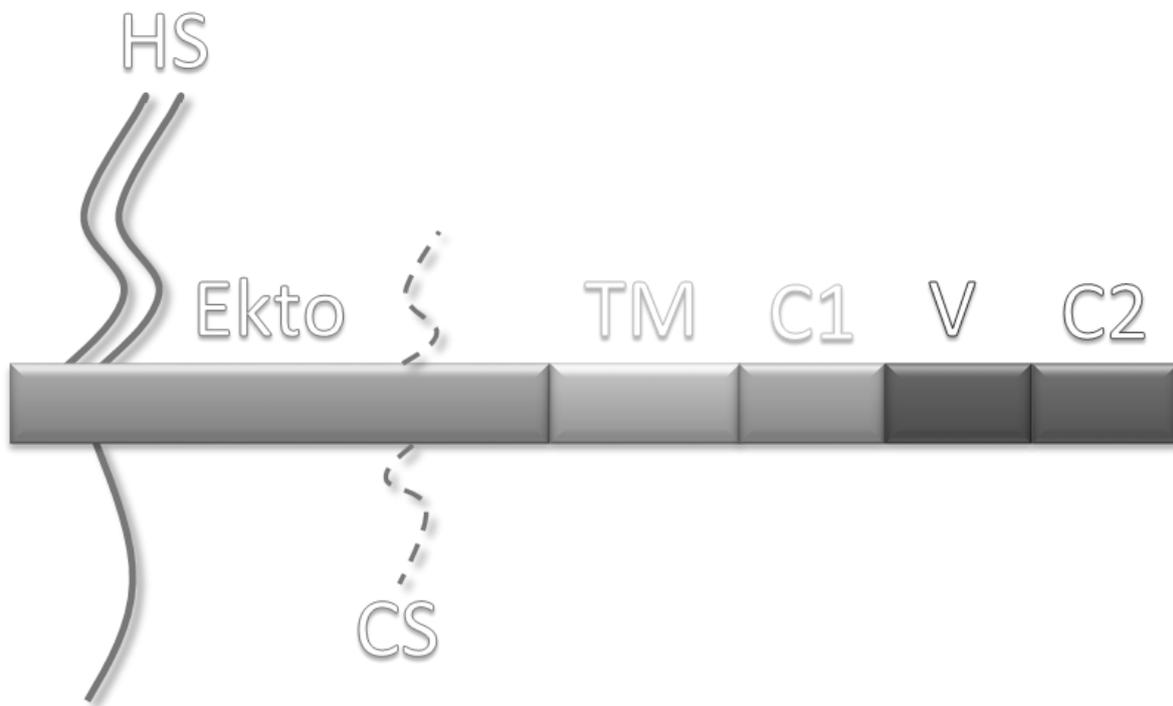


Abb. 1 Schematische Darstellung des Core-Proteins der Syndecane mit den Glykosaminoglykan-Ketten

HS - Heparansulfat; CS - Chondroitinsulfat; Ekto - Ektodomäne; TM - transmembrane Domäne; C1 und C2 - konservierte Regionen und V – variable Region der zytoplasmatischen Domäne (nach Couchman et al., 2002).

1.2.2 Verteilung der Syndecane

Die einzelnen Syndecane zeigen ein zell- und gewebespezifisches Expressionsmuster. Syn-1 taucht in hoher Dichte in Fibroblasten und Epithelzellen, insbesondere Keratinozyten, auf. Dementsprechend findet man es vermehrt in Haut, Leber, Niere und Lunge, in geringerer Menge im Gehirn und Dünndarm. Im Herz- und Skelettmuskel ist es nicht zu finden. Im Gegensatz dazu ist der Syn-2-Gehalt der Epithelzellen gering bis nicht vorhanden, dafür aber umso höher in Zellen des Endothels, von Nervenfasern und Fibroblasten. Die höchste Dichte an Syn-2 enthält die Leber, gefolgt von Gehirn, Herz- und Skelettmuskel, Niere und Lunge. In der Haut und im Dünndarm ist Syn-2 kaum vertreten. Syn-3 ist ebenfalls kaum in Epithelzellen, dafür aber in hoher Dichte in Nervenzellen zu finden, weiterhin auch in Fibroblasten, primitiven Mesenchymzellen und einigen Endothelzellen. Somit zeigt das Gehirn den höchsten Syn-3-Level. In Leber, Lunge, Niere und Dünndarm ist Syn-3 nicht detektierbar. Außer in Erythrozyten ist Syn-4 in allen Syndecan-exprimierenden Zellen des Körpers zu finden. Die

Gewebe mit der höchsten Dichte sind Leber und Niere, gefolgt von Gehirn und Lunge mit mittlerer Dichte. Weniger stark exprimiert wird Syn-4 im Herz- und Skelettmuskel, der Haut und im Dünndarm [84].

Sowohl während der Embryogenese als auch bei pathologischen Prozessen wie Wundheilung und neoplastischer Transformation zeigt sich eine Veränderung der Expressionsmuster. Experimente mit Syndecan-Knockout-Mäusen zeigen, dass die Tiere überlebens- und fortpflanzungsfähig sind, aber Defekte bei bestimmten physiologischen Prozessen aufweisen [87]. Syn-1^{-/-} und Syn-4^{-/-} - Mäuse haben Störungen der Wundheilung, Angiogenese und Entzündungsreaktion. Interessanterweise sind Syn-1^{-/-} Mäuse vor der Ausbildung von Tumoren geschützt, möglicherweise weil die pathologische Aktivierung von Stammzellen behindert ist [88]. Mäuse ohne Syn-3-Expression haben Probleme mit Lern- und Gedächtnisprozessen, entwickeln eine muskuläre Dystrophie und zeigen abnormes Fressverhalten nach Futterentzug [89].

1.2.3 Funktion der Syndecane

Als Oberflächenmoleküle haben die Syndecane bedeutenden Einfluss auf viele biologische Prozesse. Mit ihrer komplexen Ektodomäne interagieren sie mit einer Vielzahl von löslichen und unlöslichen extrazellulären Faktoren wie etwa Wachstumsfaktoren, Proteinen der extrazellulären Matrix (EZM) und des Lipidstoffwechsels, Adhäsionsmolekülen, Protease-Inhibitoren, aber auch Mikroorganismen wie Bakterien, Protozoen oder Viren. Daraus ergeben sich die den Syndecanen zugeschriebenen Funktionen: Beteiligung an Adhäsion, Migration, Transformation, Organisation, Differenzierung und Proliferation von Zellen [90, 91]. Auch eine Kooperation mit anderen membranständigen Proteinen wird beschrieben, so z. B. Integrine, mit denen sie gemeinsam die Formation von extrazellulären Aktinfibrillen („stress fibers“) regulieren [92]. Syndecane können nach Aktivierung durch Liganden Signalkaskaden im Inneren (z. B. Signalwege von RhoA, Rac1 und PKC) und außerhalb der Zelle induzieren, was als dualer Regulationsmechanismus bezeichnet wird. Dies geschieht über Phosphorylierung, Clustering oder Shedding [93]. Die C1-Region kann über Teile des src-Signalweges und Tubulin mit den Mikrotubuli einer Zelle kommunizieren und somit zelluläre Prozesse wie Migration, Formation von focal adhesions oder Zelladhäsion beeinflussen. Die C2-Region bindet die PDZ-Domäne (PSD95/SAP90-Protein, das septate junction-Protein Discs large und das tight junction-Protein Zonula occludentes-1 [94]) verschiedener Proteine wie

Synectin [95], Synbindin [96], CASK [97, 98] und Syntenin [99], die für Aufbau und Bindung von Proteinkomplexen an der Innenseite der Zellmembran und an das Zytoskelett verantwortlich sind. Die Funktion der V-Region ist nahezu unbekannt. Nur bei Syn-4 konnte gezeigt werden, dass sie für die Bildung von Syn-4-Tetrameren mit Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (PIP₂) und aktivierter Proteinkinase C- α (PKC α) in sogenannten fokalen Adhäsionen (engl. focal adhesions) verantwortlich ist [100, 101]. Im Falle einer Überexpression von Syn-4 zeigte sich eine vermehrte Bildung von focal adhesions, was zu einer verminderten Zellmotilität führte [102].

1.2.4 Shedding

Syndecane sind in der Lage ihre extrazelluläre Domäne nahe der Zellmembran abzuspalten (= Shedding). Der verbliebene Teil des Syndecans verliert seine Fähigkeit Botenstoffe zu binden. Dies reguliert einerseits die Signalweiterleitung ins Zellinnere und konvertiert andererseits die ehemalige Ektodomäne in einen löslichen Rezeptor, der Einfluss auf andere Syndecane und extrazellulär gelegene Liganden der umgebenden Matrix nehmen kann [103]. Das Shedding selbst ist ein hochregulierter Prozess, welcher die direkte Anwesenheit bestimmter Enzyme erfordert. Aus der Familie der Zink-Endopeptidasen sind zwei Gruppen von Proteinasen in der Lage Syndecane zu shedden: die Matrix-Metalloproteinasen (MMP) und ADAM („a disintegrin and metalloproteinase“) [104]. Aber auch Plasmin und Thrombin können diesen Prozess herbeiführen [105]. Extrazelluläre Reize wie etwa Wachstumsfaktoren [106], Chemokine [107, 108], Trypsin [109], Insulin [110], Zellstress [111] oder bakterielle Proteine [112] können das Shedding induzieren und beschleunigen. Bei Wundheilungsprozessen, invasivem Wachstum von Zellen, Tumorprogression und bei der Proliferation ist das Shedding gesteigert [113].

1.3 Syndecan-1

Mit der intensiveren Erforschung des molekularen Aufbaus der Zellwand und ihrer einzelnen Bestandteile in den 1980er Jahren fand man diverse Proteine, deren Funktion es war, die Kommunikation der Zelle mit ihrer umgebenden Matrix herzustellen und daraufhin Signale an das Zellinnere weiterzuleiten, um verschiedenste Stoffwechselprozesse in Gang zu setzen. Im Jahr 1985 zeigten Rapraeger et al., dass es in Epithelzellen von Mäusen eine Proteoglykanfraktion gibt, die sowohl Heparansulfat- als auch Chondroitinsulfatseitenketten besitzt [114]. Im Jahr 1989 konnte erstmals ein Vertreter aus dieser Fraktion geklont werden.

Es handelte sich um ein Core-Protein mit einer Masse von 32.868 Dalton, das vermehrt in epitheliale Gewebe zu finden war. Da als Funktion bereits bekannt war, dass mittels der Heparansulfatkette die Zelle an Kollagen I, III und V sowie Fibronectin und Thrombospondin binden kann und auf diese Weise mit dem umgebenden Aktin-Zytoskelett interagiert, wurde es von den Erstbeschreibern „Syndecan“ genannt – nach dem griechischen Wort *syndein* für „zusammenbinden, verknüpfen“ [115] - und später dann als Syndecan-1 bzw. CD138 bekannt.

Syn-1 ist auf allen endothelialen, epithelialen und glatten Muskelzellen der Gefäße sowie auch auf Plasmazellen zu finden und spielt eine wichtige Rolle bei Prozessen, welche Migration, Proliferation und EZM-Interaktion betreffen. An die extrazelluläre Domäne kann eine Reihe von Liganden binden, woraufhin intrazelluläre Antworten induziert werden. Dies geschieht vorrangig dann, wenn die Umgebung einer Zelle gestört ist (Wunde, Entzündung, physische Reize), bei Infektionen oder aber auch durch unkontrolliertes Wachstum im Sinne einer malignen Entartung.

Durch vielzählige Untersuchungen am Tiermodell mit Syn-1^{-/-} Mäusen, konnte der spezifische Einfluss von Syn-1 bzw. dessen Fehlen bei einer Reihe von Krankheitsbildern gezeigt werden. Ohne Syn-1 verlaufen Endotoxin-vermittelte und septische Schocks wesentlich fulminanter, da hier dauerhaft ein erhöhter Spiegel an Chemokinen zu finden ist, welcher im Verlauf zum Multiorganversagen und hoher Letalität führt. Es wird vermutet, dass Syn-1 diese Chemokine von der Zelloberfläche fern halten bzw. in gesheddetem Zustand binden kann und dadurch der chemotaktische Gradient für eine Einwanderung von neutrophilen Granulozyten reduziert wird [116, 117]. Ähnliche Ergebnisse bei der Untersuchung von chronischen und akuten Lungenerkrankungen, der anti-glomerulären Basalmembran-Nephritis sowie beim Myokardinfarkt unterstützen diese wichtige Rolle von Syn-1 bei der Rekrutierung von Immunzellen, da auch hier verminderte Syn-1-Expression eine gesteigerte Leukozytenadhäsion und –migration im erkrankten Gewebe zur Folge hatte [118-120].

Einen weiteren wichtigen Beitrag leistet Syn-1 bei der Remodellierung der extrazellulären Matrix. Ein Verlust von Syn-1 führt so z. B. während der Narbenbildung nach Myokardinfarkt zu einer beeinträchtigten Quervernetzung von Kollagenfibrillen durch erhöhte Aktivität von MMP in der EZM und zeigte eine erhöhte Rate an dilatativen Spätfolgen [121]. Im Darmepithel fördert Syn-1 die epitheliale Wundheilung durch Bindung und Signalweiterleitung von fibroblast-growth-factor-2 (FGF-2). Weiterhin kann diese Interaktion die Leukozytenadhäsion

an Endothelzellen verringern [122, 123]. Weitere nachgewiesene Funktionen im Rahmen entzündlicher Erkrankungen sind u. a. die Regulation des Proteinlecks bei Proteinverlustenteropathie [124], der Proliferation von glatten Muskelzellen bei Gefäßverletzungen [125] und der Keratinozytenproliferation bei Hautverletzungen [126].

Die oben genannten Prozesse sind in erster Linie den physiologischen Antworten verschiedener Gewebe auf Verletzungen und Entzündungen zuzuordnen. Wenn allerdings diese physiologischen Muster außer Kontrolle geraten und eine Zelle maligne entartet, so erfolgt meist auch eine Dysregulation der Syn-1-Expression. Hierbei spielt erneut die Interaktion mit Mediatoren des Tumorwachstums (Onkogene, Wachstumsfaktoren) eine bedeutende Rolle.

In Myelomzellen bindet Syn-1 den hepatocyte growth factor (HGF) über die HS-Seitenketten und begünstigt damit die Aktivierung des Met (= HGF-Rezeptor)-Signalweges, was zu Zellwachstum und -überleben führt. An gescheddetem Syn-1 gebundenes HGF wird Osteoblasten präsentiert und resultiert in einer Aktivierung von Interleukin 11 und Hochregulation von RANKL (Abk. für „Receptor Activator of NF- κ B Ligand“), wodurch Knochenaufbau verhindert und Knochenabbau gefördert wird und sich die Tumormasse weiter im Knochen ausbreiten kann [127-129].

Im Plattenepithelkarzinom des Kopfes und des Halses konnte gezeigt werden, dass erhöhte Syn-1-Level mit einer geringeren Wanderungsgeschwindigkeit der Tumorzellen einhergehen. Ein Verlust der Syn-1 Expression hatte eine geringere Adhäsion an Kollagen und eine erhöhte Migration und Invasion zur Folge. Als Ursache dafür wird die Interaktion von Syn-1 mit Integrinen diskutiert, wie z. B. die Rolle als Ko-Rezeptor für $\alpha 2\beta 1$ Integrin bei der Koppelung an Kollagen [130]. Ebenso kann die Aktivierung und Signaltransduktion von Integrinen potenziert werden, indem Syn-1 die Bindung von Integrin-Liganden (z. B. Vitronectin) vermittelt [131, 132]. Ursächlich vermutet man hierbei eine lokale Konzentrationserhöhung der Wachstumsfaktoren durch die Bindung an Syndecanen.

Auch an der Neubildung von Gefäßen in Tumoren beteiligt sich Syn-1, da es pro-angiogenetische Faktoren wie FGF-2 und VEGF binden kann. Dieser gebildete Komplex kann dann in gescheddetem Zustand an den VEGF-Rezeptor von Endothelzellen andocken und zum Aussproßen neuer Zellen mit konsekutiver Gefäßbildung führen. Da in entarteten Geweben Shedding verstärkt stattfindet, ist dementsprechend auch die Neigung zur Gefäßneubildung stärker ausgeprägt [133].

1.4 Syndecan-4

Im Jahr 1992 wurde von zwei Forschergruppen nahezu zeitgleich ein neues membranständiges Heparansulfat-Proteoglykan identifiziert. David et al. entdeckten das Molekül in Epithelzellen und Fibroblasten und nannten es Amphiglykan (amphi – griechisch für „rundherum“ oder „auf beiden Seiten“ – da man es auf beiden Seiten der Zellmembran wiederfand [134]), während Kojima et al. das Protein in Rattenendothelzellen bemerkten und es als Ryudocan (ryudousei – japanisch für „Fluidität“, in der Annahme, dass Syn-4 einen großen Einfluss auf den Erhalt des Blutflusses habe [135]) bezeichneten. 1993 gelang es, die cDNA für das menschliche Syn-4 zu klonen, welche ein Protein bestehend aus 198 Aminosäuren mit einer Masse von 21,641 kDa codiert. Das zugehörige Gen konnte dem Chromosomenabschnitt 20q12 zugeordnet werden [136]. Ein Pseudogen wurde auf Chromosom 22q12.2 gefunden [137].

1.4.1 Funktionen als Rezeptor, Ko-Rezeptor und Bindungspartner für Proteine

Als nahezu ubiquitär vorkommendes Syndecan vermittelt Syn-4 eine Vielzahl von Interaktionen mit der die Zelle umgebenden Matrix. Dies geschieht durch Bindung extrazellulärer Liganden, von denen hier einige genannt werden sollen:

- FGF-2: Auch Syn-4 bindet FGF-2, reguliert dessen MAPK-Signalweg und moduliert somit die Zellantwort auf den Wachstumsfaktor. Es spielt auch bei der Endozytose von FGF-2 und der Makropinozytose des FGF2-FGFR1-Komplexes eine wichtige Rolle [138]. Zelluläre Antworten auf FGF-2 können im Komplex mit dem FGF-2-Rezeptor (FGFR-1) [139] oder auch unabhängig von diesem erfolgen [140].
- TGF-β: Die verstärkende Wirkung des transforming growth factor β (TGF-β) in Anwesenheit von Syn-4 konnte in Experimenten mit Syn-4^{-/-} Mäusen gezeigt werden [141].
- Thrombin/Antithrombin: Neutrophile Granulozyten zeigen ohne Syn-4 keine zelluläre Reaktion auf Antithrombin [142]. Gefäßmuskelzellen benötigen Syn-4, um auf extrazelluläres Thrombin mit Proliferation und Migration reagieren zu können [139].
- EZM-Proteine (z. B. Laminin, Fibronectin, Actinin): Syn-4 ist als Ko-Rezeptor einiger Integrine (insbesondere α₅β₁-Integrin) essenzieller Bestandteil für die Kommunikation der Zelle mit ihrer Umgebung und spielt eine wichtige Rolle für Migration, Invasion und Motilität [143, 144].

1.4.2 Funktion in Zell-Zell-Kontakten und Zellpolarisation

Bei der Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten spielen die Syndecane eine wichtige Rolle. Dabei unterstützen sie Polarisation und Kohärenz im epithelialen Verband oder zwischen epithelialen und mesenchymalen Zellen. So findet sich Syn-1 vor allem in Zellkontakten zwischen epithelialen Zellen [145], wo es in Komplexen mit Mikrofilamenten, Integrin $\beta 1$ und E-Cadherin vorliegt [146]. Da das Expressionsmuster eine epithelspezifische Verteilung aufweist, gibt dies einen Hinweis darauf, dass Syn-1 zur Polarität von Epithelzellen beiträgt. So zeigt es im reifen Plattenepithel eine zirkumferenzielle, im basalen Haarfollikel-epithel eine laterale und im Zylinderepithel eine basolaterale Verteilung. Durch Inhibierung von Syn-1 mittels antisense mRNA kommt es in Epithelzellen zum Verlust der kubischen Morphologie und der Polarität. Weiterhin zeigt sich eine gesteigerte Migration ohne Fixation und eine verringerte Expression von E-Cadherin an der Zelloberfläche [147]. Diese Bedeutung wird durch Untersuchungen gestützt, die eine vermehrte Tumorzellmigration nach Verlust der membranösen Syn-1 Expression beschreiben [148, 149].

Die Beteiligung von Syn-4 ist bedeutend für die Ausbildung von Aktinfilamenten. Über die Bildung von Oligomeren innerhalb der Zellmembran wird die Interaktion mit Alpha-Aktinin, einem Strukturprotein, welches für die Quervernetzung von Aktinfasern zuständig ist, reguliert. Ist die Oligomerisierung gestört, so verringert sich die Anzahl an Zellkontakten deutlich [150, 151]. Auch die Anzahl der HS-Seitenketten spielt bei der Organisation der extrazellulären Matrix eine entscheidende Rolle [152].

1.4.3 Zell-Matrix-Interaktion und fokale Adhäsionen

Über die fokalen Adhäsionen sind Syndecane in der Lage, die Adhäsion zwischen Zellen und der extrazellulären Matrix zu vermitteln. Sie bilden dabei ein Bindeglied zwischen dem Zytoskelett und Komponenten der EZM bzw. der Basalmembran, wie z. B. Fibronectin, Vitronectin und Kollagenen vom Typ I, III und V [153, 154], was zur zusätzlichen Stabilität und Verankerung von Epithelverbänden führt [155].

Die focal adhesions sind Cluster aus Transmembranproteinen, die mit der extrazellulären Domäne an Matrixbestandteile, wie z. B. Fibronectin, Vitronectin und Kollagenen vom Typ I, III und V [153, 154], und mit der zytoplasmatischen Domäne über Adapterproteine wie Talin, alpha-Aktin, Filamin und Vinculin an die zytoskelettalen Aktinfilamente binden können.

Syn-4 ist innerhalb der fokalen Adhäsionen das bisher einzige nachgewiesene Syndecan und ist in ruhenden Zellen in peripheren, in migrierenden Zellen in zentralen Adhäsionen lokalisiert [156, 157]. Bei der Bindung der Zelle an Fibronectin, Vitronectin oder Kollagen I kommt es zur Komplexbildung von Syn-4 mit Integrin $\alpha 5\beta 1$ und einer folgenden Ko-Lokalisation mit Vinculin [158, 159]. Eine intakte V-Region ist die Voraussetzung für die erfolgreiche Syn-4 vermittelte Ausbildung fokaler Adhäsionen, die Anheftung von HS-Seitenketten spielt hingegen keine Rolle [160]. Die intrazelluläre Signaltransduktion, welche dem Prozess der Adhäsion vorausgeht, wird ebenfalls durch Syn-4 unterstützt. Nach Kontakt mit der EZM und Clusterbildung von Syn-4 kommt es durch Bindung von PIP2 zur Aktivierung intrazellulärer Proteinkinasen, wie z. B. PKC α , RhoA, Rac1 und FAK. Die Aktivierung der focal adhesion kinase (FAK) kann erst durch Bindung von Syn-4 an Fibronectin erfolgen [161]. Durch Aktivierung von PKC α wird die Ausbildung fokaler Kontakte [162] und die dortige Rekrutierung von Syn-4 bewirkt, womit es wiederum zur Konzentrationserhöhung der Kinase durch Bindung an Syn-4 kommt [163]. Direkte Verbindungen zum Zytoskelett können z. B. über PIP2 und Actinin/Vinculin oder über weitere Adhäsionsproteine und deren Zielstrukturen wie Syndesmos \rightarrow Paxilin und α -Actinin \rightarrow F-Aktin realisiert werden [164, 165].

1.4.4 Zellmigration

Die aktive Ortsveränderung von Zellen wird als Migration bezeichnet, wobei dieser Überbegriff die ungerichtete Spontanbewegung (random migration), die gerichtete chemotaktische Bewegung und die Änderung der Bewegungsgeschwindigkeit (Chemokinetik) umfasst [166]. Innerhalb der Zelle kommt es dabei zu einer Umgestaltung des Zytoskelettes mit Längenänderung fibrillärer Proteine und Einschleusung von Membranvesikeln in Richtung der geplanten Bewegung, was zur Ausbildung von Zellfortsätzen wie Lamellipodien und Filopodien führt. Weiterhin muss sich die Zelle über stabile Verbindungen an die EZM anheften und mit dieser interagieren können. Das geschieht z. B. über die bereits erwähnten fokalen Adhäsionen oder Hemidesmosomen. Insbesondere Syn-4 ist durch seine Beteiligung an focal adhesions Gegenstand intensiver Untersuchungen gewesen. Es konnte gezeigt werden, dass ohne Syn-4 die dreidimensionale, nicht aber die zweidimensionale Ausbreitung von Fibroblasten verhindert wird. Im 2D-Modell kann aber bereits die Zugabe des Matrixproteins Tenascin-C die Migration durch Bindung von Syn-4 unterbinden [167]. Syndecan-4-Knockout-Mäuse zeigen postnatal eine gestörte Angiogenese durch verminderte

Migration der Endothelzellen [168]. Für Adhäsion und Wanderung von Fibroblasten ist weiterhin das Zusammenspiel von Syn-4 und Integrinrezeptoren (v.a. Integrin $\alpha 5\beta 1$) nötig [169, 170]. Durch Abwesenheit von Syn-4 unterbleibt die Formierung Vinculin-haltiger focal adhesions, wobei allerdings die Clusterbildung der Integrine und die Anheftung an Fibronectin unbeeinträchtigt ist [171, 172].

Bei Syn-4^{-/-}-Fibroblasten zeigt sich eine ungeordnete Migration, was auf eine gestörte Aktivierung der PKC α zurückzuführen ist. Dadurch ist die Rac1-Aktivität erniedrigt, die essenziell für die Polymerisation von F-Aktin und einer darauf folgenden Ausbildung von Filo- und Lamellipodien ist [173, 174]. Für eine zielgerichtete Migration ist der Abbau von Haftpunkten ebenso wichtig wie der Aufbau neuer Adhäsionen. Hierfür müssen die beteiligten Proteine mittels Endozytose aus dem extrazellulären Raum entfernt werden. Das Recycling der beteiligten Integrine ist dabei von Syn-4 abhängig. Bei Beschleunigung der Clusterbildung und Internalisierung von Syn-4 konnte eine erhöhte Migrationsgeschwindigkeit von Fibroblasten im scratch assay nachgewiesen werden [175]. Bei einer Mutation der C-Region von Syn-4 und daraus folgender beeinträchtigter Endozytose kommt es zur Akkumulation von Syn-4 und Integrinen, was zu einer reduzierten Migration führt [176, 177].

Auch für Syn-1 konnten Effekte auf das Wanderungsverhalten von Zellen nachgewiesen werden: in Mammakarzinomzellen konnte durch Inhibierung von Syn-1 die Integrin $\alpha 5\beta 3$ -abhängige Migration auf Vitronectin reduziert werden [178]. Auch die Beteiligung an einer Migration über Adhäsion an Laminin wird diskutiert [179].

1.4.5 Funktion als Rezeptor für Pathogene

Es gibt Hinweise darauf, dass ein Virus wie z. B. HIV-1 durch Syn-4 gebunden und die Infektiosität somit über mehrere Tage aufrechterhalten werden kann. Auch die Transmission des Virus ins Zellinnere ist über Syndecane möglich [180]. Das p17-Protein des HI-Virus interagiert mit den HS-Seitenketten von Syn-2 und Syn-4 von CD4⁺-Zellen, wodurch die Produktion von TNF- α und Interleukin-2 beeinflusst wird [181]. Freissler et al. zeigten, dass die Aufnahme von *Neisseria gonorrhoeae* in Epithelzellen durch Syn-1 und Syn-4 vermittelt wird [182].

1.4.6 Funktionen bei Wundheilung und Angiogenese

Die Expression von Syn-4 ist in einer Wunde der Dermis hochreguliert, was zur Wundheilung beisteuert. Das in Wundflüssigkeiten gefundene und zur Klasse der antimikrobiell wirkenden Cathelicidine gehörende Peptid PR-39 induziert die Expression von Syn-4 als Teil der Wundheilung und eines nicht-immunologischen Abwehrprozesses [183, 184]. Syn-4 nimmt auch an der Erkennung von Fibronectin im Wundbett teil und vermittelt die Regulation diverser GTPasen, welche die Endozytose von Integrinen triggern und somit zur Migration von Fibroblasten ins Wundbett beitragen [185]. Passend dazu zeigen Syn-4-Knockout Mäuse eine verzögerte Wundheilung und verminderte Angiogenese im Granulationsgewebe [186]. Nach vaskulären Verletzungen zeigt ein Mangel an Syn-4 deutliche Einschränkungen bei der intimalen Neuf ormation der Zellen, indem die Proliferation von Gefäßmuskelzellen und die Rekrutierung von Gefäßvorläuferzellen herabgesetzt ist [187]. Die Überexpression von Syn-4 führt im experimentell herbeigeführten Myokardinfarkt zu gesteigerter Angio- und Arteriogenese, verringerter Gewebsentzündung und Fibrose und verbessert das kardiale Remodelling [188]. Nach Gefäßverletzung ist Syn-4 ein sogenanntes „primary response gene“, d. h. ein Gen, das innerhalb von 0,5 – 2 h nach einem Reiz von der Zelle exprimiert wird. Die Induktion erfolgt durch FGF-2 [189].

1.5 Rolle der Syndecane im kolorektalen Karzinom

Diverse Untersuchungen konnten bisher zeigen, dass die Verteilung der Syndecane im KRK verändert ist. So ist für Syn-1 eine signifikante Reduktion der Expression auf kolorektalen Adenokarzinomen beschrieben [190]. Während es in gesunden Darmepithelien vor allem an der basolateralen Zellgrenze zu finden ist, kommt es in Adenokarzinomzellen des Dickdarmes um die Zellmembran herum sowie im Zytoplasma vor. Auch Syn-1 negative Tumore sind bekannt. Fujiya et al. zeigten in einer Studie, dass Verringerung der Syn-1 Expression unter anderem mit einem erhöhten TNM-Stadium, vermehrter lokaler Lymphknoten- sowie Lebermetastasierung und einem geringeren Überleben einhergeht. Dies legt den Schluss nahe, dass der Verlust bzw. die Herabregulation von Syn-1 eng mit dem malignen Charakter einer Zelle verbunden ist [191]. Eine zweite Studie von Lundin et al. konnte diese Ergebnisse nur teilweise bestätigen. Sie zeigten in dieser Untersuchung, dass der Verlust der Syn-1-Expression mit geringerer Differenzierung und erhöhter TNM-Klassifikation des Tumors korreliert [192, 193]. Eine weitere Studie kam zu der Erkenntnis, dass niedrige Syn-1-

Konzentrationen mit einer größeren Ausdehnung des Primärtumors einhergehen [194]. Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe um Frau Prof. D. Jechorek zeigten, dass der Verlust der Syn-1-Expression an der Invasionsfront des KRK mit einem kürzeren krankheitsfreien und Gesamtüberleben der Patienten korreliert und als unabhängiger Prognosemarker verwertbar ist. Auffällig in diesen Studien war ein vollständiger Syn-1-Verlust und eine damit einhergehende Ausbildung eines mesenchymalen Phänotyps der aggressiven Tumorzellbuds der Invasionszone [195].

Für Syn-4 gibt es derzeit keine publizierten Studien bezüglich seiner Funktion im KRK. Unsere Arbeitsgruppe konnte jedoch zeigen, dass es im KRK zu einer zunehmenden Expression von Syn-4 der Tumorzellen an der Invasionsfront, insbesondere der Tumorbuds, kommt. Diese Expressionssteigerung korreliert mit prognostisch ungünstigen klinisch-morphologischen Faktoren und stellt in Bezug auf das krankheitsfreie und Gesamtüberleben einen unabhängigen negativen prognostischen Marker dar [195]. Für andere Tumorarten, wie das Mammakarzinom, Keimzelltumore des Hodens oder Osteosarkome, konnte ebenso ein statistischer Zusammenhang zwischen der Syn-4-Expression und verschiedenen Tumoreigenschaften wie z. B. histologischer Typ, Metastasierungspotential und Langzeitüberleben gesehen werden [196-198].

1.6 MAP-Kinasen und ihre Signalwege

Damit Zellen Signale von außen (Wachstumsfaktoren, Hormone, physische und chemische Reize usw.) in intrazelluläre Antworten umwandeln können, müssen die Stimuli über eine Kaskade vom Rezeptor zum Zellkern gelangen. Dabei spielt die Phosphorylierung von Proteinen als Regulationsmechanismus eine entscheidende Rolle. Die Interaktion einer Vielzahl von Proteinkinasen und die gegenseitige (In-)Aktivierung führen in letzter Instanz dazu, dass Transkriptionsfaktoren die Expression bestimmter Gene und damit auch die Produktion von Proteinen regulieren.

Die Mitogen-aktivierten-Proteinkinasen (MAPK) sind eine Familie von Serin/Threonin-Kinasen und in der Signaltransduktion bei einer Vielzahl von physiologischen Prozessen, wie z. B. Proliferation, Differenzierung, Zellzyklus und Apoptose, von großer Bedeutung [199].

Es sind vier Hauptsignalwege bekannt:

- die „extracellular signal-regulated kinase“ (ERK 1/2),
- die „c-Jun amino terminal protein kinase/stress activated protein kinase“ (JNK/SAPK)
- die p38-MAP-Kinase,
- und die Big MAP Kinase-1 (BMK-1).

MAPK werden selbst durch Proteinkinasen aktiviert (MAPKK, MKK oder Mitogen / Extracellular signal-regulated Kinase [MEK] 1 - 7), die wiederum durch andere Kinasen phosphoryliert werden (MAPKKK bzw. MAP3K oder MEK-Kinase [MEKK] 1 -5) [200].

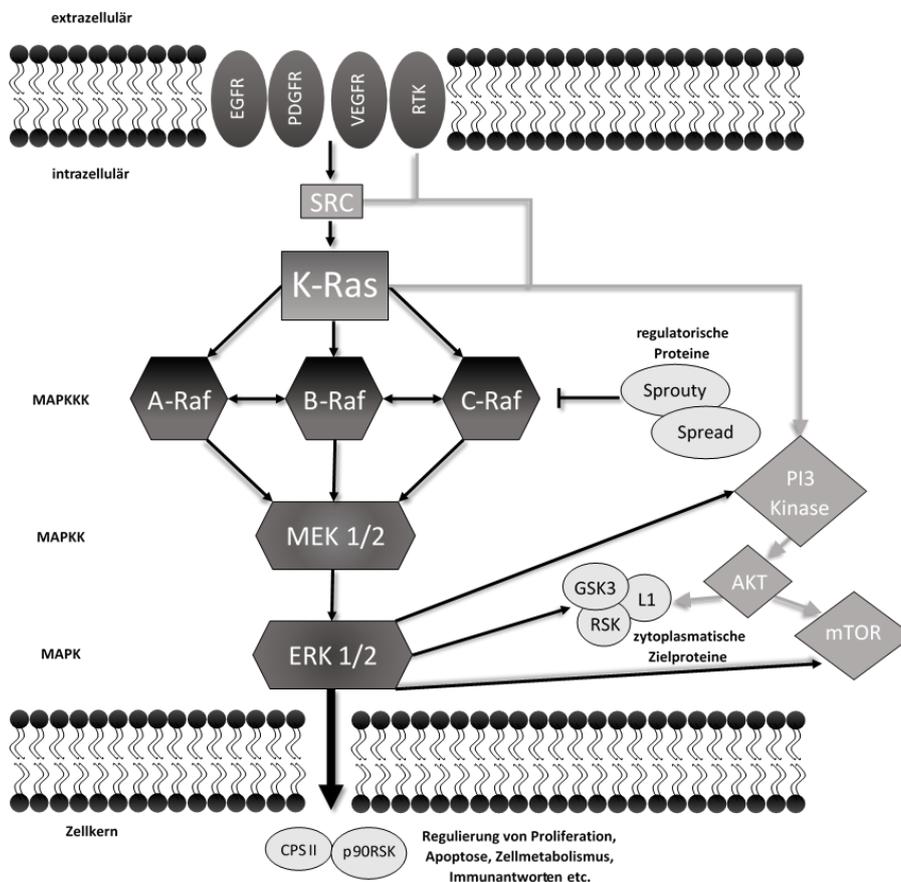


Abb. 2 Vereinfachte Darstellung des MAPK/ERK Signalweges

Nach Aktivierung eines membranständigen Rezeptors rekrutieren Adapterproteine (src) Ras-Proteine, die dann weitere Prozesse bis hin zur ERK-Aktivierung in Gang setzen. Aufeinanderfolgende Phosphorylierungen verstärken das Signal Raf – MEK – ERK bis ERK seine zytosolischen oder intranukleären Zielstrukturen aktiviert. Inhibitorische Proteine wie Sprouty und Spread modulieren die Intensität der Aktivierung. Crosstalk mit dem PI3K-AKT Signalweg findet sich unter normalen Bedingungen sowie in entarteten Zellen. EGFR epidermal growth factor receptor; PDGFR platelet derived growth factor receptor; VEGFR vascular endothelial growth factor receptor; RTK Rezeptortyrosinkinase; SRC Tyrosinkinase *sarcoma*; K-Ras Kirsten rat sarcoma; Raf rapidly accelerated fibrosarcoma oder rat fibrosarcoma; GSK3 Glycogen-Synthase-Kinase 3; L1 Adhäsionsmolekül 1; CPS II Carbamoyl-Phosphatase-Synthetase II; PI3 Kinase Phosphatidylinositol-3-Kinase; AKT Akthymoma; mTOR mammalian/mechanistic target of rapamycin

Am Beispiel von ERK1/2 ist in Abb. 2 die Abfolge der Signaltransduktion erläutert. Die Signalweiterleitung erfolgt in der Regel von der Zellmembran zum Kern. Im MAPK/ERK-Weg

gibt es drei verschiedene MAPKKK: A-Raf, B-Raf und C-Raf (auch Raf-1). Ein Level darunter befinden sich die MAPKK MEK1 und MEK1 und letztendlich die finalen Zielstrukturen ERK1 und ERK2. Zu erwähnen ist, dass B-Raf eine häufig vorkommende Mutation bei menschlichen malignen Erkrankungen ist [201, 202].

Der ERK-Signalweg wird vor allem durch Mitogene und Wachstumsfaktoren aktiviert [203, 204], während es bei p38 und JNK verschiedene Arten von Zellstress sind, wie z. B. hyperosmotischer Schock, metabolischer Stress, Inhibitoren der Proteinsynthese, UV-Licht, Hitze oder Zytokine [205-208], aber auch Ischämie und eine darauf folgende Reperfusion [209, 210]. Zielproteine der MAPK sind eine Anzahl von zytosolischen, intranukleären und Strukturproteinen, womit sie u. a. direkten Einfluss auf Transkription, Translation und zelluläre Umbauprozesse haben. Im Zytoplasma kann es zur Phosphorylierung von zytoskelettalen Proteinen kommen, wodurch Zellmotilität, Adhäsion, Membrantransport anderer Proteine und Regulierung von Knotenpunkten anderer Signalwege beeinflusst werden [211, 212]. Zielsubstrate sind dabei z. B. die ribosomalen S6-Kinasen (RSK), welche die in den Zellmetabolismus involvierte Glycogen-Synthase-Kinase 3 (GSK3) regulieren, oder das L1 Adhäsionsmolekül, das – wie der Name vermuten lässt – an der Zelladhäsion beteiligt ist [213, 214]. Wenige Minuten nach der Aktivierung lösen sich MAPK von ihren Ankerproteinen im Zytoplasma und wandern in den Zellkern, um dort auf die Transkription Einfluss zu nehmen [215]. Es kommt zur Phosphorylierung diverser Transkriptionsfaktoren, z. B. Carbamoyl-Phosphatase-Synthetase II (CPS II), die eng mit der DNA-Synthese verknüpft ist, oder p90RSK, wodurch es zur Stimulation des Zellzyklus kommt [216, 217]. Die Regulation der MAPK-Kaskade kann unter anderem durch andere kleine Proteine (meist Tyrosinkinasen, wie z. B. Sprouty oder Spred für den ERK-Signalweg) oder durch Crosstalk mit anderen Signalwegen (PI3, AKT, mTOR) erfolgen.

Durch Blockade der MAPK-Kinase Signalwege zeigten sich bei verschiedenen menschlichen Tumoren zum Teil unerwartete zelluläre Reaktionen sowie die Ausbildung primärer und sekundärer Resistenzen [218, 219]. Im KRK finden sich Mutationen von K-Ras bei 34,1 % aller untersuchten Proben [220], von B-Raf bei 5 – 20 % [221, 222] und Veränderungen der MEK in weniger als 3 % [223]. Durch diese Mutation kann es zur überproportionalen Aktivierung der Signalkaskade kommen, woraus u. a. erhöhte Motilität, gesteigerter Zellmetabolismus und Proliferation hervorgehen können. Therapeutische Ansätze bieten hier Substanzen, welche als Kinaseinhibitoren wirken. Anders als beim Melanom ist beim KRK der große Durchbruch jedoch noch nicht gelungen. Die oben genannten Mutationen zählen zu den Faktoren, die eine

erfolgreiche Therapie mit Tyrosinkinaseinhibitoren wie Cetuximab oder Panitumumab unwahrscheinlich werden lassen [224, 225], weshalb klinisch vor Therapiebeginn in aller Regel die Testung auf den K-Ras-Wildtyp erfolgt. Eine Resistenz des KRK auf B-Raf-Inhibitoren (z. B. Vemurafenib) wird dadurch erklärt, dass es durch Unterbrechung des Signals zu einem starken Anstieg der EGFR-Phosphorylierung und Rezeptoraktivierung kommt, denn durch die Raf-Inhibierung fällt die Aktivierung der CDC25C-Phosphatase weg, die inhibitorisch auf die EGFR-Aktivierung wirkt. Die Kombination aus Raf- und EGFR-Inhibitor konnte die Proliferation von CRC-Zellen merklich reduzieren [226]. Eine weitere Schwierigkeit stellen die Wechselwirkungen mit parallelen Signalwegen wie PI3-AKT und Wnt/Ca⁺⁺ dar. Jene werden aktiviert, wenn die MAPK-Kaskade beeinträchtigt ist und regen die Zellproliferation an. Dieser Mechanismus konnte in vitro durch Inhibierung von PI3K oder AKT außer Kraft gesetzt werden [227]. Am Modell mit menschlichen Kolonkarzinom-Präparaten konnte die Resistenz gegenüber B-Raf- und MEK-Inhibitoren durch Kombination dieser mit Cyclosporin (Wnt/Ca⁺⁺-Modulator) übergangen werden [228].

1.7 Zielstellung

Aufgrund der multiplen Funktionen der Syndecane während der Regulation von Proliferation, Differenzierung und Morphologie epithelialer Zellen, der Stabilisierung epithelialer Zellverbände, der Zell-Zell- und Zell-Matrix-Adhäsion, der Modifikation des Aktinzytoskelettes, der Bildung fokaler Kontakte, der Bindung multipler extrazelluläre tumorassoziierter Faktoren und der Induktion zahlreicher intrazellulärer Signalkaskaden ist eine Funktion der Syndecane während der Proliferation, Adhäsion, Migration und Invasion von Tumorzellen naheliegend. Zahlreiche Studien haben einen Zusammenhang zwischen alterierter Syn-1- bzw. Syn-4-Expression und prognostisch ungünstigen Tumoreigenschaften wie eine fortgeschrittene lokale Invasion und ein erhöhtes Metastasierungspotential sowie eine damit einhergehende schlechte Prognose für verschiedene maligne Tumoren aufgezeigt [229-235]. Zur Expression der Syndecane im Kolonkarzinom und zu deren funktioneller Bedeutung gibt es jedoch nur wenige Untersuchungen.

Im Mittelpunkt der Arbeit stand somit der Einfluss von Syn-1 und Syn-4 auf die Proliferation, Migrationsfähigkeit und -geschwindigkeit sowie die damit assoziierte epithelial-mesenchymale Transformation und das Buddingpotential von Kolonkarzinomzellen in vitro.

Folgende Fragen sollten in einem mehrtätigen Migrationsmodell an den Kolonkarzinomzelllinien HCT-116 und HT-29 beantwortet werden:

1. Wird durch Syn-1 oder Syn-4 das Potential der Kolonkarzinomzellen zur Proliferation, epithelial-mesenchymalen Transformation, Migration und zum Budding beeinflusst?
2. Führt eine Inhibierung von Syn-1 oder Syn-4 zu einer Änderung der motilen und morphologischen Eigenschaften der Kolonkarzinomzellen?
3. Kann die Expression von Syn-1 oder Syn-4 in Kolonkarzinomzellen durch MAP-Kinasen reguliert werden?
4. Hat eine alterierte Expression der MAP-Kinasen ERK1/2, JNK und p38 veränderte Zelleigenschaften bezüglich Proliferation, epithelial-mesenchymaler Transformation, Migrationsgeschwindigkeit und Buddingpotential zur Folge und
5. beruhen mögliche Änderungen in den Eigenschaften der Kolonkarzinomzellen auf einer über die MAP-Kinasen induzierte Änderung der Syndecan-Expression?

2 Material und Methoden

2.1 Zellkultur

2.1.1 Zelllinien (HCT-116, HT-29)

Die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien sind Kolonkarzinomzellen vom Typ HCT-116 und HT-29. Bei HCT-116 handelt es sich um einen adhärent wachsenden Karzinomtyp eines erwachsenen Mannes, der im Jahr 1981 von M. G. Brattain in Birmingham, Alabama extrahiert wurde. Die Zellen zeigen ein dicht gepacktes, polygonales und invasives Wachstumsmuster mit Tendenz zur Ausbildung von Ausläufern [236]. Die Zellreihe HT-29 wurde 1964 von J. Fogh aus dem Primärtumor einer 44-jährigen kaukasischen Frau kultiviert. Die Zellen wachsen in runder Formation und neigen weniger zur Herauslösung aus dem Verband.

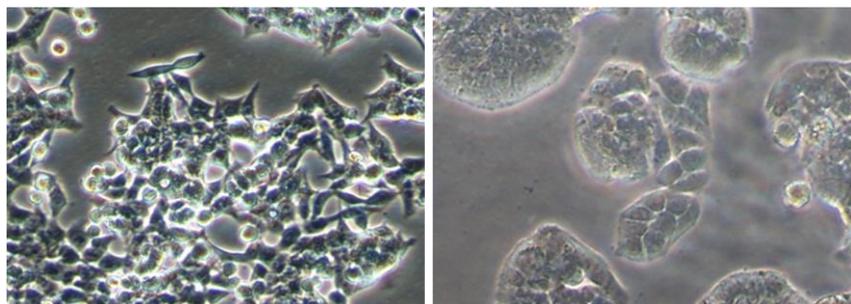


Abb. 3 HCT-116 (links) und HT-29 in Kultur

Abb. 3 zeigt die beiden Zelllinien und deren Wachstumsmuster unter dem Phasenkontrastmikroskop bei 100-facher Vergrößerung. Die beschriebenen Unterschiede im Wachstumsverhalten sind deutlich zu erkennen. HCT-116 wächst in spindelförmiger Zellstruktur, die Zellen sind flächig gestreut und haben teilweise pseudopodienartige Ausstülpungen. HT-29 zeigt eine in dichten Clustern gepackte, rundzellige Epithelstruktur, Zellausläufer oder sich isolierende Zellen kommen so gut wie nicht vor. In Abb. 4 sind die morphologischen Unterschiede zwischen Zellen mit überwiegend epithelialeem bzw. mesenchymalem Charakter an beiden Zelllinien gezeigt.

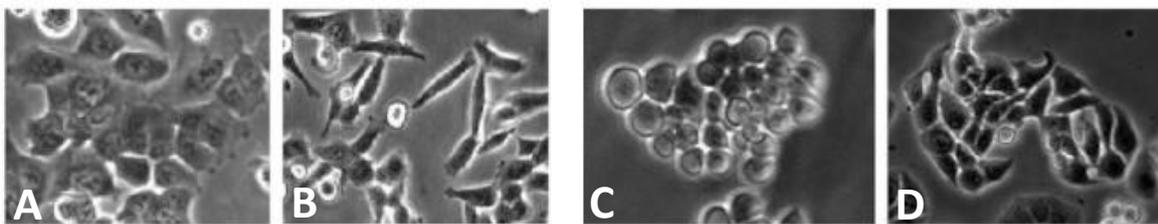


Abb. 4 HCT-116 (A,B) und HT-29 (C, D) mit epithelialeem (A, C) und mesenchymalem (B, D) Wachstum

2.1.2 MAP-Kinase-Inhibitoren

2.1.2.1 U0126

1,4-diamino-2,3-dicyano-1,4-bis-(2-aminophenylthio)-butadien, besser bekannt unter dem Namen U0126, wurde 1998 als hochselektiver Inhibitor der MEK1 und MEK2 sowie der Transkriptionsfaktoren AP-1 und NF- κ B identifiziert. Es wirkt ebenfalls als schwacher Inhibitor

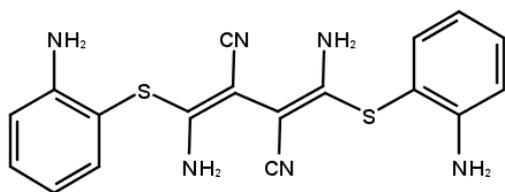


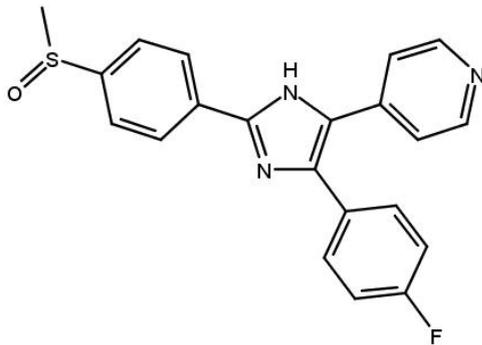
Abb. 5 Strukturformel von U0126

der PKC, Raf, ERK, JNK, MEKK, MKK-3, MKK-4/SEK, MKK-6, Cdk2 und Cdk4. Die Synthese erfolgte erstmals in den späten 1950er Jahren von W. J. Middleton. Es kommt in drei Isomeren vor und bleibt in kristalliner Form über viele Jahrzehnte

stabil [237]. Zunächst erhoffte man sich einen Einsatz als antiinflammatorisches Medikament, da es die Transkriptionsfaktoren unabhängig von der Interaktion mit dem Glukokortikoidrezeptor inhibiert, womit Nebenwirkungen der Kortikosteroide reduziert werden könnten. Der Effekt auf Tumorzellen wurde in den letzten Jahren verstärkt untersucht. In Brustkrebszellen erhöht U0126 z. B. die Sensitivität für Anoikis, also den programmierten Zelltod im Fall des Verlustes der Zell-Zellkontakte [238]. Dies ist ein interessanter therapeutischer Ansatzpunkt zur Verhinderung von Fernmetastasen.

2.1.2.2 SB203580

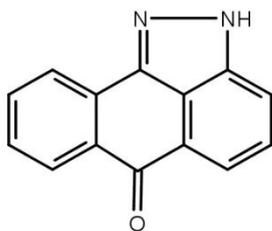
SB203580 (4-(4'-Fluorophenyl)2-(4'-methylsulfinylphenyl)-5-(4'-pyridyl)-1H-imidazol) ist ein



ATP-kompetitiver Inhibitor von p38 α / β Proteinkinasen. Es ist der Prototyp aller Pyridin-imidazolinhibitoren, musste allerdings aus klinischen Studien wegen möglicher Lebertoxizität zurückgezogen werden [239]. p38-Inhibitoren der nächsten Generation wurden bereits entwickelt und sind Mittelpunkt weiterer Studien [240].

Abb. 6 Strukturformel von SB203580

2.1.2.3 SP600125



1,9-Pyrazolanthron inhibiert selektiv und reversibel die c-Jun N-terminalen Kinasen (JNK) und damit auch die Expression von inflammatorischen Genen, wie z. B. COX-2, Interferon- γ , Interleukin-2 und TNF- α . Im Vergleich zu p38 oder ERK1 werden die JNK-Enzyme über 20-fach stärker blockiert [241].

Abb. 7 Strukturformel von SP600125

2.1.3 Chemikalien und Lösungen

Alle verwendeten Reagenzien werden bei der Beschreibung der einzelnen Verfahren entsprechend der Bezeichnung der Hersteller benannt. Weitere Angaben zu Chemikalien, Kits, Geräten und Gebrauchsmaterialien finden sich im Anhang (Anlage I).

2.1.4 Kultivierung humaner Zelllinien

Die nachfolgend beschriebenen Vorgänge für die Kultivierung der Zelllinien HTC116 und HT29 wurden im Institut bereits erfolgreich angewendet und daher übernommen. Soweit nicht anders angegeben, erfolgten alle Arbeitsschritte im Zusammenhang mit den Zelllinien unter einer Sterilbank mit Abzug.

2.1.4.1 Herstellen des Nährmediums

In eine 0,5 l RPMI 1640 Flasche wurden unter sterilen Bedingungen 50 ml FCS und 10 ml Antibiotikagemisch (1 % Penicillin/Streptomycin) hinzugegeben. Das FCS wurde zuvor zur

Inaktivierung für 30 Minuten bei 56 °C im Wasserbad erhitzt und wie auch das Antibiotikum bis zur Verwendung aliquotiert eingefroren.

2.1.4.2 Auftauen der Zellen

Die tiefgefrorenen Zelltubes wurden im Wasserbad bei 37 °C schnell aufgetaut und anschließend in 10 ml Kulturmedium aufgenommen. Dann wurden die Zellen für 10 Minuten bei 800 rpm langsam herunterzentrifugiert, der Überstand abgegossen und das Pellet in 10 ml neuem Medium aufgenommen, in eine 75 cm³ Kulturflasche überführt und weitere 10 ml Medium hinzugegeben. Die Inkubation erfolgte im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit. Der erste Mediumwechsel erfolgte nach 24 h.

2.1.4.3 Passagieren der Zellen

Die Zellen wurden regelmäßig unter dem inversen Mikroskop untersucht, das Medium je nach Bedarf alle 2-4 Tage gewechselt. Bei einer Wachstumsdichte von etwa 80 – 90 % wurden die Zellen subkultiviert. Dazu wurden PBS, Medium und Trypsin-EDTA-Lösung im Wasserbad auf 37 °C erwärmt. Nach Abziehen des Mediums aus der Kulturflasche wurden die Zellen einmal mit 5 ml PBS gewaschen und anschließend mit 5 ml Trypsin-EDTA für 60 Sekunden inkubiert. Nach Entfernen der Trypsin-EDTA-Lösung erfolgte eine 10-minütige Inkubation im Brutschrank bei o.g. Bedingungen. Die nun vom Flaschenboden gelösten Zellen wurden in 10 ml Medium aufgenommen, in ein 15 ml-Tube überführt und bei 800 rpm für 10 min herunterzentrifugiert. Das Pellet wurde nach Abgießen des Überstandes in 5 ml Medium resuspendiert und in einer Verdünnung von 1:5 bis 1:10 in neue Kulturflaschen gegeben. Die Passagennummer der Zellen erhöhte sich mit diesem Prozess um 1.

Bei Bedarf wurden die Zellen vor Verdünnung gezählt. Dafür musste zunächst eine 1:20 – Verdünnung der bereits vorhandenen Zellsuspension hergestellt werden. Es wurden 500 µl der Zellsuspension mit 9,5 ml Beckman Coulter – ISOTON-Diluent gemischt und in ein Zellzähler-Behältnis gegeben. Dann folgte der Messvorgang im Beckmann Cell Coulter Z2. Die ermittelte Zellkonzentration wurde je nach Verwendungszweck entsprechend verdünnt.

2.1.4.4 Einfrieren der Zellen

Um die Zellen über einen längeren Zeitraum tiefgefroren zu lagern, wurden die trypsinisierten Zellen in 8 – 10 ml PBS aufgenommen und in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen gegeben und bei 800 rpm für 10 min herunterzentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen, das Pellet in 500 µl Biofreeze-Gefriermedium (Biochrom AG) aufgenommen und in ein Kryoröhrchen

überführt. Anschließend erfolgte die langsame Abkühlung auf die endgültige Lagertemperatur von -170°C in Behältern unter flüssigem Stickstoff.

2.1.5 Migrations-Assay

Um die Veränderungen der Motilität und Morphologie der Zellen unter dem Einfluss von MAPK-Inhibitoren bzw. siRNA vergleichbar beurteilen zu können, wurden die Zellen in vorgefertigten Culture Inserts von ibidi ausgesät. Diese bestehen aus biokompatiblen Silikonmaterial und besitzen zwei Kammern von je $0,22\text{ cm}^2$ Wachstumsfläche, die durch eine $500\text{ }\mu\text{m}$ breite Silikonmembran

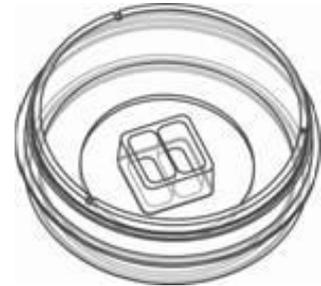


Abb. 8 ibidi Culture Insert
(Bild: www.ibidi.com)

getrennt sind (Abb. 8). Dadurch entsteht nach Festwachsen der Zellen und Entfernen des Inserts ein gleichmäßiger, zellfreier Spalt, welcher anschließend unter dem Videomikroskop beobachtet werden kann.

Die Inserts wurden unter der Sterilbank mit einer sterilen Pinzette auf eine 60 mm Petrischale (Falcon BD) gesetzt. Durch die anhaftende Fähigkeit des Materials auf glatten Oberflächen wird ein Verrutschen verhindert. Im Anschluss wurde eine Zellsuspension in der Konzentration von $5,5 \times 10^5$ Zellen/ml hergestellt und von dieser je $70\text{ }\mu\text{l}$ langsam in die beiden Kammern

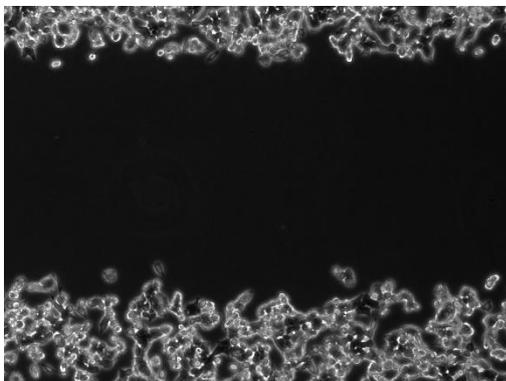


Abb. 9 HCT-116 nach 24h Wachstum im ibidi Culture Insert (10x Vergrößerung)

gegeben. Zusätzlich wurden 4 ml Kulturmedium außerhalb des Inserts in die Petrischale pipettiert. Die Inkubation erfolgte unter den bereits erwähnten Brutschrankbedingungen für 24 h . Nach dieser Zeit zeigte sich eine konfluierende Zellschicht in beiden Kammern. Das Insert wurde vorsichtig entfernt, die Zellen weiterbehandelt und videomikroskopisch betrachtet (Abb. 9).

2.1.6 Stimulation/Manipulation der Zellen

Die Stimulation der Zellen erfolgte zum einen durch direkten Knockout per siRNA gegen Syn-1 und Syn-4 und andererseits indirekt durch Inhibition von MAP-Kinasen. Die verschiedenen MAPK-Inhibitoren wurden laut Herstellerangaben wie folgt in fertigem Kulturmedium verdünnt und dann jeweils auf die vorbereiteten Zellen gegeben:

U0126: 14 µl in 5 ml Medium
SB203580: 14 µl in 5 ml Medium
SP600125: 5 µl in 5 ml Medium

Beim Migrationsassay erfolgte die Behandlung nach Entfernung des Culture Inserts, kurz bevor begonnen wurde, die Zellen unter dem Videomikroskop zu betrachten. Dabei wurde in die Petrischale ausreichend Medium inklusive Inhibitor gegeben, sodass ein Wechsel bis zum Abschluss des Experiments nicht mehr nötig war. Somit wurde eine ausreichende Konzentration des Inhibitors gewährleistet und ein Verrutschen des Versuchsaufbaus verhindert.

Für den direkten Knockout der Syndecane 1 und 4 wurde die Antisense-Oligonukleotidsequenz-Technik verwendet, bei der ein zur mRNA der Syndecane komplementärer RNA-Strang (small interfering RNA, siRNA) die Synthese der Proteine verhindert. Die Transfektion der siRNA (Syn-1: sc-36587, Syn-4 36588, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg) in die Zellen erfolgte mit dem Lipofectamine 2000 Transfektions-Kit (Invitrogen, Groningen, Niederlande) standardisiert nach den Angaben des Herstellers.

2.2 Videomikroskopie

Die Versuchsreihen erfolgten im Institut für Molekulare und Klinische Immunologie des Universitätsklinikums Magdeburg am Konfokalmikroskop LEICA TCS SP2 mit freundlicher Unterstützung von Herrn Dr. Roland Hartig. Um Aussagen über die Veränderungen im Wanderungsverhalten nach Stimulation der Zellen machen zu können, wurden die präparierten Zellen unter dem Videomikroskop betrachtet. Die Apparatur lieferte Brutschrankbedingungen (37 °C, 5 % CO₂, 95 % relative Luftfeuchtigkeit) und somit die Grundlage für optimales Zellwachstum. Alle 15 Minuten wurde ein Foto aufgenommen. Die Beobachtung erfolgte für maximal 96 Stunden. Das Experiment wurde vorzeitig abgebrochen, sobald der zellfreie Spalt nicht mehr zu sehen war.

Die Auswertung der Bilder erfolgte mit der Software ImageJ, Version 1.44a, 64-bit. Um die zellfreie Fläche zu bestimmen, waren mehrere Arbeitsschritte pro Bild notwendig. Diese sollen folgend an einem Beispielbild erläutert werden (siehe dazu Abb. 10):

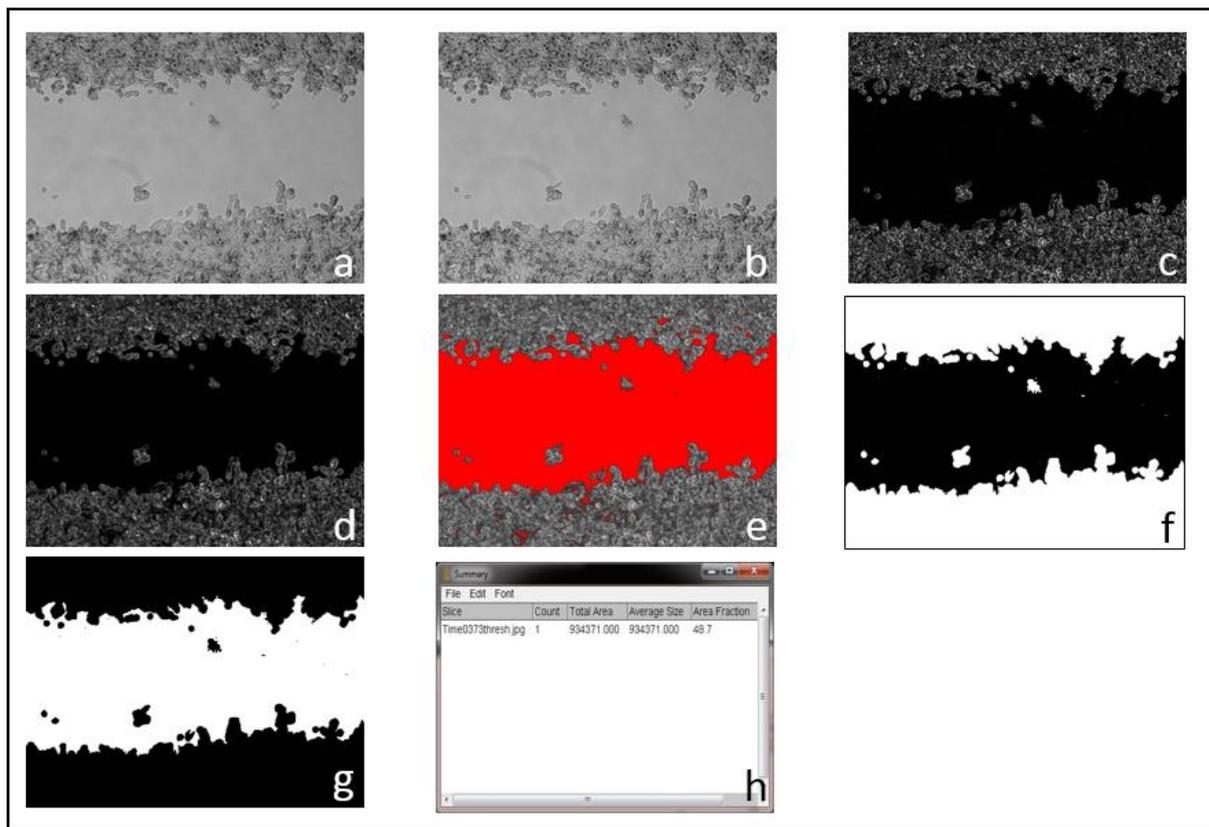


Abb. 10 Bildbearbeitungsprozess mit ImageJ

Nach Umwandlung des Originalbildes in 8-bit Farbtiefe (a) erfolgte die Schärfung des Bildes (b). Mit der Funktion „Kanten finden“ wurden kontrastreiche Übergänge zwischen benachbarten Pixelbereichen hervorgehoben (c). Mittels eines Gaußschen Weichzeichnungsfilters wurde das Bild geglättet (d). Kleinere Strukturen gehen dadurch im Bild verloren (z. B. auch das Rauschen im zellfreien Spalt), größere bleiben erhalten. Nun wurden ein oberer und unterer Schwellwert (Threshold) festgelegt, um den dunklen Hintergrund als aktive Region zu definieren, die den weiteren Messungen zugrunde liegt (e).

Das eingebaute Werkzeug „Analyze Particles“ erlaubt es, im ausgewählten Bereich einzelne Strukturen ab einer festgelegten Größe zu erkennen und auszuzählen. Ebenso wird im Anschluss daran eine Maske in schwarz-weiß angezeigt, die den errechneten Bereich darstellt (f). Diese Maske wurde noch farblich invertiert, um zur besseren Erkennung die Zellmasse dunkel darzustellen sowie anschließend gespeichert (g). Die errechneten Werte (u. a. Größe und prozentualer Anteil der Fläche) gibt ImageJ dann in einer Tabelle aus, die zur weiteren Auswertung mit Microsoft Excel 2013 gespeichert wurden. Wenn bei einer Messung kein Bereich über 10.000 Quadratpixeln mehr gefunden werden konnte, was bei einer Bildauflösung von 1600 x 1200 px einem Anteil von unter 0,5 % der Gesamtfläche entspricht, so wurde dies als Abbruchkriterium definiert. In einem Diagramm wurde dann die

bewachsene Fläche in Prozent zum Zeitpunkt (x) aufgetragen. Diese Prozedur wurde über ein eigens hierfür erstelltes Script dann auf alle Bilder einer Serie angewendet, welches nachfolgend angegeben ist.

```
run("Sharpen");
run("Find Edges");
run("Gaussian Blur...", "sigma=2");
setAutoThreshold("Default");
//run("Threshold...");
run("Analyze Particles...", "size=10000-Infinity circularity=0.00-1.00 show=Masks clear summarize add");
run("Invert");
run("Save", "save=[DATE\PFAD]");
```

2.3 RNA-Analytik

2.3.1 Präparation von Gesamt-RNA aus kultivierten Zellen

Beide Zelllinien wurden in einer festgelegten Konzentration von $1,3 \times 10^6$ Zellen auf 25 ml für 24 Stunden unter Standardbedingungen inkubiert. Anschließend erfolgte der Wechsel des Mediums, welches mit dem jeweiligen Inhibitor in oben genannter Konzentration angereichert war. Nach erneuten 24 Stunden Inkubation begann die weitere Aufarbeitung. Die Isolierung von RNA aus HCT-116 und HT-29 erfolgte mit dem peqGOLD TriFast-Reagenz von peqlab. Dazu wurden laut Herstellerangabe je 10 cm^2 Fläche der Zellkulturflasche 1 ml des Reagenz gegeben, durch mehrmaliges Aufziehen mit der Pipette lysiert und in ein Probenröhrchen überführt. Nach 5 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurden pro Probe 0,2 ml Chloroform pro eingesetztem Milliliter TriFast zugegeben, kräftig geschüttelt und erneut für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgte die Zentrifugation mit 12.000 U/min für 5 Minuten zur Phasentrennung. Die wässrige Phase, in welcher sich die RNA anreichert, wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 0,5 ml Isopropanol pro Milliliter TriFast zur Ausfällung gebracht. Nach erneuter Inkubation von 10 Minuten bei Raumtemperatur und Zentrifugation (10 min, 12.000 U/min) erfolgte das zweimalige Waschen des RNA-Pellets mit 75%-igem Ethanol sowie die erneute Zentrifugation.

Der Überstand wurde abgenommen, das Pellet luftgetrocknet und im Anschluss in RNase-freiem DEPC-Wasser aufgenommen. Eine folgende Inkubation im Thermoblock bei 64°C für 10 Minuten sorgte für vollständige Auflösung der RNA. Die Konzentrationsmessung erfolgte im Photometer. Für eine spätere Weiterverarbeitung wurde die RNA bei -80°C gelagert.

2.3.2 Reverse Transkription

Zur Umschreibung der extrahierten RNA in cDNA kam das Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Sample Kit von Roche zum Einsatz. Ein Probenansatz mit 2 µg/µl RNA wurde mit 1 µl Oligo(dT)18 (c = 50 pmol/µl) versehen und mit DEPC-Wasser auf 11,4 µl aufgefüllt. Nach zehnmütiger Inkubation bei 65°C wurden die Proben auf Eis abgekühlt und mit dem in Anlage II aufgeführten Reaktionsansatz auf das Gesamtvolumen von 20 µl aufgefüllt. Dann erfolgte die Synthese der cDNA im Thermocycler für 30 min bei 55°C. Durch die dann folgende Hitzeinaktivierung bei 85°C für 5 min und anschließende Abkühlung auf 4°C konnte die Reaktion beendet werden. Von diesem Reaktionsansatz kamen 2 µl für die quantitative Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zum Einsatz.

2.3.3 Quantitative Real-Time PCR am Light Cycler

Der Light Cycler der Firma Roche Diagnostics ist ein Gerät, welches einen PCR-Cycler und ein Fluorimeter miteinander kombiniert. Ein angeschlossener PC mit spezifischer Software wertet die quantitativen Analysen aus.

Bei der Echtzeit-PCR wird ein Farbstoff (hier SYBR-Green) in die doppelsträngige DNA eingelagert, der fluoresziert, wenn er mit Licht angeregt wird. Das Fluoreszenzsignal kann über die gesamte Zeit der PCR erfasst werden und ist zu jedem Zeitpunkt direkt proportional zu der gebildeten DNA-Menge. Durch den parallelen Ansatz mit DNA bekannter Konzentrationen wird eine Standardkurve erstellt. Es kamen die Reagenzien aus Anlage III (Gesamtvolumen 20µl) und die in Tab. 1 angegebenen Primer in Verbindung mit dem SensiMix™ SYBR® & Fluorescein Kit von Quanta zur Anwendung. Es wurde eine Schmelztemperatur von 65°C festgelegt. Eine Verdünnungsreihe des jeweils spezifischen Plasmides diente als Positivkontrolle und zur exakten Quantifizierung der übrigen Proben.

Primer	Primerrichtung	Primer-Sequenz
18S rRNA	sense	5'-CGG CTA CCA CAT CCA AGG-3'
	antisense	5'-GCT GGA ATT ACC GCG GCT-3'
Syn-1	sense	5'-CCC CGT TTC TGG TGG TCT-3'
	antisense	5'-TCC CAG CAT TCA CTT CTC AC-3'
Syn-4	sense	5'-CCT TGG TGC CAC TAG ATA AC-3'
	antisense	5'-TGG TGG GGG CTT TTT TGT AG-3'

Tab. 1 Verwendete Primer der RT-PCR

Tab. 2 zeigt die im Lightcycler ablaufenden Schritte inklusive der zugehörigen Temperaturen und Zeiten.

	Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
Denaturierung	95 °C	00:05:00	1
Amplifikation	95 °C	00:00:15	40
	54 °C	00:00:15	
	72 °C	00:00:15	
Schmelzkurve	95 °C	00:00:10	1
	65 °C	00:00:10	
	99 °C	kontinuierlich	
Abkühlung	40 °C	00:01:00	1

Tab. 2 Lightcycler Protokoll der RT-PCR

Um die einzelnen Proben untereinander vergleichen zu können, wurde die Gesamt-mRNA-Menge mittels eines sogenannten Haushaltsgens („Housekeeping-Gen“) bestimmt. Parallel zur Amplifikation der Syndecane erfolgte der Ansatz mit 18S rRNA (BioTeZ, Berlin). Der Quotient aus gewünschter cDNA und 18S-Transkripte der Probe wurde dann für die Auswertung gebildet und in artifiziellen Einheiten (a.u.) angegeben.

2.3.4 Agarose-Gelelektrophorese

Um die PCR-Produkte zu überprüfen, wurden diese in 2 %-igem Agarosegel per Elektrophorese aufgetrennt. Dazu wurden 2 g Agarose auf 100 ml Gesamtvolumen mit TBE gelöst und in der Mikrowelle bei 600 W für 3 min aufgekocht. Anschließend wurden 5 µl des fluoreszierenden Farbstoffen Ethidiumbromid (c = 0,5 µg/ml) hinzu gegeben, das Gel abgekühlt und in eine Gelkammer gegossen. Mit 1x TBE (5xTBE (pH 8,3): 54 g Tris, 27,5 g Borsäure (Na-Salz), 20 ml 0,5 M EDTA, ad 1 l dH₂O) als Laufpuffer wurde die Gelkammer aufgefüllt. 25 µl PCR-Produkt

wurden mit 5 µl Ladepuffer vermischt und davon 7,5 µl in einen Gel-Slot gegeben. Als Standardmarker dienten pro Gel 5 µl HyperLadder IV (Bioline, London, UK). Die Elektrophorese fand bei 50 – 100 V für 60 min statt. Da die quantitative Bestimmung am Light Cycler erfolgte, wurde auf die densitometrische Auswertung verzichtet.

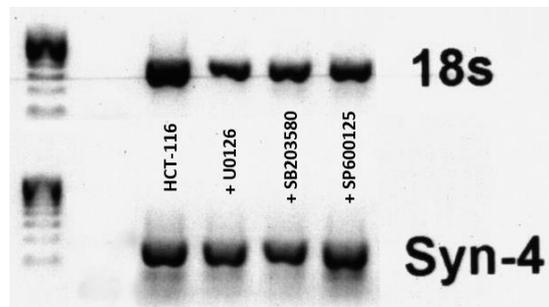


Abb. 11 Gelelektrophorese der PCR-Produkte von Syn-4 und 18s für HCT-116 + MAPK-Inhibitoren

3 Ergebnisse

3.1 Ergebnisse der RT-PCR

Die vom Light Cycler ausgegebenen Kurven und Werte sind beispielhaft für alle folgenden Rechnungen in Abb. 12 und Abb. 13 dargestellt. Die Werte wurden in Microsoft Excel übertragen und jeweils der Quotient Syndecan/18s Plasmid gebildet. Die Werte wurden zur besseren Vergleichbarkeit in Prozent angegeben, wobei die jeweils unbehandelte Zellreihe als 100% gesetzt wurde.

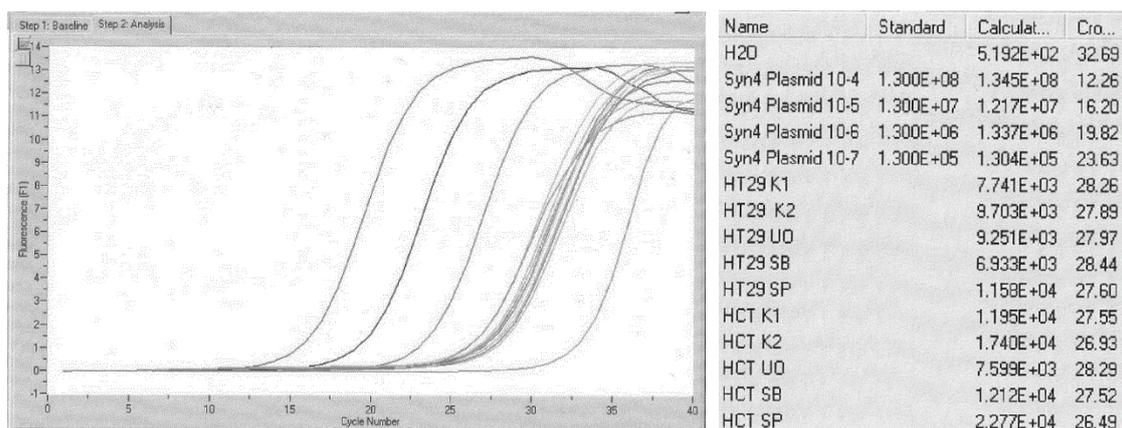


Abb. 12 Fluoreszenz der PCR-Produkte in Abhängigkeit von der Zykluszahl (links) und Wertetabelle der anhand der Eichgerade errechneten Werte, Angabe erfolgt in artifiziellen Einheiten

Die Kurven aus Abb. 12 zeigen die Fluoreszenz der einzelnen Proben in Abhängigkeit zur Anzahl der durchlaufenen Amplifikationszyklen, wobei die Intensität der SYBR-Green-Fluoreszenz direkt proportional zur Konzentration des neu gebildeten PCR-Produktes ist.

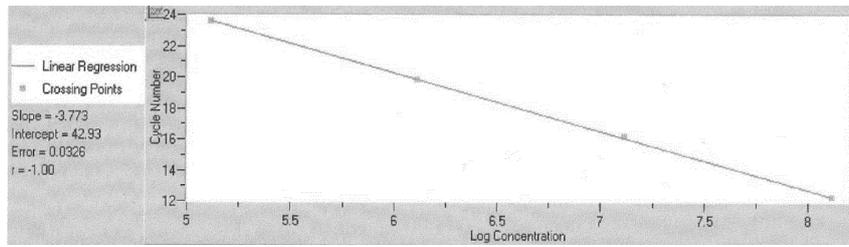


Abb. 13 Regressionsgerade, Verdünnungsreihe der Syn-4-Plasmide

Mit Hilfe der integrierten Software wird jeder Probe ein sogenannter CP-Wert („crossing point“) zugeordnet. Dieser wird bei Eintritt in die exponentielle Phase der Amplifikation gemessen, welche eine Quantifizierung der Proben unter annähernd gleichen Bedingungen erlaubt. Aus den CP-Werten der hergestellten Syndecan-Plasmid-Verdünnungsreihe wird eine Standardgerade erstellt (Abb. 13). Die Konzentration der zu untersuchenden Proben wird dann mittels der ermittelten CP-Werte und der Standardgeraden errechnet und in einer Tabelle ausgegeben (Abb. 12, rechts). Die Überprüfung auf Signifikanz erfolgte mit dem gepaarten zweiseitigen T-Test. Ein Ergebnis mit $p < 0,05$ wurde als signifikant betrachtet.

3.1.1 Expressionsregulation von Syn-1 und Syn-4 in HCT-116

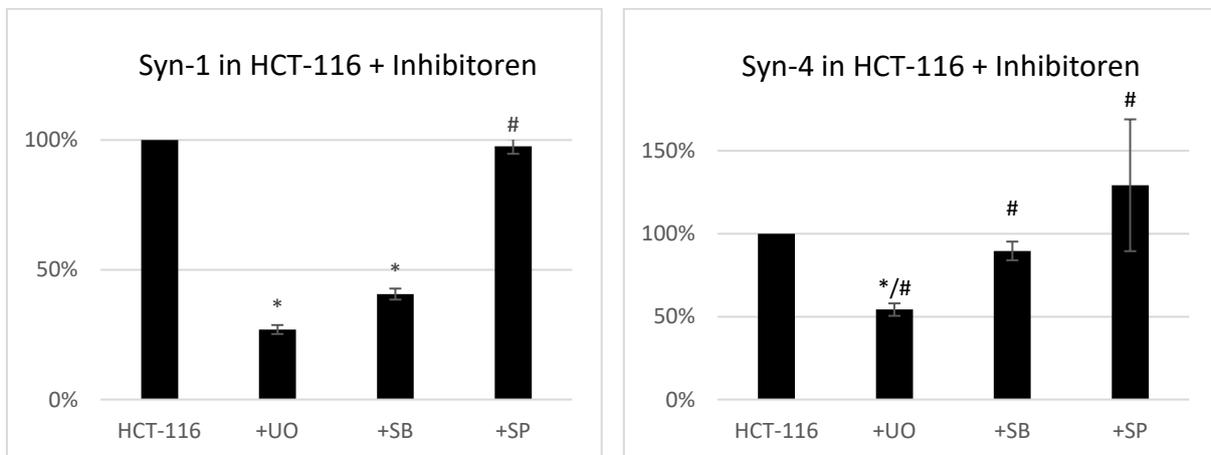


Abb. 14 Expression von Syndecan 1 und 4 in HCT-116 + Inhibitoren
HCT-116 + U0126 (+UO), HCT-116 + SB203580 (+SB) und HCT-116 + SP600125 (+SP). * $p < 0,05$; # $p > 0,05$

Nach 24-stündiger Behandlung der HCT-116 Zellen mit den verschiedenen Inhibitoren zeigen sich bereits erste Veränderungen der Expression von Syn-1 bzw. Syn-4 mRNA. Wie in Abb. 14 zu erkennen ist, wird unter Behandlung mit U0126 bzw. SB203580 eine signifikante Reduktion der Syn-1 Expression auf 27 % ($p = 0,015$) bzw. 41 % ($p = 0,02$) erreicht. Die Behandlung mit SP600125 konnte keine signifikante Änderung aufzeigen (97 % des Ausgangswertes; $p = 0,55$).

Für Syn-4 konnte eine grenzwertig signifikante Reduktion der mRNA-Konzentration nur unter U0126 auf 54 % gezeigt werden ($p = 0,05$). Mit SP600125 stieg die Konzentration im Mittel auf 129% des Ausgangswertes, ist jedoch aufgrund großer Streubreite der Einzelwerte nicht im signifikanten Bereich ($p = 0,59$). SB203580 zeigt eine leichte Reduktion der mRNA-Menge auf knapp 90 % ($p = 0,31$).

Zusammenfassend kann geschlussfolgert werden, dass eine Blockade des MEK1 und MEK2-Signalweges eine deutliche Reduktion der mRNA für Syndecan 1 und 4 in HCT-116 bewirkt. Die Inhibierung des p38-Signalweges zeigte nur eine signifikante Reduktion bei Syn-1, während Syn-4 nahezu unverändert blieb. Über eine Ausschaltung der JNK ließ sich keine statistisch relevante Änderung der mRNA-Konzentrationen erzielen.

3.1.2 Expressionsregulation von Syn-1 und Syn-4 in HT29

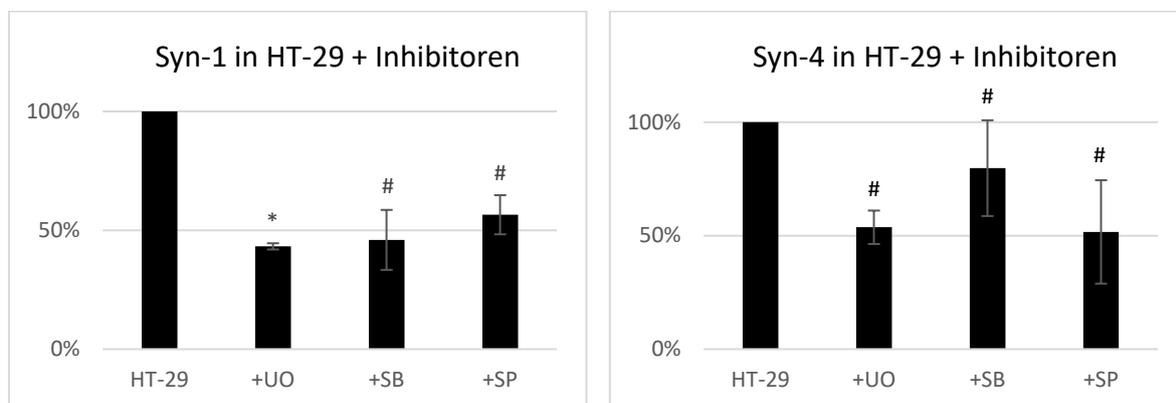


Abb. 15 Expression von Syndecan 1 und 4 in HT-29 + Inhibitoren + U0126 (+UO), + SB203580 (+SB) und + SP600125 (+SP). * $p < 0,05$; # $p > 0,05$

Die Behandlung der Zelllinie HT-29 zeigt unter U0126 eine Reduktion der Syn-1-mRNA im signifikanten Bereich auf 43 % ($p = 0,01$). Die beiden weiteren Inhibitoren zeigen ähnliche Tendenz mit 46 % für SB203580 ($p = 0,15$) und 56 % für SP600125 ($p = 0,11$). Die Menge an Syn-4-mRNA wurde nicht signifikant verändert. Es erfolgte eine Reduktion auf 54 % mit U0126 ($p = 0,10$), auf 80 % mit SB203580 ($p = 0,51$) und auf 52 % mit SP600125 ($p = 0,28$).

Trotz der teils fehlenden Signifikanz aufgrund der kleinen Stichprobe ist dennoch ein Trend hin zur Reduktion der Syndecane zu erkennen. Wie bei HCT-116 zeigt sich hier die deutlichste Reduktion beider Syndecane nach Blockade der MEK1/MEK2, wobei nur eines der beiden Ergebnisse signifikant ist. Die Inhibierung der anderen Signalwege geht ebenfalls nicht mit einer signifikanten Veränderung der Syn-1 bzw. -4 Expression einher, folgt aber ebenfalls dem Trend hin zur Reduktion.

3.2 Veränderungen von Morphologie und Motilität durch Inhibierung von MAP-Kinasen und Knockdown der Syndecane in der Videomikroskopie

3.2.1 HCT-116, unbehandelt

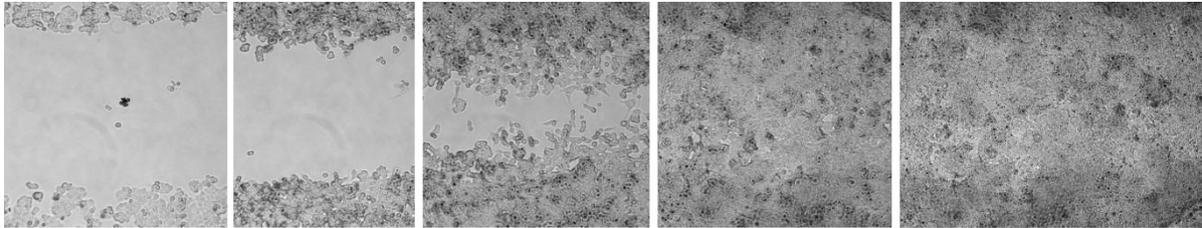


Abb. 16 HCT-116 nach 0, 24, 48, 72 und 96 Stunden Wachstum

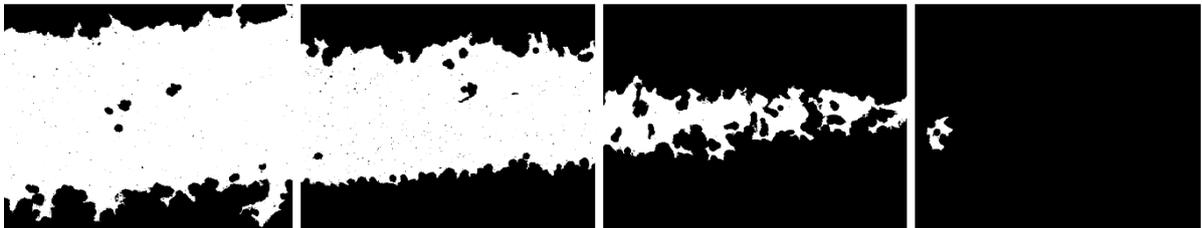


Abb. 17 Bewachsene Fläche nach Bearbeitung mit ImageJ bei 0, 24, 48 und 53 Stunden

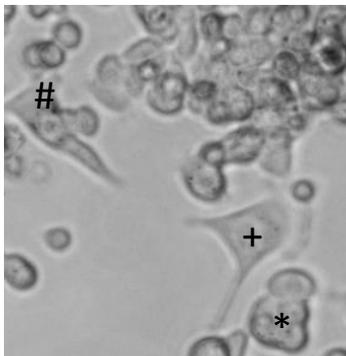


Abb. 18 Gleichzeitiges Vorliegen von Zellen mit epithelialem () und mesenchymalem (+) Charakter sowie Übergangsformen (#)*

Die unbehandelten Tumorzellen zeigen das für sie bekannte Wachstumsmuster mit multiplen, polygonalen Ausläufern. Zunächst erfolgt eine Verdichtung der bestehenden Zellschicht (stationäre Phase, lag-Phase), um im Anschluss mit der Migration zu beginnen (exponentielles Wachstum, log-Phase). Dabei kommt es zum Herauslösen einzelner Zellen und Zellgruppen aus dem Verband, wobei teilweise die epitheliale Struktur verloren geht und die Zellen einen mesenchymalen Charakter annehmen (Budding, EMT, siehe Abb. 18). Die Zellen überleben problemlos

ohne weitere Zell-Zell-Kontakte, sind also resistent gegenüber der Anoikis. Zu Beginn des Experimentes waren 34,4 % der beobachteten Fläche bewachsen. Nach einem Tag waren es 53,7 %, nach 48 Stunden 94,6 % und der Verschluss konnte rechnerisch nach etwa 53 Stunden beobachtet werden (Abb. 16). In Abb. 17 sind die Bilder nach Bearbeitung mit ImageJ zu sehen, deren prozentualer Anteil an bewachsener (= schwarzer) Fläche über die Zeit in einem Diagramm dargestellt ist (Abb. 19).

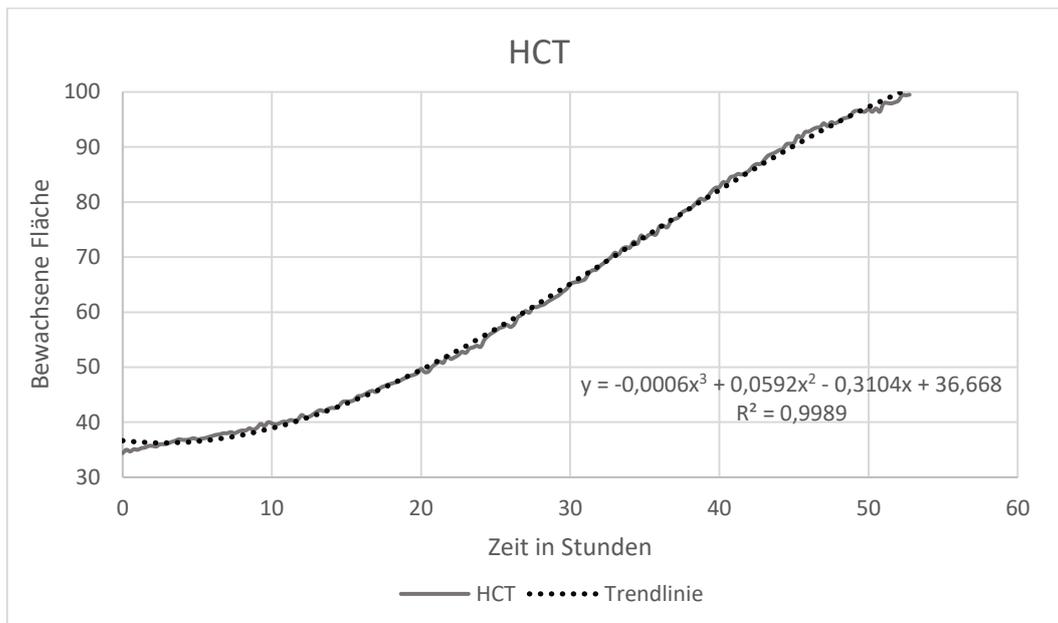


Abb. 19 Prozentuale Zunahme der bewachsenen Fläche über die Zeit bei HCT-116

t in h	% Fläche						
0	34,4	16	44,8	32	68,4	48	94,6
1	35	17	45,5	33	70,8	49	96,4
2	35,7	18	47	34	71,7	50	96,9
3	36,1	19	48,1	35	73,4	51	97,9
4	36,8	20	49,7	36	75,6	52	98,4
5	36,9	21	50,6	37	76,9	53	99,5
6	37,5	22	51,5	38	78,7		
7	38	23	52,6	39	80,4		
8	38,5	24	53,7	40	82,7		
9	39	25	56,6	41	84,7		
10	39,8	26	57,3	42	85,7		
11	40,1	27	60,2	43	87,6		
12	41,3	28	61,2	44	89,4		
13	41,9	29	62,7	45	90,7		
14	42,6	30	65,1	46	92,8		
15	43,8	31	66	47	94,3		

Tab. 3 Prozentuale Zunahme der bewachsenen Fläche in Zahlen

Die von Excel errechnete Trendlinie ist mit ihrer Formel für jedes Experiment angegeben. Das Bestimmtheitsmaß von $R^2 = 0,9989$ zeigt eine starke Korrelation mit der HCT-116 Wachstumskurve an und wird daher in weiteren Diagrammen als Vergleichskurve verwendet. Die exakten Zahlenwerte sind in Tab. 3 exemplarisch aufgelistet. Der Übersicht halber wird auf die vollständige Angabe der numerischen Ergebnisse in den nachfolgenden Kapiteln verzichtet.

3.2.2 HCT-116 unter Zusatz von Syn-4-siRNA

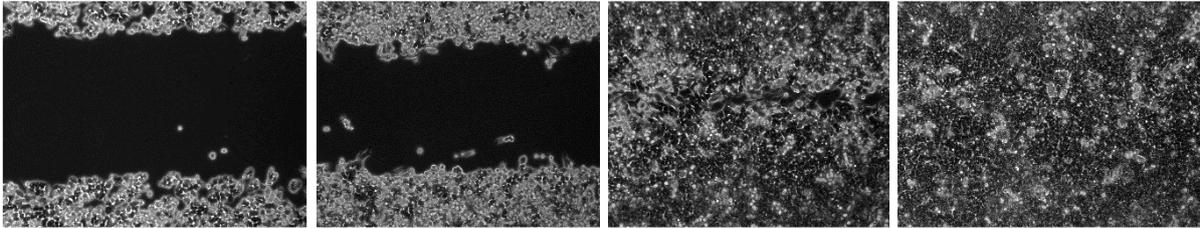


Abb. 20 HCT-116 + Syn-4 siRNA nach 0, 24, 48 und 72 Stunden Wachstum

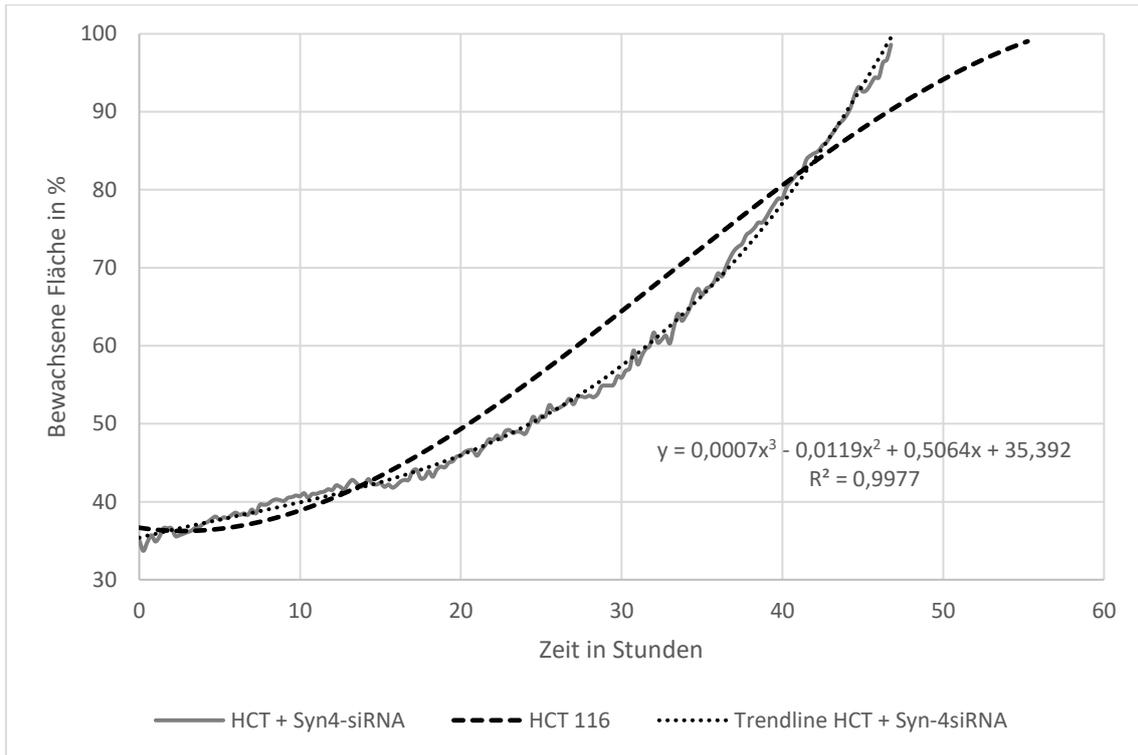


Abb. 21 Prozentuale Zunahme der bewachsenen Fläche über die Zeit bei HCT-116 + Syn-4 siRNA

Die Wachstumskurve unter Zusatz von Syn-4 siRNA zeigt zunächst einen ähnlichen Verlauf wie die der unbehandelten Zellen. Ab der 15. Stunde beginnen die Kurven stärker voneinander abzuweichen, wobei die unbehandelten Zellen vorerst einen steileren Wachstumsanstieg zeigen. Ab Stunde 30 beginnen die mit Syn-4 siRNA behandelten Zellen überproportional stärker zu wandern und haben den Schluss des Zellspaltes sogar nach ca. 48 Stunden erreicht. Diese Beobachtung verstärkt die bereits erwähnte Beteiligung von Syn-4 an focal adhesions, wonach dementsprechend weniger Syn-4 zu

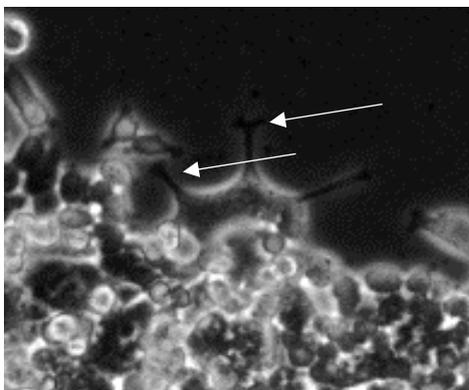


Abb. 22 Unvollständige EMT an der Invasionsfront von HCT-116 + Syn-4 siRNA

gesteigerter Motilität führt. Morphologisch ist zu beobachten, dass es im Vergleich zur unbehandelten Zelle zu Veränderungen mit Ausbildung stummelartiger Pseudopodien kommt, die einer beginnenden mesenchymalen Transformation entsprechen (Abb. 22, weiße Pfeile). Die EMT wird jedoch nicht vollständig vollzogen und das Budding ist im Gesamtverlauf vermindert. Die Hemmung von Syn-4 resultiert somit nicht nur in einer erhöhten Wachstumsgeschwindigkeit, sondern einer verminderten EMT mit reduziertem Budding.

3.2.3 HCT-116 unter Zusatz von Syn-1-siRNA

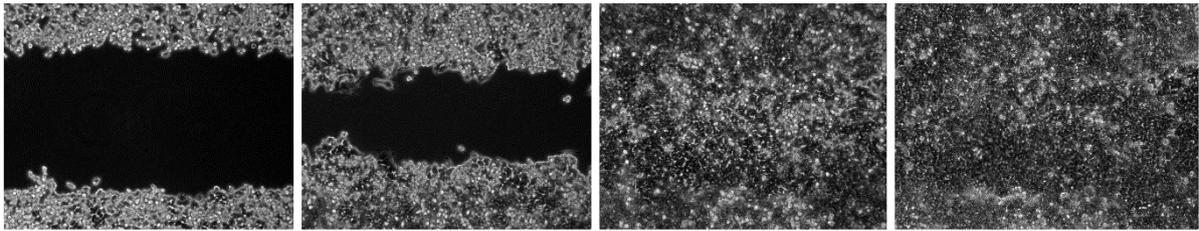


Abb. 23 HCT-116 + Syn-1 siRNA nach 0, 24, 48 und 72 Stunden Wachstum

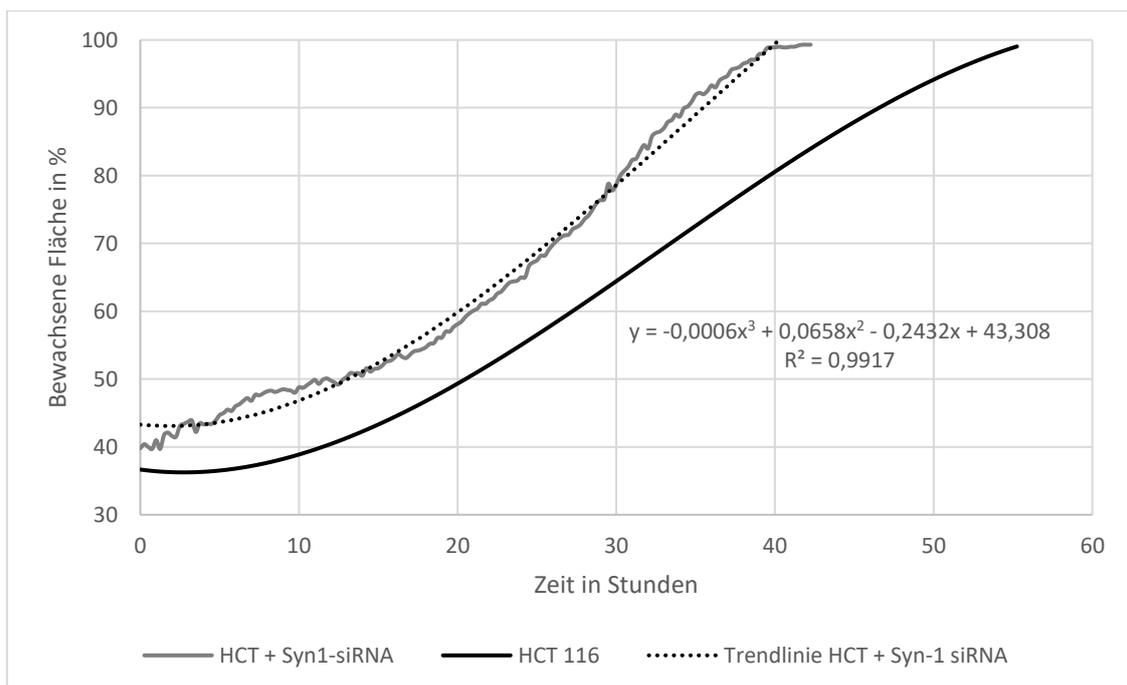


Abb. 24 Prozentuale Zunahme der bewachsenen Fläche über die Zeit bei HCT-116 + Syn-1 siRNA

Durch die Behandlung der Zellen mit siRNA für Syn-1 zeigte sich von allen Beobachtungen die deutlichste Steigerung der Wachstumsgeschwindigkeit. Die zellfreie Fläche war nach etwa 40 Stunden bereits vollständig bewachsen. Man sieht ein überwiegend epitheliales Wachstumsmuster, wobei die kubische Morphologie eher in eine rundzellige übergeht. Der

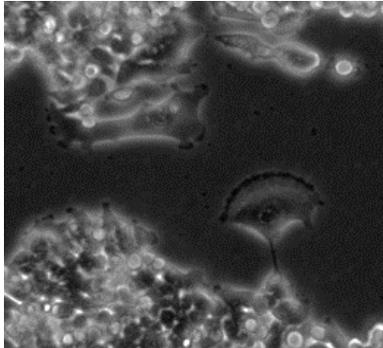


Abb. 25 „Riesenzellen“ unter Behandlung mit Syn-1 siRNA

Zellverband erscheint nicht als kompakte Struktur, sondern lässt auch kleinere Lücken erkennen, die erst nach Beginn der Migration beider Fronten geschlossen werden. Die Fixierung an der Oberfläche ist demnach verringert. Das Tumorbudding ist erhöht, die EMT ist im Vergleich zu unbehandelten HCT-116 stark gesteigert an der Grenze zum zellfreien Bereich. Auffällig sind einige Zellen, die eine enorme Größe erreichen, mesenchymalen Charakter besitzen und weiter über die restlichen Zellen herausragen (Abb. 25). Sie behalten stets Anbindung zur Wachstumsfront und sind mit einer Vielzahl an dunklen, Pseudopodien-ähnlichen Fortsätzen ausgestattet.

3.2.4 HCT-116 unter Zusatz von U0126

Durch Zugabe des MEK1/MEK2-Inhibitors U0126 konnte eine Reduktion der Wachstumsrate erzeugt werden. Zu Beginn waren 36,5 % der Fläche bewachsen, nach 24 h 51,6 %, nach 48 h 71,8 %, nach 72 h 84,4 % und bei Abbruch des Experimentes nach 98 h waren 91,3 % der beobachteten Fläche mit Zellen bedeckt (

Abb. 26 + Abb. 27). Die Wachstumskurve zeigt einen eher linearen als exponentiellen Verlauf, was unter Umständen auf ein vermehrtes Absterben von Zellen innerhalb des Verbandes hinweisen könnte. Morphologisch ist zu erkennen, dass die Zellen als geschlossene Front aufeinander zu wachsen und sich keine Budding-typischen Formationen zeigen. Zellen, die sich aus dem Verband gelöst haben, verlieren den epithelialen Charakter und sterben nach kurzer Zeit ab (Abb. 28). Hier zeigt sich, dass diese Zellen in den programmierten Zelltod nach Verlust der Zell-Zell-Kontakte übergehen, was einen deutlichen Unterschied zu den unbehandelten Zellen darstellt. Die Resistenz gegenüber der Anoikis ist demnach aufgehoben. Auch die Transition in einen mesenchymalen Charakter ist so gut wie nicht vorhanden und tritt erst gegen Ende der Beobachtungen auf, als sich die Zellfronten einander angenähert haben.

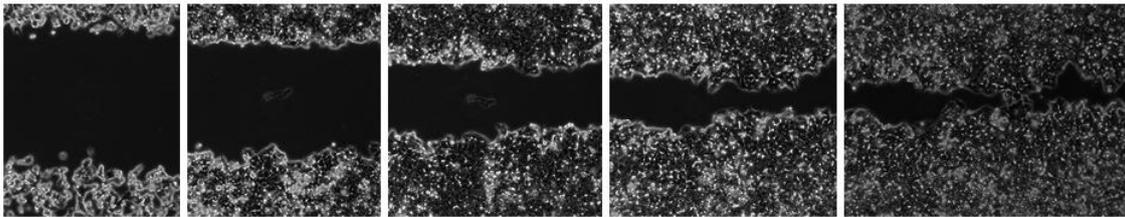


Abb. 26 HCT-116 + U0126 nach 0, 24, 48, 72 und 96 Stunden Wachstum

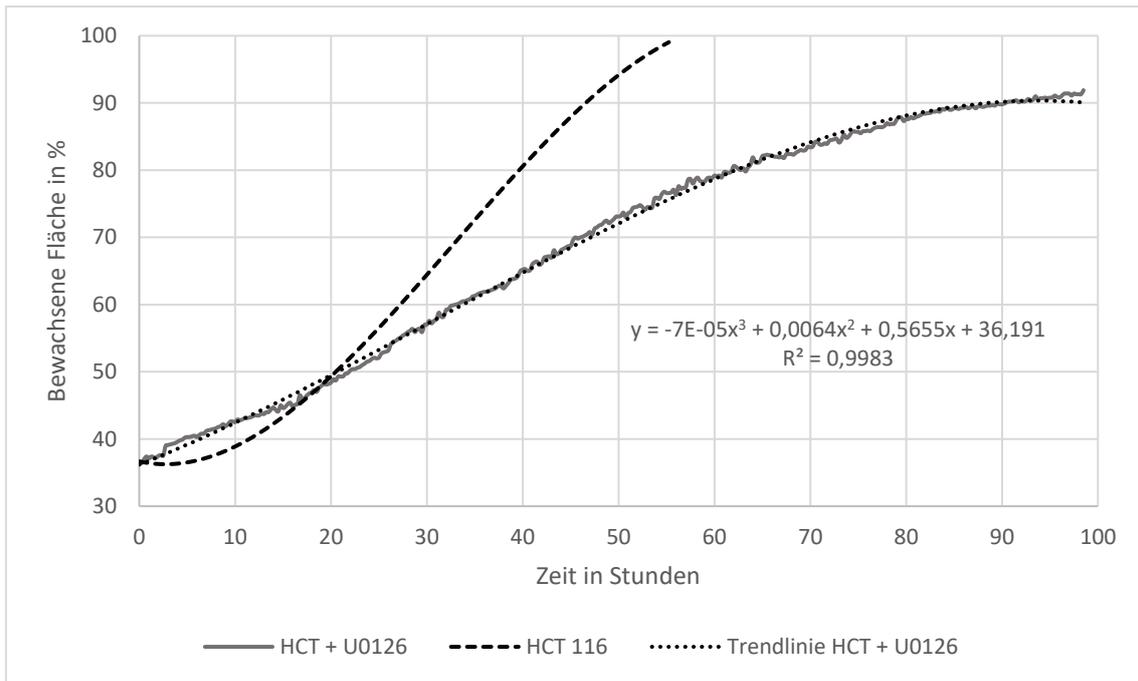


Abb. 27 Prozentuale Zunahme der bewachsenen Fläche über die Zeit bei HCT-116 + U0126

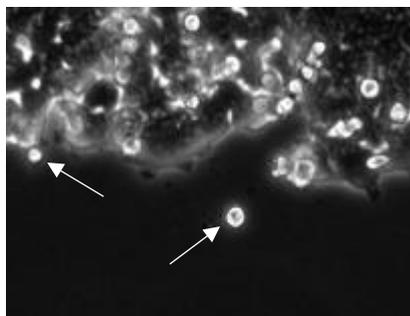


Abb. 28 Apoptotische Zellen (Pfeile) nach Verlust der Anbindung zur Zellfront

3.2.5 HCT-116 unter Zusatz von SB203580

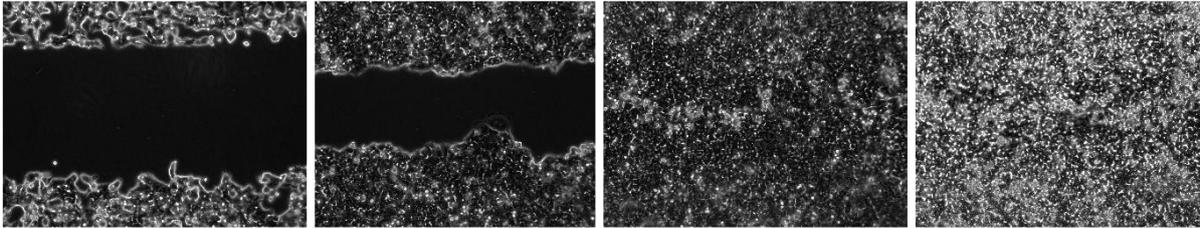


Abb. 29 HCT-116 + SB203580 nach 0, 24, 48 und 72 Stunden Wachstum

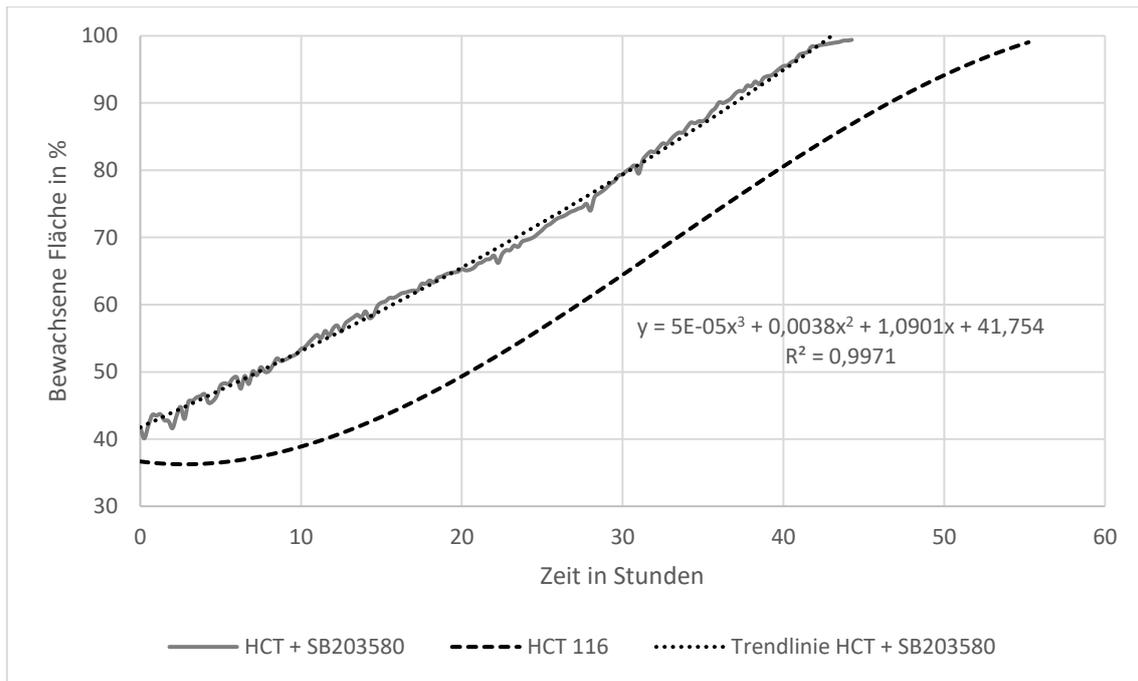


Abb. 30 Prozentuale Zunahme der bewachsenen Fläche über die Zeit bei HCT-116 + SB203580

Unter Zusatz von SB203580 zeigt sich, dass die stationäre Phase des Zellwachstums wesentlich kürzer ist als bei unbehandelten Zellen. Die Wachstumskurve verläuft von Beginn an fast linear. Die exponentielle Phase des Wachstums ist bei beiden Populationen annähernd gleich, was anhand der nahezu parallel verlaufenden Wachstumskurven ab ca. Stunde 15 erkennbar ist. Der Verschluss des zellfreien Spaltes wurde nach 44,25 h erreicht. Besonderes Augenmerk ist auf das fehlende tumor budding zu richten. Die sonst übliche Transformation zu mesenchymalen Zellen ist verringert sowie die Wanderung von einzelnen Zellen bzw. Zellclustern fast komplett aufgehoben. Die Zellfronten wachsen scharf abgegrenzt aufeinander zu. Es kommt auch hier zur Apoptose bei Zellen, die den Verband verlassen, allerdings aber auch gehäuft bei Zellen, die zwar noch Anbindung zur Umgebung haben, aber bereits in die mesenchymale Transition übergegangen sind.

In Abb. 31 ist zu sehen, dass nach dem Verlust des epithelialen Charakters und der Ausbildung der für mesenchymalen Zellen typischen Pseudopodien der Zelltod innerhalb kurzer Zeit folgt. Dieser Vorgang ist während der gesamten Beobachtungszeit mehrfach an der Wachstumsfront zu sehen.

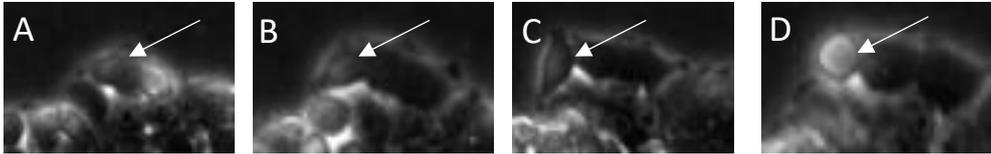


Abb. 31 EMT mit anschließender Apoptose bei einer mit SB203580 behandelten HCT-116 Zelle (Pfeil). Die zeitlichen Abstände der Bildsequenz von A zu B und von B zu C betragen jeweils 2 Stunden, von C zu D nur 1 Stunde.

3.2.6 HCT-116 unter Zusatz von SP600125

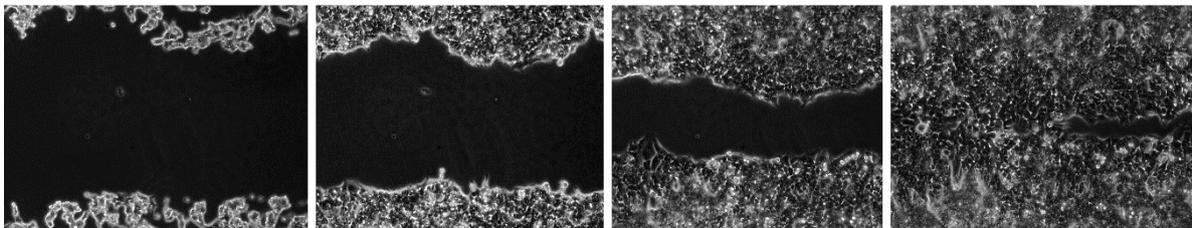


Abb. 32 HCT 116 + SB600125 nach 0, 24, 48 und 72 Stunden Wachstum

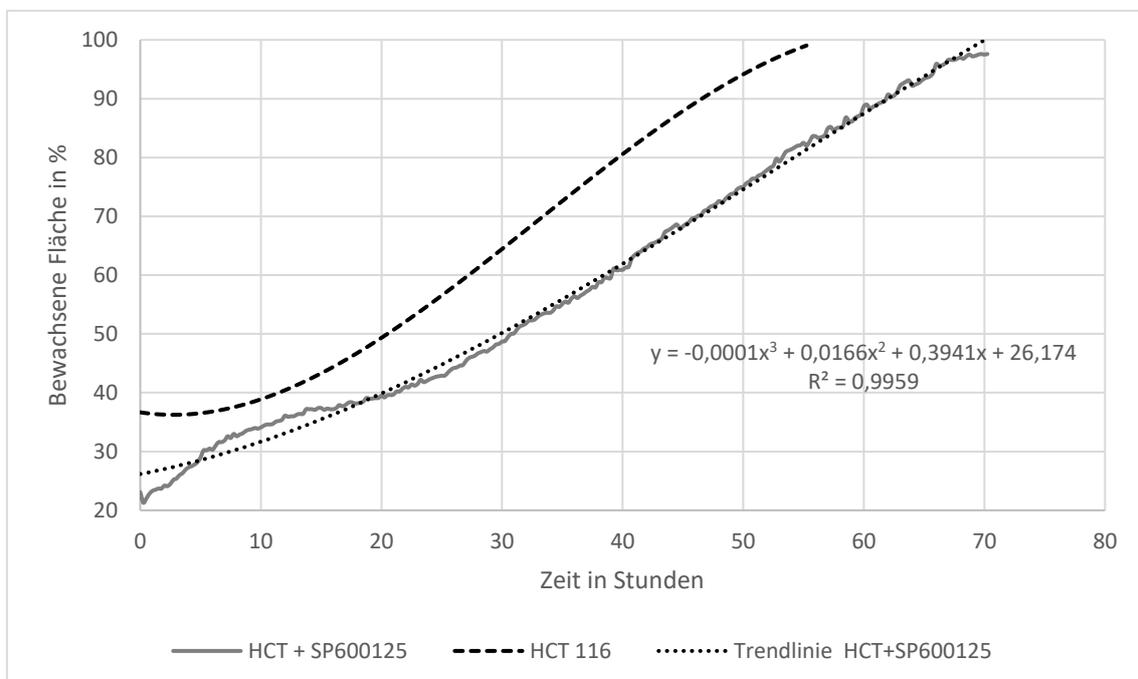


Abb. 33 Prozentuale Zunahme der bewachsenen Fläche über die Zeit bei HCT-116 + SP600125

Die Zugabe des JNK-Inhibitors SP600125 zeigt eine Verringerung der Wachstumsgeschwindigkeit. Die Wachstumskurve verläuft insgesamt etwas flacher als bei unbehandelten Zellen. Nach 72 h sind knapp 98 % des gesamten Sichtfeldes mit Zellen bewachsen. Hier wird ebenfalls sehr deutlich, dass durch Inhibierung einer MAPK eine vollständige Suppression des tumor buddings erfolgt. Im gesamten Beobachtungszeitraum findet sich keine einzige überlebensfähige Zelle längere Zeit außerhalb des Zellverbandes. Es kann beobachtet werden, wie einige Zellen den Versuch unternehmen, die Front zu verlassen, jedoch wirken diese wie festgebunden und werden regelrecht wie an einem Gummiband wieder an den Zellverband zurückgezogen, wie die Bildsequenz in Abb. 34 zeigt.

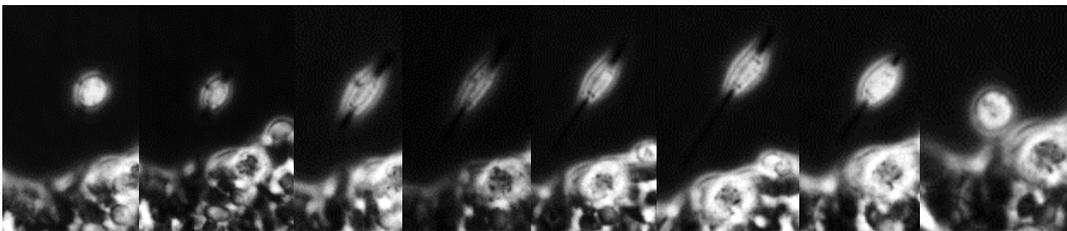


Abb. 34 Frustraner Versuch der Loslösung einer Zelle aus dem Zellverband

3.2.7 Buddingfähigkeit von HCT-116 plus Inhibitoren

Um die Einflüsse der verwendeten Inhibitoren auf das Herauslösen von Einzelzellen aus dem Zellverband vergleichen zu können, erfolgte die manuelle Auszählung zu bestimmten Zeitpunkten. Ab einer Wachstumszeit von 12 Stunden wurden bis zum Verschluss des zellfreien Spaltes in 12 Stunden Abständen in jeweils vier aufeinanderfolgenden Bildern (entsprechend einem Zeitraum von 45 min) freie Zellen bestimmt. In die Bestimmung gingen alle Zellen ein, die keinen Kontakt mehr zur Wachstumsfront besaßen. Zellcluster von mehreren unabhängigen Zellen wurden trotzdem nur als insgesamt eine Einheit gezählt. Zum Vergleich der Stichproben kam der gepaarte t-Test mit zweiseitiger Verteilung zum Einsatz. Die Irrtumswahrscheinlichkeit wurde mit $\alpha = 0,05$ angenommen, womit alle Ergebnisse für $p < 0,05$ als signifikant gelten. Die Ergebnisse sind in Tab. 4 und Abb. 35 dargestellt.

Zu allen Zeitpunkten konnte im Vergleich zu unbehandelten HCT-116 eine signifikante Änderung gesehen werden, weshalb auf die Angabe der jeweiligen p-Werte übersichtshalber verzichtet wurde.

Zeit in h	HCT	+U0126	+SB203580	+SP600125	+Syn-4 siRNA	+Syn-1 siRNA
12	5,75	1,75	0	0	13,5	17
24	16,25	2	0	0,25	10,5	7,25
36	16	2	0	0	4	3,5
48	15,25	1,25	0	0	0	0
60		0				
72		0				

Tab. 4 Anzahl an Zellen bzw. Zellclustern, die sich zum jeweiligen Zeitpunkt aus dem Zellverband herausgelöst haben (Ergebnisse alle signifikant zu HCT-116)

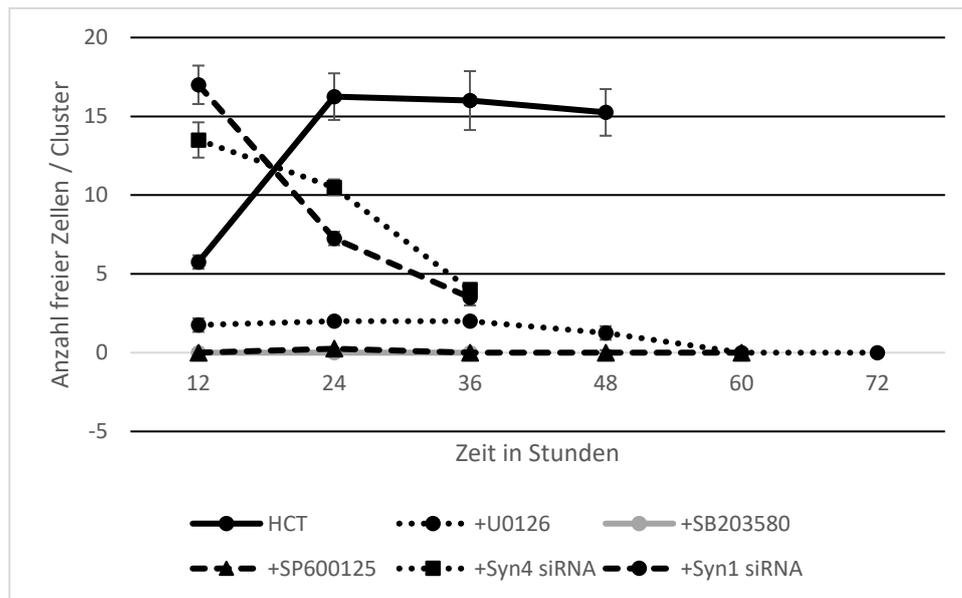


Abb. 35 Grafische Darstellung des zeitlichen Verlaufs an freien Zellen/Zellclustern

Zellkulturen, die mit MAPK-Inhibitoren behandelt wurden, zeigten so gut wie keine freien Zellen oder Tumorbuds im Sichtfeld. Die Ergebnisse von U0126, SB203580 und SP600125 waren zu allen untersuchten Zeitpunkten signifikant niedriger. Die Inhibierung der Syndecane zeigte zwar auch signifikante Unterschiede, jedoch müssen die Zahlen etwas differenziert betrachtet werden, da hier die Anzahl an freien Zellclustern wesentlich höher ist, während bei den MAPK-Inhibitoren maximal Einzelzellen nachzuweisen waren. In den ersten 24 Stunden sind signifikant mehr freie Zellen nach Transfektion mit Syn-1/4 siRNA nachweisbar, was durch die schnellere Migration erklärt werden kann. Im Verlauf nimmt die Anzahl dann kontinuierlich ab. Es lässt sich mutmaßen, dass die direkte Inhibierung der Syndecane eine erhöhte Neigung zur Migration zur Folge hat, wodurch bereits nach 12 Stunden die Anzahl an losgelösten Zellen erreicht wird, die unter unbehandelten Bedingungen erst nach etwa 24 Stunden auftreten. Die Neigung zum Budding (im Sinne eines echten Verlassens des

Zellverbandes) ist bei Inhibierung von Syn-1 erhöht, bei Behandlung mit Syn-4 siRNA aber herabgesetzt. Das folgende Absinken der Zahl freier Zellen kann dadurch erklärt werden, dass durch das rasantere Wachstum der gesamten Zellfront und den frühzeitigen Kontakt der beiden Grenzflächen Einzelzellen gar nicht mehr zeitlich in der Lage sind, den Verband zu verlassen bzw. dass die Auszählung komplett alleinstehender Zellen nicht mehr möglich war.

3.2.8 HT-29 plus Inhibitoren

Die zweite Zelllinie HT-29 zeigt im Vergleich zu HCT-116 ein anderes Wachstumsmuster. Die Zellen wachsen in runder (epithelialer) Formation und neigen seltener zur Bildung von tumor buds und zur mesenchymalen Transition. Auch die Wachstumsgeschwindigkeit ist im Vergleich zu HCT-116 deutlich reduziert. Dies macht sich im geplanten Experiment bereits bei unbehandelten Zellen bemerkbar. Nach über 145 Stunden unter dem Mikroskop sind immer noch 20 % der Fläche nicht von Zellen bedeckt (Abb. 36). Unter Zugabe von U0126 wurde analog zu HCT-116 das Wachstum noch weiter vermindert, sodass nach 144 Stunden gerade einmal etwa 55 % der Fläche bewachsen waren (Bilder hier nicht gezeigt). Aufgrund der zu langen Wachstumsphasen wurde entschieden, die morphologische Betrachtung nur auf HCT-116 zu beschränken. Die Analyse der mRNA-Expression der Syndecane wurde allerdings an beiden Zelllinien durchgeführt.

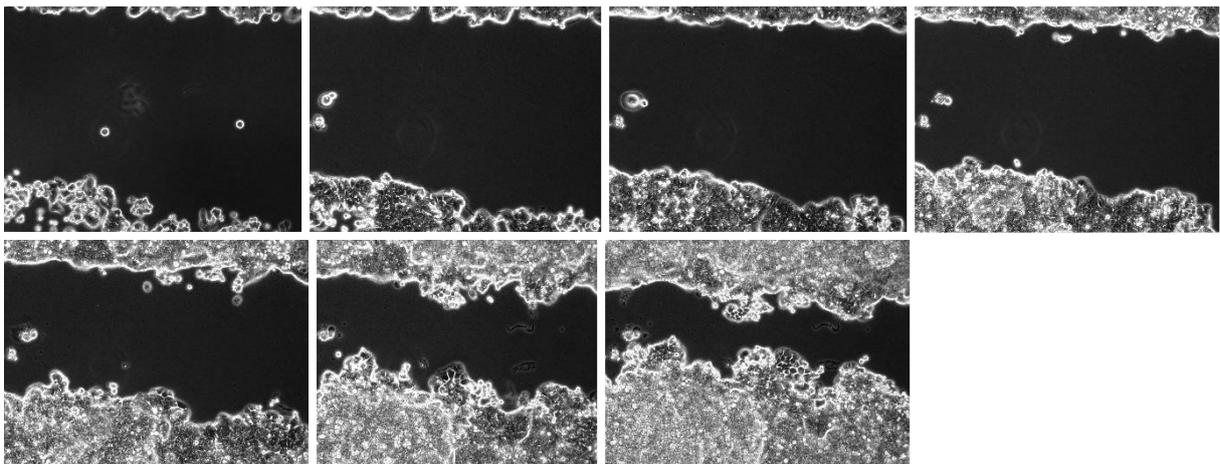


Abb. 36 HT-29 nach 0, 24, 48, 72, 96, 120 und 144 h Wachstum

3.3 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Ergebnisse der mRNA-Analysen und der Videomikroskopie wurden zur besseren Vergleichbarkeit zusammengefasst und in Tab. 5 sowie Abb. 37 dargestellt.

	Syn-1 mRNA	Syn-4 mRNA	Dauer in h bis zu einer bewachsenen Fläche		Budding	EMT
			von			
			50%	98%		
HCT-116			20	52		
+ U0126	--*	-*/#	22	> 98	--	--
+ SB203580	--*	-#	7	42	--	--
+ SP600125	=	+ #	31	71	--	-
+ Syn-4 siRNA			24,5	46	-	-
+ Syn-1 siRNA			13	39	+	++

Tab. 5 Übersicht der Ergebnisse an der Zellreihe HCT-116

Die Beobachtungen sind gegenüber der unbehandelten HCT 116 erhöht (+), stark erhöht (+ +), vermindert (-), stark vermindert (- -) oder ohne Änderung (=), * Ergebnis statistisch signifikant, # Ergebnis nicht signifikant

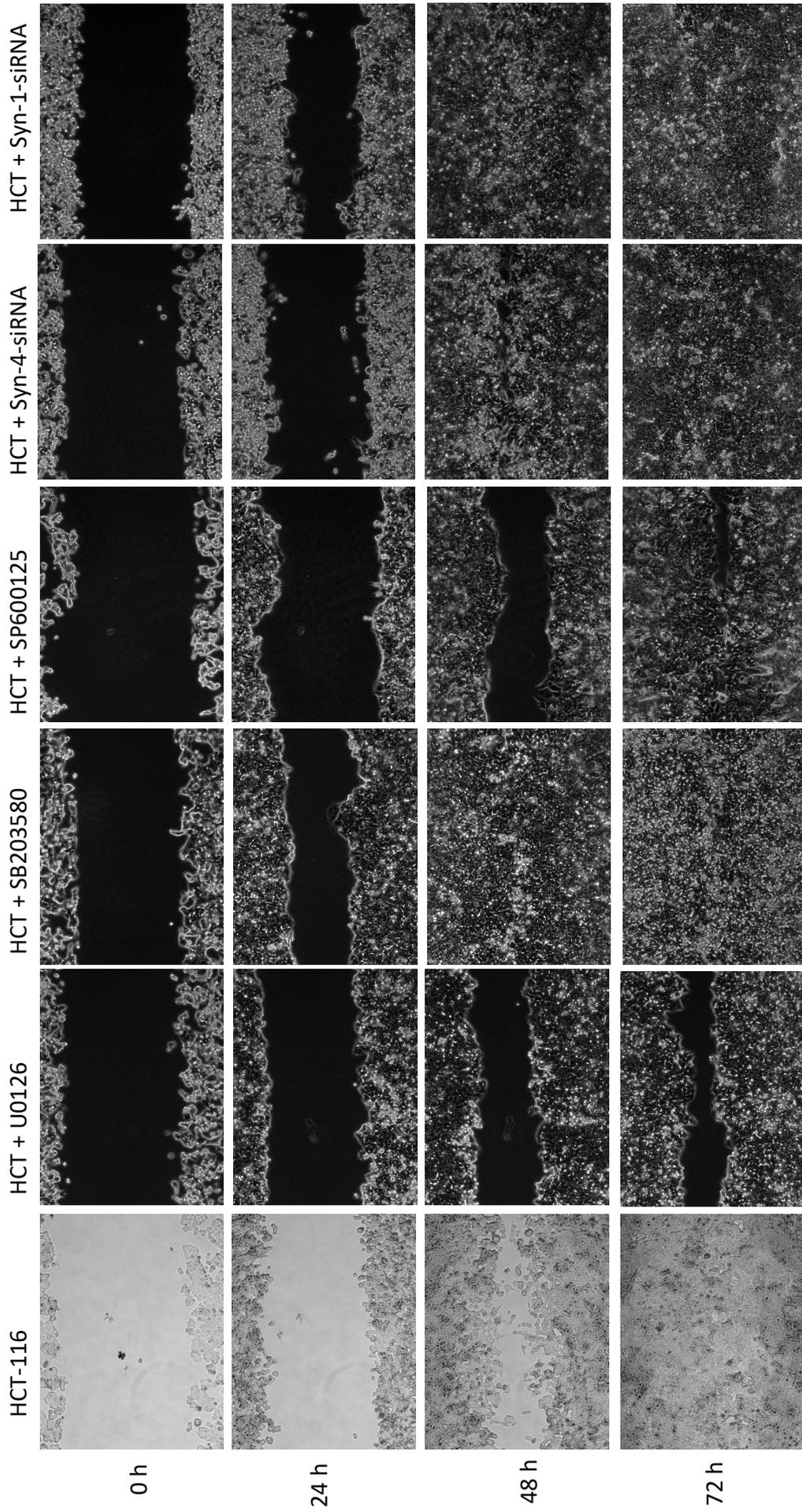


Abb. 37 Vergleich der behandelten Zelllinien zum Zeitpunkt von 0, 24, 48 und 72 h Wachstum

4 Diskussion

Die Syndecane nehmen verschiedene Rollen in Tumor-assoziierten Prozessen wie der Differenzierung, Proliferation, Adhäsion, Migration, Invasion und Regulation von Signalkaskaden ein [230]. Syn-1 ist in die Regulation von Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakten, die Steuerung von Differenzierung und Morphologie sowie in die Stabilisierung epithelialer Zellverbände involviert [145, 146, 242-244]. Syn-4 ist insbesondere an der Zell-Matrix-Adhäsion, der Modifikation des Aktinzytoskelettes, der Zellmigration sowie - als einziges Syndecan - an der Bildung fokaler Kontakte beteiligt.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Auswirkung einer modifizierten Syn-1- bzw. Syn-4-Expression auf die Proliferation, Migration, epithelial-mesenchymale Transformation sowie das tumor budding der Kolonkarzinomzelllinien HT-29 und HCT-116 zu untersuchen. Die Modifikation erfolgte dabei durch Hemmung der Syndecan-Expression mittels gegen Syn-1 bzw. Syn-4 gerichtete siRNA sowie durch Applikation von Inhibitoren der MAP-Kinasen ERK1/2, JNK und p38. Die veränderten Zelleigenschaften wurden in einem Migrationsassay per Videomikroskopie dokumentiert und per Bildbearbeitungssoftware ImageJ mithilfe eines eigens dafür erstellten Analyse-Skriptes ausgewertet.

Auswirkungen der modifizierten Syndecan-Expression

In der vorliegenden Arbeit konnte durch Applikation von siRNA deutlich der Einfluss der Syndecane auf die Wachstumsgeschwindigkeit, das Migrationsverhalten und die EMT von Kolonkarzinomzellen gezeigt werden.

Die Hemmung von Syn-1 resultierte zunächst in einer höheren Proliferationsrate und Migrationsgeschwindigkeit sowie vermehrten EMT mit ausgeprägtem Budding. Das Syn-1-abhängige Verhalten der Kolonkarzinomzellen unterstreicht die Bedeutung dieses Heparansulfatproteoglykans für die Aufrechterhaltung eines adhärenen Epithelzellverbandes. In zahlreichen Studien konnte gezeigt werden, dass Syn-1, welches in beinahe allen Epithelien exprimiert wird, zum Erhalt einer epithelialen Zellmorphologie, einer epithelspezifischen Polarisierung und Organisation in adhärenen Zelllagen essentiell ist [243, 245]. Bereits während der embryonalen Bildung epithelialer Zellverbände kommt es zur differentiellen Syn-1-Expression, die bei Abnahme eine Zellmigration und bei Anstieg eine Formierung eines stabilen Zellverbandes ermöglicht [246]. Beim Fehlen von Syn-1 kommt es zu einer veränderten Expression von Adhäsionsmolekülen mit Rearrangement von Integrin $\beta 1$,

verminderter E-Cadherin-Expression und Desorganisation der F-Aktin-Filamente, was in einem Verlust der kubischen Morphologie und Polarität der Epithelzelle, einer Migration ohne Fixation und erhöhtem invasiven Potential resultiert [146, 247-250].

Der simultane Verlust von Syn-1 und E-Cadherin wurde bereits zuvor als Schlüsselschritt der EMT beschrieben [147, 245, 251, 252]. So führte beispielsweise die Depletion von Syn-1 auch in Mammaepithelzellen zur Ausbildung einer fusiformen, mesenchymalen Zellmorphologie, zur alterierten Organisation des Zellverbandes und zur vermehrten Migration und Invasion [130]. In Übereinstimmung damit zeigten die Kolonkarzinomzellen in unseren Versuchen ähnliche morphologische Veränderungen nach Inhibierung von Syn-1 mit Ausbildung von verzweigten Riesenzellen mesenchymalen Charakters, einem vermehrten Budding und eine damit einhergehende gesteigerte Migration.

Dass der Verlust der membranösen Syn-1-Expression eine EMT begünstigt und mit einer vermehrten Tumorzellmigration einhergeht [148, 149, 253], erklärt, warum verminderte Syn-1-Level mit der Tumorentstehung und Progression und sowie einem geringeren Überleben verschiedener Tumorgruppen assoziiert ist [254, 255]. So zeigen Patienten mit verminderter Syn-1-Expression im Plattenepithelkarzinom von Lunge, Hals und Nacken eine erhöhte lokale Invasivität, ein stärkeres Metastasierungspotential und eine schlechtere Prognose [233, 256]. Für das kolorektale Karzinom konnte eine positive Korrelation der Expression von Syn-1, E-Cadherin und β -Catenin nachgewiesen werden, wobei eine hohe Konzentration dieser Marker eine geringere EMT und damit auch weniger Migration, Invasion und ein besseres Outcome bedeutete [257]. Andere Studien zum KRK wiesen einen Zusammenhang zwischen der Reduktion der Syn-1-Konzentration und einem fortgeschrittenen Krankheitsstadium zum Diagnosezeitpunkt, vermehrter lokoregionaler Metastasierung, einem aggressiveren Wachstum und einer schlechten Prognose nach [190, 192, 258]. Unsere Studien konnten nun erstmals die direkten funktionellen Auswirkungen einer alterierten Syn-1-Expression in Kolonkarzinomzellen auf die EMT, das Buddingverhalten und die Migrationsgeschwindigkeit zeigen.

Die Inhibierung von Syn-4 hatte initial eine Verzögerung der Tumorzellwachstumsgeschwindigkeit und Migration zur Folge. Im Verlauf kam es jedoch überraschend zu einer Akzeleration von Zellproliferation und -migration, die Ausbildung von Tumorbuds war hingegen vermindert. Die in der vorliegenden Arbeit zunächst beobachteten Effekte nach Hemmung von Syn-4 werden auf seine Fähigkeit sogenannte fokale Adhäsionen auszubilden und seine Involvierung in die Modulation des Zytoskelettes zurückgeführt. Als einziges an

fokalen Adhäsionen beteiligtes Syndecan [100, 259-261] ist Syn-4 in ruhenden Zellen in peripheren Adhäsionen lokalisiert [102, 156] und wird während des Migrationsprozesses in zentrale Adhäsionen rekrutiert [259]. Bei Initiation der Zellmigration erfolgt eine Verlagerung von Syn-4 und Caveolin in die Retraktionsregion der migrierenden Zelle [262, 263]. Durch die Bindung von PIP₂ an α -Actinin und Vinculin kann Syn-4 dabei die Assoziation mit dem Zytoskelett herstellen [264, 265]. Die nachfolgende Syn-4-vermittelte Aktivierung von RhoA, Rac1 und FAK führt dabei zu einem erhöhten Umsatz der fokalen Adhäsionen [266-269]. Syn-4 vermittelt zudem über Cdc42 und Rac1 die initiale Bildung von Membranprotrusionen und die Induktion der F-Aktin-Polymerisation, was zu einer Extension der Filopodien und Lamellipodien und der Bildung fokaler Komplexe führt. Zum Erhalt der Zellmotilität bedarf es jedoch eines Abbaus der fokalen Kontakte und Lösung der temporären Adhäsion an die extrazelluläre Matrix. Dazu induziert Syn-4 die Endozytose von Integrin $\alpha 5\beta 1$ [270, 271].

Folglich wurde in unseren Experimenten an Kolonkarzinomzelllinien erwartet, dass ein Syn-4-Verlust zu einer verminderten Zellmotilität und einem protrahierten Verschluss des zellfreien Spaltes führt, was sich jedoch nur für die ersten Stunden des Versuchs bestätigte. Dies könnte dadurch begründet sein, dass die Tumorzellmigration ein stark regulierter Prozess ist, der nicht nur auf der Umgestaltung des Zytoskelettes beruht, sondern auch einer dynamischen Interaktion zwischen migrierender Tumorzelle und dem umgebenden mesenchymalen Stroma bedarf. Die transiente Anheftung an die EZM durch „Abtasten“ der Umgebung und Fixierung via fokaler Adhäsionen ermöglicht dabei eine gerichtete Zellbewegung der Tumorzelle im Kontext der Umgebung [272].

Tatsächlich setzt die Aktivierung der intrazellulären Signalkaskaden von PKC α , RhoA, Rac1 und FAK, die zur Formierung fokaler Adhäsionen führen, eine Bindung von Syn-4 an extrazelluläre Matrixkomponenten voraus [173, 273]. Syn-4 fungiert dabei als Sensor der Matrixtopographie, ist Bindeglied zwischen dem Zytoskelett und Strukturkomponenten der EZM oder der Basalmembranen wie Fibronectin, Vitronectin, Tenascin und fibrillärem Kollagenen Typ I, III und V und nimmt Veränderungen in der Matrixzusammensetzung wahr [115, 245, 260, 274-277]. Da es nur zur Ausbildung von fokalen Adhäsionen im Bereich dieser Kontaktpunkte von Syn-4 und der EZM kommt, bestimmt Syn-4 die Ausrichtung und Lokalisation der fokalen Adhäsionen und determiniert so die Migrationsrichtung [173]. Die Unabdingbarkeit von Syn-4 für die Migrationsfähigkeit innerhalb komplexer EZM-Strukturen zeigte sich in Untersuchungen an Fibroblasten, die bei Syn-4-Defizienz unfähig zur Ausbreitung in einer 3D-Fibronectin-Matrix, nicht jedoch auf einer 2D-Matrix waren [167, 278].

Dass der Kontakt zur EZM ein notwendiger Schritt zur Syn-4-vermittelten Migration darstellt, konnte auch für verschiedene Tumorzelllinien gezeigt werden. So bedingt die persistierende Migration von Mamma-, Kolonkarzinom- und Melanomzellen den Kontakt zu Fibronectin, Kollagen oder Laminin, ehe die Syn-4-vermittelte Induktion fokaler Adhäsionen und transiente Anheftung an die EZM-Komponenten durch Integrin $\alpha 5\beta 1$ erfolgen kann [172, 176, 230, 279, 280]. Auch in ovariellen Karzinomzellen (OVAR5) führt der Kontakt zu EZM-Komponenten zu einer gesteigerten Syn-4-Expression, was wiederum in einer vermehrten Adhäsion an Mesothel-Monolayer, einer Migration an Matrixkomponenten wie Kollagen IV, Laminin und Fibronectin und einer gesteigerten Invasion durch Matrigel resultiert [281].

Übereinstimmend mit den Ergebnissen unserer Studien an Kolonkarzinomzellen konnte hingegen bei Hemmung von Syn-4 eine vermehrte Motilität von Melanomzellen gezeigt werden, die auf einer verminderten FGF-2-vermittelten Signalgebung, fehlenden Wnt5A-Aktivierung und reduzierten Adhäsion an Fibronectin beruhte [282, 283].

Eine fehlende EZM-Komponente und die daraus resultierende fehlende Induktion fokaler Adhäsionen in der von uns gewählten Versuchsanordnung bietet somit eine mögliche Erklärung für die Akzeleration der Migration der Kolonkarzinomzellen nach Inhibierung von Syn-4. In vivo ist aber davon auszugehen, dass eine ungerichtete Zellbewegung für die lokale Invasion und Metastasierung nicht zielführend ist. Im Kontext einer komplexen EZM, wie sie an der Invasionsfront eines Kolonkarzinoms vorliegt, scheint das Vorhandensein von Syn-4 eher essentiell für die gerichtete Tumorzellmigration zu sein.

Auch zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit die Beteiligung von Syn-4 an der EMT und dem Tumorzellbudding. Zwar deuten sich zu Beginn der Versuchsreihe morphologische Veränderungen der Kolonkarzinomzellen der Migrationsfront an, die einer beginnenden EMT gleichen, jedoch ist die Ausbildung von Pseudopodien rudimentär. Auch das Budding ist im Verlauf vermindert. Neben der Aufhebung der Zell-Zell-Adhäsion umfasst das Budding auch die Reorganisation des Aktinzytoskelettes mit Ausbildung von Pseudopodien an der Migrationsseite, die Expression von Integrin $\alpha 3\beta 1$ zur Anheftung an die extrazelluläre Matrix und Expression von uPAR zur Initiierung der Matrixdegradation [82]. Diese Prozesse können allesamt durch Syn-4 vermittelt werden. Beim Budding erfolgt über FGF, EGF, PDGF und HGF die Aktivierung von Rezeptortyrosinkinasen durch Dimerisation der Rezeptoren, autokatalytische Phosphorylierung der Tyrosinkinase und Aktivierung von ERK1/2 über Ras und Raf bzw. von GTPasen der Rho-Familie über PI3K [284]. Insbesondere letztere werden durch Syn-4 aktiviert und sind Schlüsselregulatoren der Reorganisation des Aktinzytoskelettes

und der Formierung von Filopodien und Lamellipodien und definieren damit die Polarität und die Migrationsrichtung. Im Umkehrschluss kann angenommen werden, dass die beobachtete Reduktion des Buddings der Kolonkarzinomzellen ein Resultat der Syn-4-Defizienz ist.

Auswirkung der Hemmung der MAP-Kinasen

Bei der Umwandlung extrazellulärer Signale in zelluläre Antworten nehmen die MAP-Kinasen eine zentrale Rolle ein und umfassen mehrere Hauptsignalwege mit den Schlüsselkinasen ERK1/2, p38 und JNK. ERK1/2 werden durch Mitogene aktiviert und in menschlichen Tumoren oftmals übermäßig stark exprimiert. Die Regulation von p38 und JNK, die auch als „stress-activated protein kinases“ bezeichnet werden, erfolgt durch Umwelteinflüsse und genotoxische Substanzen. Sie spielen unter anderem eine Schlüsselrolle bei Entzündungsprozessen, Proliferation, Migration und Gewebsdifferenzierung [285-288]. Im Gegensatz zu ERK1/2 findet man im Tumorgewebe häufig eine Downregulation dieser beiden Proteine. Die Funktionen der MAPK in der Tumorentstehung und –progression sind hoch komplex, was nicht zuletzt dem riesigen Spektrum der von ihnen modulierten Prozesse geschuldet ist. Weiterhin kommt erschwerend hinzu, dass je nach Entwicklungsstadium einer (Tumor-)Zelle die Signalwege unterschiedlichste Aufgaben wahrnehmen können.

In unseren Untersuchungen an Kolonkarzinomzelllinien führte die Hemmung aller MAP-Kinasen durch spezifische Inhibitoren zu einer stark reduzierten EMT und einem vermindertem Tumorzellbudding. Die Inhibierung von ERK1/2 und JNK hatte zudem eine Reduktion der Wachstumsgeschwindigkeit der Tumorzellen zur Folge. Im Gegensatz dazu resultierte der Verlust von p38 in einem Anstieg von Wachstum und Migration der Kolonkarzinomzellen. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass alle MAP-Kinasen die EMT und das nachfolgende Budding unterstützen, ERK1/2 und JNK die Proliferation und Migration fördern, wohingegen p38 eher die Tumorzellproliferation hemmt.

Das Tumorzellbudding ist eng mit der EMT verknüpft und gilt als wichtiger prognostischer Faktor für Invasion, Metastasierung und Langzeitüberleben [289]. Normalerweise gehen Zellen, die den geschlossenen Epithelverband verlassen und ohne Anbindung an die Zellfront sind, in einen programmierten Zelltod über, den man als Anoikis (griechisch für „heimatlos“) bezeichnet. Der Begriff wurde erstmals von Frisch und Francis im Jahr 1994 geprägt [290]. Als physiologischer Abwehrmechanismus verhindert sie, dass losgelöste Zellen sich an falschen Stellen in einen Zellverband integrieren und dysplastisch zu wachsen beginnen. Erst später

erkannte man ihre zentrale Rolle bei malignen Prozessen wie Tumorangio-genese und Metastasierung [291, 292].

Die Beteiligung von MAPK an Vorgängen, die diese Form des Zelltodes herbeiführen können, ist in der Literatur vielfach beschrieben worden, und die Reduktion von Metastasen bei verschiedenen Tumoren durch Inhibierung von p38/JNK/ERK1/ERK2 konnte bereits in einigen Untersuchungen gezeigt werden. Hierbei erfolgte die Behandlung der Zelllinien mit verschiedenen Substanzen, welche allesamt als Inhibitoren der MAPK-Signalwege gelten. So ist z. B. MJ-33, ein Derivat aus der Gruppe der heterozyklischen Quinalozinone, bei Prostatakarzinomzellen in der Lage, durch die Blockierung intrazellulärer MAP-Kinasen (ERK, JNK, p38, zusätzlich auch NF- κ B) und daraus resultierender verringerter Expression von Matrix-Metalloproteinasen die Invasion und Migration von Zellen zu reduzieren [293]. Das in Weintrauben und Grapefruits natürlich vorkommende Flavonoid Kaempferol kann über diesen Wirkmechanismus bei Brustkrebs-, Osteosarkom- und Plattenepithelzellen die Metastasierung unterbinden [294-296]. Auch für Kolonkarzinomzellen konnte ein Zusammenhang zwischen der Inhibierung von MAPK und verringerter Migration bzw. Invasion durch Substanzen wie Dexamethason, das Öl der Korea-Kiefer oder der chinesischen Kräutermixtur YQFS gezeigt werden [297-299], aber auch über andere Interaktionen, wie z. B. mit NF- κ B, kann dieses Resultat erzeugt werden [300-302]. Eine aktuelle Studie zum Einfluss des Gens TUSC3 (tumor suppressor candidate 3) auf die EMT kommt zu der Erkenntnis, dass in Kolonkarzinomzellen TUSC3 die Transition durch Aktivierung von MAPK- sowie des Wnt/ β -Catenin-Signalweges steigert [303].

In der vorliegenden Arbeit konnten die in der Literatur beschriebenen Effekte in Bezug auf die EMT, Anoikis und das Budding bestätigt werden. Im Vergleich zu den unbehandelten Kolonkarzinomzellen zeigten sich nach Applikation der MAPK-Inhibitoren bereits zu Beginn der Beobachtungen signifikant weniger Zellen, die sich aus der Invasionsfront herauslösten und in Form von Buds in den freien Zellspalt migrierten. Ebenfalls kam es zu morphologischen Veränderungen: das für migrierende Zellen typische Muster mit spindelförmigen Ausstülpungen (mesenchymaler Charakter) und diffuser Verteilung der Zellen (fehlende Anoikis) ging durch Inhibierung der MAPK-Signalwege vollständig verloren. Die Reduktion bzw. die teils vollständige Inhibierung der EMT mit Erhalt der epithelialen Charakteristika der Kolonkarzinomzellen kann als Indiz gedeutet werden, dass das Migrations- und Invasionspotential herabgesetzt ist. Andererseits ist zu sehen, dass Zellen, die sich vereinzelt doch aus dem Verband lösen, nicht in der Lage sind, eigenständig zu überleben und rasch

absterben, was für eine verlorene Resistenz gegenüber der Anoikis entspricht. Die beschriebenen Effekte sind dabei nicht einer bestimmten MAP-Kinase zuzuordnen. Allerdings reicht bereits die Inhibierung eines Signalweges, um die beschriebenen Resultate zu erzielen. In der Literatur wurden und werden, wie bereits erwähnt, zahlreiche chemische Substanzen beschrieben und erprobt, die durch Inhibierung der MAPK eine vielversprechende Therapieoption zur Suppression lokaler Tumorinvasion und Metastasierung bieten.

Da die Hemmung von ERK1/2, JNK und p38 in den verschiedenen Versuchsanordnungen bezüglich EMT und Budding vergleichbare Effekte erzielte, jedoch in unterschiedlichen Wachstumsgeschwindigkeiten der Kolonkarzinomzellen resultierte, ist davon auszugehen, dass die Regulation von Zellwachstum und Invasion durch die MAP-Kinasen voneinander getrennt und ganz unterschiedlich reguliert werden. Die Schwierigkeit, bestimmte Prozesse auf einen Signalweg zu fixieren, liegt einerseits daran, dass alle MAPK-Signalwege einen gewissen Beitrag zur Zellmotilität beitragen. Andererseits erschwert der Crosstalk sowohl zwischen den MAPK-Signalwegen untereinander als auch mit anderen intrazellulären Signalkaskaden die Klärung des individuellen Beitrages einer MAP-Kinase.

Beim Vergleich der drei MAPK-spezifischen Inhibitoren war ein vermehrter Anstieg von Wachstum und Migration der Kolonkarzinomzellen nach Hemmung von p38 im Gegensatz zur Inhibierung von ERK1/2 und JNK zu verzeichnen. Dies stimmt mit den in der Literatur beschriebenen Funktionen von p38 überein. Dem p38-Signalweg wird neben einer Beteiligung an Entzündungsreaktionen und Zytokinproduktion [304, 305] eine Schlüsselrolle bei der Gewebshomöostase zugeschrieben, indem er Zelldifferenzierung fördern und zeitgleich auch die Proliferation bestimmter Zelltypen (z. B. auch Epithelzellen) unterdrücken kann [306]. Bei Zellen mit maligner Entartung kann die p38-Aktivität im Vergleich zu nicht transformierten Zellen herauf- (z. B. NSCLC, Lymphome [307, 308]) oder herabreguliert (z. B. HCC [309]) sein. Gupta et al. zeigten in einer Studie an p38-Knockout-Mäusen, dass der Verlust von p38 in gesunden Darmepithelzellen nach Induktion einer Kolitis zu Apoptose und Hyperproliferation führt, was eine Schutzfunktion von p38 vor unkontrolliertem Wachstum im nichtneoplastischen Darmgewebe nahe legt. Bei der Betrachtung von Kolonkarzinomzellen fiel allerdings auf, dass die Downregulation von p38 die Tumorlast verringerte und dementsprechend p38 eine wichtige Rolle bei der Tumorprogression zu spielen scheint. Ebenfalls wurde eine höhere Apoptoserate festgestellt, wohingegen die Invasivität und histologische Struktur des Tumors nicht beeinträchtigt waren [310]. Auch an menschlichen

Kolonkarzinompräparaten konnten Gupta et al. bereits zuvor ähnliche Ergebnisse präsentieren. Durch pharmakologische Inhibierung von p38 konnten auch hier eine verringerte Zellproliferation sowie eine vermehrte Apoptose gesehen werden [311].

In der vorliegenden Arbeit führt die Inhibierung des p38-Signalweges durch SB203580 in Bezug auf das Wachstumsverhalten zu einer Erhöhung der Wachstumsgeschwindigkeit. Es zeigte sich eine in den ersten 15 Stunden gesteigerte Proliferation der Zellen, also während der Konsolidierung der Zellfront. Mit Beginn der Migration entspricht der Verlauf der Wachstumskurve annähernd dem von unbehandelten Zellen. Der Verschluss des im Videomikroskop beobachteten Zellspaltes erfolgte jedoch vorzeitig im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen auch Xia et al. 2015 bei Untersuchungen von Plattenepithelkarzinomen der Lunge: Durch Suppression von p38 mittels des im Tumor vermehrt exprimierten Proteins CARMA3 folgte *in vitro* ebenfalls eine Steigerung der Invasion und Migration der Tumorzellen sowie eine niedrigere Apoptoserate [312]. Ebenfalls eindeutig ist die Änderung des tumor buddings. Die Inaktivierung von p38 führte zu einer signifikant reduzierten Anzahl von ungebundenen, überlebensfähigen Zellen im zellfreien Spalt.

Die hier gewonnenen Ergebnisse scheinen nun bei erster Betrachtung im Gegensatz zu den *in vivo* Experimenten von Gupta et al. zu stehen, bei denen die Herabregulierung von p38 im Tumorgewebe mit niedriger Tumoralast und geringerem Wachstum einherging. Zwar ist in unserem Versuch die Migrationsgeschwindigkeit rechnerisch höher als bei unbehandelten Zellen, allerdings wird dieser Wachstumsvorsprung nur in den ersten acht Stunden erzielt, anschließend wachsen beide Populationen gleich schnell, was am Anstieg der Wachstumskurven zu erkennen ist. Das fehlende Tumor Budding sowie die reduzierte epithelial-mesenchymale Transition kann als mögliches Indiz für eine über den Beobachtungszeitraum hinaus gehende verringerte Invasion des umliegenden Gewebes und damit auch geringere Tumorausdehnung gesehen werden. Auch muss man die Unterschiede im zeitlichen und räumlichen Design beider Untersuchungen beachten: Während Gupta et al. die Untersuchung an Mäusen bzw. menschlichen Tumorproben 5 bis 14 Tage nach Manipulation beobachteten, wird in dieser Arbeit nur der simulierte Migrationsrand über einen kurzen Zeitraum von maximal 96 Stunden an Zellkulturen erfasst. Die Wirkdauer der Inhibitoren ist in unserem Fall demnach wesentlich geringer. Auch das extrazelluläre Setting ist verschieden. Bei unseren *in vitro*-Versuchen fehlen wichtige Faktoren der Tumordinvasionsfront wie Fibroblasten, Makrophagen und Komponenten der EZM. Diese

haben natürlich einen nicht zu unterschätzenden Einfluss auf die Interaktion der Tumorzellen mit der Umgebung und damit auch auf die Migration und Invasion.

Die Inhibierung der anderen beiden wichtigen MAP-Kinasen ERK1/2 (bzw. deren Aktivatoren MEK1/2) und JNK ging in der Videomikroskopie mit einer geringeren Migrationsgeschwindigkeit einher. Dies spricht demnach dafür, dass zumindest im Anfangsstadium der Ausbildung von Invasionsfronten in vitro dieser MAPK eine entscheidende Rolle zukommt. In der Literatur finden sich zahlreiche Untersuchungen, die eine Beteiligung des JNK und ERK-Signalweges an Migrationsprozessen nahelegen. So führt beispielsweise die Aktivierung der JNK im KRK zu einer Überexpression von Transgelin, einem Protein, das nachgewiesen zu Tumorprogression und Metastasierung beiträgt [313]. Die Inhibierung der ERK-Signalkaskade zeigte in Mäusen eine reduzierte Lebermetastasierung und eine verlängerte Überlebensdauer bei Mäusen mit KRK [314].

Interaktion von MAP-Kinasen und Syndecanen

Es wurde mit vorliegender Arbeit der Einfluss der MAP-Kinasen auf die mRNA-Expression von Syn-1 und Syn-4 sowie deren mögliche funktionelle Auswirkung auf das Migrationsverhalten der Kolonkarzinomzellen untersucht. Dabei konnte deutlich nachgewiesen werden, dass alle MAP-Kinasen die Expression von Syn-1 und Syn-4 auf transkriptioneller Ebene regulieren können. Die Inhibierung von ERK1/2 und p38 führte zur starken Downregulation beider Syndecane, sodass davon ausgegangen werden kann, dass via ERK1/2 und p38 die Expression von Syn-1 und Syn-4 gefördert wird. Durch Hemmung von JNK kam es auch zu einer leicht reduzierten Syn-1-Expression. Allerdings wirkte sich das Fehlen von JNK in einem Anstieg der Syn-4-mRNA-Menge aus.

Prinzipiell sind die beobachteten Veränderungen in Proliferationsrate, Migrationsgeschwindigkeit, Fähigkeit zur EMT und Buddingpotential nach Applikation der spezifischen Inhibitoren von p38, JNK und ERK1/2 über die von ihnen induzierte Expressionsänderung der Syndecane erklärbar. Der starke Anstieg von Proliferation und Migrationsgeschwindigkeit nach Hemmung von p38 kann so beispielsweise durch die Downregulation der Syn-1-Expression und damit dem Verlust eines starken Adhäsionsfaktors zurückgeführt werden. Ebenso sind die gesteigerte Migration und das verminderte Budding nach Applikation des ERK1/2-Inhibitors möglicherweise auf die herabregulierte Expression von Syn-4 zurückzuführen.

Die Interpretation einer Interaktion von MAP-Kinasen und Syndecanen hingegen ist jedoch erschwert, weil die MAPK zum Teil die Expression beider Syndecane, die ja ganz unterschiedliche Funktionen haben, fördern, und weil die funktionellen Auswirkungen der Inhibierung der MAPK teils gegensätzlich sind, obgleich die Regulation der Syndecan-Expression vergleichbar ist. Somit ist anzunehmen, dass die Regulation der Syndecan-Expression durch die MAPK in Abhängigkeit vom (patho)physiologischen Vorgang und im Kontext der Umgebung wie beispielsweise einem speziellen entzündlichen Milieu, der Zusammensetzung der EZM oder je nach Einwirken anderer Faktoren, die die Syndecan-Expression regulieren, erfolgt.

So werden die MAP-Kinasen ERK1/2, JNK und p38 auch durch inflammatorische Zytokine wie TNF- α , TGF- β , IL-1 β und IL-8 induziert, was zu einer vermehrten Expression von Adhäsionsmolekülen und einer damit einhergehenden gesteigerten zellulären Proliferation, Migration und Invasion führt [315-318]. Da Syndecane in der Lage sind, über ihre Heparansulfatketten diese Zytokine zu binden, lokal zu konzentrieren und ein entzündliches Mikromilieu zu modulieren [319, 320], könnte die durch MAPK gesteigerte Syndecan-Expression indirekt eine anhaltende Aktivierung der MAPK unterstützen. Zudem erfolgt die intrazelluläre Signalweiterleitung der MAP-Kinasen zum Teil über die G-Proteine der Rho-Familie, Rac und Cdc42 [318], welche ebenso in Syn-4-vermittelte Signalwege involviert sind und Schlüsselregulatoren der Reorganisation des Aktinzytoskelettes und der Formierung von Pseudopodien darstellen. Die Aktivierung der MAPK während der Bildung fokaler Kontakte erfolgt dabei durch Integrine oder die FAK [321], die wiederum Co-Faktoren von Syn-1 und Syn-4 sind.

MAP-Kinasen können jedoch nicht nur auf transkriptioneller Ebene die Syndecan-Expression beeinflussen. Vielmehr ist der MAP-Signaltransduktionsweg an der Regulation des Sheddings der Heparansulfatketten der Syndecane beteiligt. So induziert zellulärer Stress durch Hyperosmolarität, Ceramidbehandlung oder Hitzeschock das Shedding via PKC-abhängiger Signalwege, welche in der Kaskade oberhalb der JNK/SAPK-Aktivierung lokalisiert sind. Zyklischer mechanischer Stress oder oxidativer Stress induzieren die Aktivierung von ERK1/2, was zur Upregulation der Syn-4-Expression und zum Shedding führt [111, 322]. Auch das durch Thrombin oder EGF induzierte Shedding setzt eine Aktivierung der ERK1/2- Signalkaskade voraus, während es hier keiner Aktivität der p38 MAP-Kinase bedarf [111]. MAP-Kinasen sind ebenso am Metalloproteinasen-abhängigen Shedding von Syn-1 und -4 beteiligt [111].

Wichtig ist dabei zu erwähnen, dass die membrangebundenen und gescheddeten Formen von Syndecanen sehr unterschiedliche, gar gegensätzliche funktionelle Eigenschaften haben. Beispielsweise stimuliert die Überexpression des membrangebundenen Syn-1 die Proliferation und inhibiert die Invasion von Mammakarzinomzellen in vitro, wohingegen übermäßig gescheddetes Syn-1 die Proliferation vermindert, die Invasion dahingegen fördert [323]. Auch Syn-4 zeigt gegensätzliche Funktionen je nach Zustandsform: Während membrangebundenes Syn-4 Rac1 aktiviert und die Bildung fokaler Adhäsionen induziert, supprimiert nicht gebundenes Syn-4 dahingegen die Rac1-Aktivität, was zur verminderten Ausbildung fokaler Kontakte führt [173].

Durch die Involvierung der MAPK in das Shedding der Syndecane können so möglicherweise lokale Wachstumsfaktoren und Zytokine gebunden und die Gradienten dieser Faktoren an der Tumordinvasionszone verändert und auf diese Weise das Tumormikromilieu moduliert werden. Das durch die MAPK ausgelöste Verhalten der Tumorzellen bezüglich Proliferation, Migration, EMT und Invasion könnte somit nicht nur über die Beeinflussung der Expression der Syndecane, sondern auch über die Regulation des Sheddings erfolgen und damit auch ganz gegensätzliche Effekte zeigen.

5 Zusammenfassung

Syndecane sind in zelluläre Prozesse involviert, die Voraussetzung für die EMT, Migration und Invasion von Tumorzellen sind, wie die Regulation der Zellmorphologie, die Zell-Adhäsion, die Modifikation des Zytoskelettes, der Bildung fokaler Kontakte und die Induktion intrazellulärer Signalkaskaden. Mehrere Studien konnten einen Zusammenhang zwischen einer alterierten Syndecan-Expression und der Prognose maligner Tumore wie dem Kolonkarzinom zeigen. Ziel der vorliegenden Arbeit war, den Einfluss von Syn-1 und Syn-4 und ihrer Regulation durch MAP-Kinasen auf die Proliferation, Migrationsfähigkeit und -geschwindigkeit sowie die damit assoziierte EMT und das Buddingpotential von Kolonkarzinomzellen in vitro zu untersuchen. Dies erfolgte durch mehrtägige Videomikroskopie von Migrationsassays der Kolonkarzinomzelllinien HT-29 und HCT-116, durch Inhibierung von Syn-1 und Syn-4 mittels siRNA sowie Inhibierung von ERK1/2, JNK und p38 durch spezifische Inhibitoren. Die Tumorzellen zeigten deutlich eine Syndecan-abhängige Änderung ihrer morphologischen und motilen Eigenschaften. Die Inhibierung von Syn-1 resultierte in einer höheren Proliferationsrate und Migrationsgeschwindigkeit sowie einer vermehrten EMT mit

ausgeprägtem Budding, was eine Funktion von Syn-1 als stabilisierender Faktor im Epithelzellverband und Schutzmolekül gegen eine EMT suggeriert. Der Verlust von Syn-4 führte ebenso zur Steigerung von Zellproliferation und –migration, jedoch war die Ausbildung von Tumorzellbuds dahingegen stark vermindert. Dies lässt sich damit erklären, dass Syn-4 zur EMT durch Unterstützung des Zytoskelett-Remodellings beiträgt, seine migrationsfördernden Eigenschaften durch Ausbildung fokaler Adhäsionen jedoch von der Interaktion mit EZM-Komponenten, die im gewählten Versuchsaufbau nicht vorhanden waren, abhängt. Die Inhibierung der MAP-Kinasen führte überwiegend zu einer reduzierten Syndecan-mRNA-Expression sowie zur verminderten EMT und Verlust des Buddings im Migrationsassay. Während die Hemmung von ERK1/2 sowie JNK die Reduktion der Migrationsgeschwindigkeit zur Folge hatte, war bei Verlust von p38 eine erhöhte Proliferation und Migration der Kolonkarzinomzellen zu verzeichnen. Die MAP-Kinasen können somit offenbar die Syndecan-Expression auf transkriptioneller Ebene regulieren und darüber vermittelt zur Änderung der Tumorzelleigenschaften bezüglich Proliferation, Migration, EMT und Budding beitragen. Die dabei differenten Auswirkungen der drei Kinasen lassen sich durch die Beteiligung der MAPK am Shedding der Syndecane sowie ihrer umfangreichen Involvierung in zahlreiche Signalkaskaden, die ebenso diese Zelleigenschaften regulieren, erklären. Da sowohl durch direkte Inhibierung als auch durch indirekte Regulation der Syndecane über die MAPK die motilen und invasiven Eigenschaften von Kolonkarzinomzellen verändert werden können, ergibt sich hier ein großes Potential für die Kontrolle von Wachstum und Progression des Kolonkarzinoms durch eine pharmakologische Beeinflussung dieser Faktoren.

Literaturverzeichnis

1. *Krebsregister Robert-Koch-Institut*. 2014 [04.09.2014]; Available from: http://www.rki.de/Krebs/SiteGlobals/Forms/Datenbankabfrage/datenbankabfrage_stufe2_form.html.
2. *Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland /Robert - Koch Institut: Krebs in Deutschland 2007 - 2008, Häufigkeiten und Trends: Darm, 8. Auflage 2012; 36 - 39*. 2012.
3. Hawk, E.T., A. Umar, and J.L. Viner, *Colorectal cancer chemoprevention--an overview of the science*. *Gastroenterology*, 2004. **126**(5): p. 1423-47.
4. Lynch, H.T., et al., *Hereditary colorectal cancer syndromes: molecular genetics, genetic counseling, diagnosis and management*. *Fam Cancer*, 2008. **7**(1): p. 27-39.
5. Tsunoda, A., et al., *Colorectal cancer after pelvic irradiation: case reports*. *Anticancer Res*, 1997. **17**(1B): p. 729-32.
6. Hamilton, S.R., et al., *Pathology and genetics of tumours of the digestive system*. 2000: IARC press Lyon.
7. Böcker, W., et al., *Pathologie*. 2008: Elsevier, Urban und Fischer.
8. Jass, J., *Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features*. *Histopathology*, 2007. **50**(1): p. 113-130.
9. Morson, B., *The polyp-cancer sequence in the large bowel*. *Proceedings of the Royal Society of Medicine*, 1974. **67**(6 Pt 1): p. 451.
10. Fearon, E.R. and B. Vogelstein, *A genetic model for colorectal tumorigenesis*. *Cell*, 1990. **61**(5): p. 759-67.
11. Fearhead, N.S., M.P. Britton, and W.F. Bodmer, *The abc of apc*. *Human molecular genetics*, 2001. **10**(7): p. 721-733.
12. Pellman, D., *A CINtillating new job for the APC tumor suppressor*. *Science*, 2001. **291**(5513): p. 2555-2556.
13. Aaltonen, L., *Molecular epidemiology of hereditary nonpolyposis colorectal cancer in Finland, in Genes and Environment in Cancer*. 1998, Springer. p. 306-311.

14. Thibodeau, S.N., et al., *Microsatellite instability in colorectal cancer: different mutator phenotypes and the principal involvement of hMLH1*. Cancer Research, 1998. **58**(8): p. 1713-1718.
15. Masubuchi, S., et al., *The significance of microsatellite instability in predicting the development of metachronous multiple colorectal carcinomas in patients with nonfamilial colorectal carcinoma*. Cancer, 1999. **85**(9): p. 1917-1924.
16. Herman, J.G. and S.B. Baylin, *Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation*. New England Journal of Medicine, 2003. **349**(21): p. 2042-2054.
17. Issa, J.-P.J., L. Shen, and M. Toyota, *CIMP, at last*. Gastroenterology, 2005. **129**(3): p. 1121-1124.
18. Goel, A., et al., *The CpG island methylator phenotype and chromosomal instability are inversely correlated in sporadic colorectal cancer*. Gastroenterology, 2007. **132**(1): p. 127-138.
19. Austoker, J., *Cancer Prevention in Primary Care Screening for colorectal cancer*. Vol. 309. 1994. 382-386.
20. Wittekind, C. and H.-J. Meyer, *TNM: Klassifikation Maligner Tumoren*. 7. ed. 2013.
21. Hölzel, D., R. Eckel, and J. Engel, *Metastasierung beim kolorektalen Karzinom*. Der Chirurg, 2009. **80**(4): p. 331-340.
22. Sobin, L.H., M.K. Gospodarowicz, and C. Wittekind, *TNM classification of malignant tumours*. 2011: John Wiley & Sons.
23. Hirner, A. and K. Weise, *Chirurgie*. 2. ed. 2008, Thieme Verlag.
24. Ahlquist, D.A., et al., *Patterns of occult bleeding in asymptomatic colorectal cancer*. Cancer, 1989. **63**(9): p. 1826-30.
25. Majumdar, S.R., R.H. Fletcher, and A.T. Evans, *How does colorectal cancer present? Symptoms, duration, and clues to location*. The American journal of gastroenterology, 1999. **94**(10): p. 3039-3045.
26. Hamilton, W., et al., *The risk of colorectal cancer with symptoms at different ages and between the sexes: a case-control study*. BMC medicine, 2009. **7**(1): p. 17.
27. Barillari, P., et al., *Effect of preoperative colonoscopy on the incidence of synchronous and metachronous neoplasms*. Acta chirurgica scandinavica, 1990. **156**(2): p. 163-166.

28. Chen, H.-S. and S.-M. Sheen-Chen, *Synchronous and "early" metachronous colorectal adenocarcinoma*. *Diseases of the colon & rectum*, 2000. **43**(8): p. 1093-1099.
29. Pox, C., et al., *S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom Version 1.0–Juni 2013 AWMF-Registernummer: 021/007OL*. *Zeitschrift für Gastroenterologie*, 2013. **51**(08): p. 753-854.
30. Nordlinger, B., et al., *Combination of surgery and chemotherapy and the role of targeted agents in the treatment of patients with colorectal liver metastases: recommendations from an expert panel*. *Annals of oncology*, 2009. **20**(6): p. 985-992.
31. Alberts, S.R., *Update on the optimal management of patients with colorectal liver metastases*. *Critical Reviews in Oncology / Hematology*. **84**(1): p. 59-70.
32. Enker, W.E., U.T. Laffer, and G.E. Block, *Enhanced survival of patients with colon and rectal cancer is based upon wide anatomic resection*. *Annals of surgery*, 1979. **190**(3): p. 350.
33. Smith, A.J., et al., *Guideline for optimization of colorectal cancer surgery and pathology*. *J Surg Oncol*, 2010. **101**(1): p. 5-12.
34. Liang, Y., et al., *Laparoscopic versus open colorectal resection for cancer: a meta-analysis of results of randomized controlled trials on recurrence*. *Eur J Surg Oncol*, 2008. **34**(11): p. 1217-24.
35. Ohtani, H., et al., *A meta-analysis of the short- and long-term results of randomized controlled trials that compared laparoscopy-assisted and conventional open surgery for colorectal cancer*. *J Cancer*, 2011. **2**: p. 425-34.
36. Labianca, R., et al., *Primary colon cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, adjuvant treatment and follow-up*. *Annals of oncology*, 2010. **21**(suppl 5): p. v70-v77.
37. Scheele, J., et al., *Resektion colorektaler Lebermetastasen Welche Prognosefaktoren bestimmen die Patientenselektion?* *Der Chirurg*, 2001. **72**(5): p. 547-560.
38. Fong, Y., et al., *Clinical score for predicting recurrence after hepatic resection for metastatic colorectal cancer: analysis of 1001 consecutive cases*. *Ann Surg*, 1999. **230**(3): p. 309-18; discussion 318-21.
39. Nan, H., et al., *Prospective study of alcohol consumption and the risk of colorectal cancer before and after folic acid fortification in the United States*. *Ann Epidemiol*, 2013. **23**(9): p. 558-63.
40. Konings, E.J., et al., *Intake of dietary folate vitamers and risk of colorectal carcinoma: results from The Netherlands Cohort Study*. *Cancer*, 2002. **95**(7): p. 1421-33.

41. Shaukat, A., N. Scouras, and H.J. Schunemann, *Role of supplemental calcium in the recurrence of colorectal adenomas: a metaanalysis of randomized controlled trials*. Am J Gastroenterol, 2005. **100**(2): p. 390-4.
42. Kamal, M.M., et al., *Association of folate intake, dietary habits, smoking and COX-2 promotor -765G>C polymorphism with K-ras mutation in patients with colorectal cancer*. J Egypt Natl Canc Inst, 2012. **24**(3): p. 115-22.
43. Quirke, P., et al., *European guidelines for quality assurance in colorectal cancer screening and diagnosis. First Edition--Quality assurance in pathology in colorectal cancer screening and diagnosis*. Endoscopy, 2012. **44 Suppl 3**: p. Se116-30.
44. Zavoral, M., et al., *Colorectal cancer screening: 20 years of development and recent progress*. World J Gastroenterol, 2014. **20**(14): p. 3825-34.
45. Citarda, F., et al., *Efficacy in standard clinical practice of colonoscopic polypectomy in reducing colorectal cancer incidence*. Gut, 2001. **48**(6): p. 812-5.
46. Hewitson, P., et al., *Screening for colorectal cancer using the faecal occult blood test, Hemoccult*. Cochrane Database Syst Rev, 2007(1): p. Cd001216.
47. Atkin, W.S., et al., *Once-only flexible sigmoidoscopy screening in prevention of colorectal cancer: a multicentre randomised controlled trial*. Lancet, 2010. **375**(9726): p. 1624-33.
48. Astler, V.B. and F.A. Collier, *The prognostic significance of direct extension of carcinoma of the colon and rectum*. Annals of surgery, 1954. **139**(6): p. 846.
49. Mander, B., et al., *Jass staging is a predictor of outcome following "curative" resection of Dukes' B colorectal carcinoma*. The Surgeon, 2006. **4**(4): p. 227-230.
50. De Quay, N., et al., *Prognosis in Dukes' B colorectal carcinoma: The Jass classification revisited*. European Journal of Surgery, 1999. **165**(6): p. 588-592.
51. Fujii, T., et al., *Vascular invasion, but not lymphatic invasion, of the primary tumor is a strong prognostic factor in patients with colorectal cancer*. Anticancer Res, 2014. **34**(6): p. 3147-51.
52. Compton, C.C., et al., *Prognostic factors in colorectal cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999*. Arch Pathol Lab Med, 2000. **124**(7): p. 979-94.
53. Compton, C., et al., *American Joint Committee on Cancer Prognostic Factors Consensus Conference: Colorectal Working Group*. Cancer, 2000. **88**(7): p. 1739-57.

54. Popat, S. and R.S. Houlston, *A systematic review and meta-analysis of the relationship between chromosome 18q genotype, DCC status and colorectal cancer prognosis*. European journal of cancer, 2005. **41**(14): p. 2060-2070.
55. Diep, C.B., et al., *Genetic tumor markers with prognostic impact in Dukes' stages B and C colorectal cancer patients*. J Clin Oncol, 2003. **21**(5): p. 820-9.
56. Liang, J.T., et al., *Microvessel density, cyclo-oxygenase 2 expression, K-ras mutation and p53 overexpression in colonic cancer*. Br J Surg, 2004. **91**(3): p. 355-61.
57. Evertson, S., et al., *Microsatellite instability and MBD4 mutation in unselected colorectal cancer*. Anticancer research, 2002. **23**(4): p. 3569-3574.
58. Popat, S., R. Hubner, and R. Houlston, *Systematic review of microsatellite instability and colorectal cancer prognosis*. Journal of Clinical Oncology, 2005. **23**(3): p. 609-618.
59. Lugli, A., et al., *Prognostic significance of the wnt signalling pathway molecules APC, beta-catenin and E-cadherin in colorectal cancer: a tissue microarray-based analysis*. Histopathology, 2007. **50**(4): p. 453-64.
60. Lampropoulos, P., et al., *Prognostic significance of transforming growth factor beta (TGF-beta) signaling axis molecules and E-cadherin in colorectal cancer*. Tumour Biol, 2012. **33**(4): p. 1005-14.
61. Kuczynski, E.A., A.M. Vilorio-Petit, and B.L. Coomber, *Colorectal carcinoma cell production of transforming growth factor beta decreases expression of endothelial cell vascular endothelial growth factor receptor 2*. Cancer, 2011. **117**(24): p. 5601-11.
62. Chun, H.K., et al., *Low expression of transforming growth factor beta-1 in cancer tissue predicts a poor prognosis for patients with stage III rectal cancers*. Oncology, 2014. **86**(3): p. 159-69.
63. Minoo, P., et al., *Loss of raf-1 kinase inhibitor protein expression is associated with tumor progression and metastasis in colorectal cancer*. Am J Clin Pathol, 2007. **127**(5): p. 820-7.
64. Zlobec, I., et al., *Role of RHAMM within the hierarchy of well-established prognostic factors in colorectal cancer*. Gut, 2008. **57**(10): p. 1413-9.
65. Popat, S., A. Matakidou, and R.S. Houlston, *Thymidylate synthase expression and prognosis in colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis*. Journal of Clinical Oncology, 2004. **22**(3): p. 529-536.

66. Lastraioli, E., et al., *hERG1 Channels and Glut-1 as Independent Prognostic Indicators of Worse Outcome in Stage I and II Colorectal Cancer: A Pilot Study*. *Transl Oncol*, 2012. **5**(2): p. 105-12.
67. Sulkowska, M., et al., *Relations of TGF-beta1 with HIF-1 alpha, GLUT-1 and longer survival of colorectal cancer patients*. *Pathology*, 2009. **41**(3): p. 254-60.
68. Dubois, R.N., *Role of inflammation and inflammatory mediators in colorectal cancer*. *Trans Am Clin Climatol Assoc*, 2014. **125**: p. 358-73.
69. Duffy, M.J., et al., *Tumor markers in colorectal cancer, gastric cancer and gastrointestinal stromal cancers: European group on tumor markers 2014 guidelines update*. *Int J Cancer*, 2014. **134**(11): p. 2513-22.
70. Locker, G.Y., et al., *ASCO 2006 update of recommendations for the use of tumor markers in gastrointestinal cancer*. *J Clin Oncol*, 2006. **24**(33): p. 5313-27.
71. Garborg, K., et al., *Current status of screening for colorectal cancer*. *Ann Oncol*, 2013. **24**(8): p. 1963-72.
72. Jass, J., S. Love, and J. Northover, *A new prognostic classification of rectal cancer*. *The Lancet*, 1987. **329**(8545): p. 1303-1306.
73. Jass, J.R., S.B. Love, and J.M. Northover, *A new prognostic classification of rectal cancer*. *Lancet*, 1987. **1**(8545): p. 1303-6.
74. De Smedt, L., S. Palmans, and X. Sagaert, *Tumour budding in colorectal cancer: what do we know and what can we do?* *Virchows Archiv*, 2015: p. 1-12.
75. van Wyk, H., et al., *The role of tumour budding in predicting survival in patients with primary operable colorectal cancer: A systematic review*. *Cancer treatment reviews*, 2015. **41**(2): p. 151-159.
76. Kanazawa, H., et al., *Tumour budding at invasive margins and outcome in colorectal cancer*. *Colorectal Dis*, 2008. **10**(1): p. 41-7.
77. Kanazawa, H., et al., *Tumour budding at invasive margins and outcome in colorectal cancer*. *Colorectal Disease*, 2008. **10**(1): p. 41-47.
78. Hase, K., et al., *Prognostic value of tumor "budding" in patients with colorectal cancer*. *Diseases of the colon & rectum*, 1993. **36**(7): p. 627-635.

79. Morel, A.-P., et al., *Generation of Breast Cancer Stem Cells through Epithelial-Mesenchymal Transition*. PLoS ONE, 2008. **3**(8): p. e2888.
80. Mani, S.A., et al., *The Epithelial-Mesenchymal Transition Generates Cells with Properties of Stem Cells*. Cell. **133**(4): p. 704-715.
81. Grigore, A.D., et al., *Tumor Budding: The Name is EMT. Partial EMT*. J Clin Med, 2016. **5**(5).
82. Prall, F., *Tumour budding in colorectal carcinoma*. Histopathology, 2007. **50**(1): p. 151-162.
83. Schaefer, L. and R.M. Schaefer, *Proteoglycans: from structural compounds to signaling molecules*. Cell Tissue Res, 2010. **339**(1): p. 237-46.
84. Kim, C.W., et al., *Members of the syndecan family of heparan sulfate proteoglycans are expressed in distinct cell-, tissue-, and development-specific patterns*. Mol Biol Cell, 1994. **5**(7): p. 797-805.
85. Ueno, M., et al., *Structural characterization of heparan sulfate and chondroitin sulfate of syndecan-1 purified from normal murine mammary gland epithelial cells. Common phosphorylation of xylose and differential sulfation of galactose in the protein linkage region tetrasaccharide sequence*. J Biol Chem, 2001. **276**(31): p. 29134-40.
86. Rosenberg, R.D., et al., *Heparan sulfate proteoglycans of the cardiovascular system. Specific structures emerge but how is synthesis regulated?* J Clin Invest, 1997. **100**(11 Suppl): p. S67-75.
87. Alexopoulou, A.N., H.A. Multhaupt, and J.R. Couchman, *Syndecans in wound healing, inflammation and vascular biology*. Int J Biochem Cell Biol, 2007. **39**(3): p. 505-28.
88. McDermott, S.P., et al., *Juvenile syndecan-1 null mice are protected from carcinogen-induced tumor development*. Oncogene, 2007. **26**(10): p. 1407-16.
89. Reizes, O., S.C. Benoit, and D.J. Clegg, *The role of syndecans in the regulation of body weight and synaptic plasticity*. Int J Biochem Cell Biol, 2008. **40**(1): p. 28-45.
90. Kwon, M.J., et al., *Syndecans play dual roles as cell adhesion receptors and docking receptors*. FEBS Lett, 2012. **586**(16): p. 2207-11.
91. Leonova, E.I. and O.V. Galzitskaya, *Structure and functions of syndecans in vertebrates*. Biochemistry (Mosc), 2013. **78**(10): p. 1071-85.
92. Roper, J.A., R.C. Williamson, and M.D. Bass, *Syndecan and integrin interactomes: large complexes in small spaces*. Curr Opin Struct Biol, 2012. **22**(5): p. 583-90.

93. Lambaerts, K., S.A. Wilcox-Adelman, and P. Zimmermann, *The signaling mechanisms of syndecan heparan sulfate proteoglycans*. *Curr Opin Cell Biol*, 2009. **21**(5): p. 662-9.
94. Nourry, C., S.G. Grant, and J.P. Borg, *PDZ domain proteins: plug and play!* *Sci STKE*, 2003. **2003**(179): p. Re7.
95. Gao, Y., et al., *Synectin, syndecan-4 cytoplasmic domain binding PDZ protein, inhibits cell migration*. *J Cell Physiol*, 2000. **184**(3): p. 373-9.
96. Ethell, I.M., et al., *Synbindin, A novel syndecan-2-binding protein in neuronal dendritic spines*. *J Cell Biol*, 2000. **151**(1): p. 53-68.
97. Hsueh, Y.P., et al., *Direct interaction of CASK/LIN-2 and syndecan heparan sulfate proteoglycan and their overlapping distribution in neuronal synapses*. *J Cell Biol*, 1998. **142**(1): p. 139-51.
98. Cohen, A.R., et al., *Human CASK/LIN-2 binds syndecan-2 and protein 4.1 and localizes to the basolateral membrane of epithelial cells*. *J Cell Biol*, 1998. **142**(1): p. 129-38.
99. Zimmermann, P., et al., *Characterization of syntenin, a syndecan-binding PDZ protein, as a component of cell adhesion sites and microfilaments*. *Mol Biol Cell*, 2001. **12**(2): p. 339-50.
100. Woods, A. and J.R. Couchman, *Syndecan-4 and focal adhesion function*. *Current opinion in cell biology*, 2001. **13**(5): p. 578-583.
101. Rapraeger, A.C. and V.L. Ott, *Molecular interactions of the syndecan core proteins*. *Current opinion in cell biology*, 1998. **10**(5): p. 620-628.
102. Longley, R.L., et al., *Control of morphology, cytoskeleton and migration by syndecan-4*. *J Cell Sci*, 1999. **112** (Pt 20): p. 3421-31.
103. Steinfeld, R., H. Van Den Berghe, and G. David, *Stimulation of fibroblast growth factor receptor-1 occupancy and signaling by cell surface-associated syndecans and glypican*. *J Cell Biol*, 1996. **133**(2): p. 405-16.
104. Pruessmeyer, J., et al., *A disintegrin and metalloproteinase 17 (ADAM17) mediates inflammation-induced shedding of syndecan-1 and -4 by lung epithelial cells*. *J Biol Chem*, 2010. **285**(1): p. 555-64.
105. Schmidt, A., et al., *Plasmin- and thrombin-accelerated shedding of syndecan-4 ectodomain generates cleavage sites at Lys(114)-Arg(115) and Lys(129)-Val(130) bonds*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(41): p. 34441-6.

106. Subramanian, S.V., M.L. Fitzgerald, and M. Bernfield, *Regulated shedding of syndecan-1 and -4 ectodomains by thrombin and growth factor receptor activation*. J Biol Chem, 1997. **272**(23): p. 14713-20.
107. Brule, S., et al., *The shedding of syndecan-4 and syndecan-1 from HeLa cells and human primary macrophages is accelerated by SDF-1/CXCL12 and mediated by the matrix metalloproteinase-9*. Glycobiology, 2006. **16**(6): p. 488-501.
108. Charnaux, N., et al., *RANTES (CCL5) induces a CCR5-dependent accelerated shedding of syndecan-1 (CD138) and syndecan-4 from HeLa cells and forms complexes with the shed ectodomains of these proteoglycans as well as with those of CD44*. Glycobiology, 2005. **15**(2): p. 119-30.
109. Jalkanen, M., et al., *Cell surface proteoglycan of mouse mammary epithelial cells is shed by cleavage of its matrix-binding ectodomain from its membrane-associated domain*. J Cell Biol, 1987. **105**(6 Pt 2): p. 3087-96.
110. Wang, J.B., et al., *Insulin increases shedding of syndecan-1 in the serum of patients with type 2 diabetes mellitus*. Diabetes Res Clin Pract, 2009. **86**(2): p. 83-8.
111. Fitzgerald, M.L., et al., *Shedding of syndecan-1 and -4 ectodomains is regulated by multiple signaling pathways and mediated by a TIMP-3-sensitive metalloproteinase*. J Cell Biol, 2000. **148**(4): p. 811-24.
112. Chen, Y., et al., *Streptococcus pneumoniae sheds syndecan-1 ectodomains through ZmpC, a metalloproteinase virulence factor*. J Biol Chem, 2007. **282**(1): p. 159-67.
113. Manon-Jensen, T., Y. Itoh, and J.R. Couchman, *Proteoglycans in health and disease: the multiple roles of syndecan shedding*. Febs j, 2010. **277**(19): p. 3876-89.
114. Rapraeger, A., et al., *The cell surface proteoglycan from mouse mammary epithelial cells bears chondroitin sulfate and heparan sulfate glycosaminoglycans*. J Biol Chem, 1985. **260**(20): p. 11046-52.
115. Saunders, S., et al., *Molecular cloning of syndecan, an integral membrane proteoglycan*. J Cell Biol, 1989. **108**(4): p. 1547-56.
116. Hayashida, K., et al., *Syndecan-1 is an in vivo suppressor of Gram-positive toxic shock*. J Biol Chem, 2008. **283**(29): p. 19895-903.
117. Hayashida, K., W.C. Parks, and P.W. Park, *Syndecan-1 shedding facilitates the resolution of neutrophilic inflammation by removing sequestered CXC chemokines*. Blood, 2009. **114**(14): p. 3033-43.

118. Xu, J., et al., *Endogenous attenuation of allergic lung inflammation by syndecan-1*. J Immunol, 2005. **174**(9): p. 5758-65.
119. Vanhoutte, D., et al., *Increased expression of syndecan-1 protects against cardiac dilatation and dysfunction after myocardial infarction*. Circulation, 2007. **115**(4): p. 475-82.
120. Rops, A.L., et al., *Syndecan-1 deficiency aggravates anti-glomerular basement membrane nephritis*. Kidney Int, 2007. **72**(10): p. 1204-15.
121. Lorand, L. and R.M. Graham, *Transglutaminases: crosslinking enzymes with pleiotropic functions*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003. **4**(2): p. 140-56.
122. Floer, M., et al., *Enoxaparin improves the course of dextran sodium sulfate-induced colitis in syndecan-1-deficient mice*. Am J Pathol, 2010. **176**(1): p. 146-57.
123. Day, R., et al., *Expression of syndecan-1 in inflammatory bowel disease and a possible mechanism of heparin therapy*. Dig Dis Sci, 1999. **44**(12): p. 2508-15.
124. Bode, L., et al., *Heparan sulfate and syndecan-1 are essential in maintaining murine and human intestinal epithelial barrier function*. J Clin Invest, 2008. **118**(1): p. 229-38.
125. Fukai, N., et al., *Syndecan-1: an inhibitor of arterial smooth muscle cell growth and intimal hyperplasia*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2009. **29**(9): p. 1356-62.
126. Stepp, M.A., et al., *Defects in keratinocyte activation during wound healing in the syndecan-1-deficient mouse*. J Cell Sci, 2002. **115**(Pt 23): p. 4517-31.
127. Ramani, V.C., et al., *Heparanase plays a dual role in driving hepatocyte growth factor (HGF) signaling by enhancing HGF expression and activity*. J Biol Chem, 2011. **286**(8): p. 6490-9.
128. Ritchie, J.P., et al., *SST0001, a chemically modified heparin, inhibits myeloma growth and angiogenesis via disruption of the heparanase/syndecan-1 axis*. Clin Cancer Res, 2011. **17**(6): p. 1382-93.
129. Shaughnessy, S.G., et al., *Neutralization of interleukin-11 activity decreases osteoclast formation and increases cancellous bone volume in ovariectomized mice*. Cytokine, 2002. **20**(2): p. 78-85.
130. Ishikawa, T. and R.H. Kramer, *Sdc1 negatively modulates carcinoma cell motility and invasion*. Exp Cell Res, 2010. **316**(6): p. 951-65.

131. Gama-de-Souza, L.N., et al., *Adhesion and protease activity in cell lines from human salivary gland tumors are regulated by the laminin-derived peptide AG73, syndecan-1 and beta1 integrin*. *Matrix Biol*, 2008. **27**(5): p. 402-19.
132. Beauvais, D.M., et al., *Syndecan-1 regulates alphavbeta3 and alphavbeta5 integrin activation during angiogenesis and is blocked by synstatin, a novel peptide inhibitor*. *J Exp Med*, 2009. **206**(3): p. 691-705.
133. Purushothaman, A., et al., *Heparanase-enhanced shedding of syndecan-1 by myeloma cells promotes endothelial invasion and angiogenesis*. *Blood*, 2010. **115**(12): p. 2449-57.
134. David, G., et al., *Molecular cloning of amphiglycan, a novel integral membrane heparan sulfate proteoglycan expressed by epithelial and fibroblastic cells*. *J Cell Biol*, 1992. **118**(4): p. 961-9.
135. Kojima, T., N.W. Shworak, and R.D. Rosenberg, *Molecular cloning and expression of two distinct cDNA-encoding heparan sulfate proteoglycan core proteins from a rat endothelial cell line*. *J Biol Chem*, 1992. **267**(7): p. 4870-7.
136. Kojima, T., et al., *Human ryudocan core protein: molecular cloning and characterization of the cDNA, and chromosomal localization of the gene*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1993. **190**(3): p. 814-22.
137. Spring, S.C. and B.I. Terman, *Identification of a syndecan 4 pseudogene*. *DNA Seq*, 2002. **13**(6): p. 353-7.
138. Elfenbein, A., et al., *Syndecan 4 regulates FGFR1 signaling in endothelial cells by directing macropinocytosis*. *Sci Signal*, 2012. **5**(223): p. ra36.
139. Rauch, B.H., et al., *Syndecan-4 is required for thrombin-induced migration and proliferation in human vascular smooth muscle cells*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(17): p. 17507-11.
140. Chua, C.C., et al., *Heparan sulfate proteoglycans function as receptors for fibroblast growth factor-2 activation of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2*. *Circ Res*, 2004. **94**(3): p. 316-23.
141. Ishiguro, K., T. Kojima, and T. Muramatsu, *Syndecan-4 as a molecule involved in defense mechanisms*. *Glycoconj J*, 2002. **19**(4-5): p. 315-8.
142. Kaneider, N.C., et al., *Syndecan-4 as antithrombin receptor of human neutrophils*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001. **287**(1): p. 42-6.
143. Keum, E., et al., *Syndecan-4 regulates localization, activity and stability of protein kinase C-alpha*. *Biochem J*, 2004. **378**(Pt 3): p. 1007-14.

144. Xian, X., S. Gopal, and J.R. Couchman, *Syndecans as receptors and organizers of the extracellular matrix*. Cell Tissue Res, 2010. **339**(1): p. 31-46.
145. Saunders, S., et al., *Molecular cloning of syndecan, an integral membrane proteoglycan*. The Journal of Cell Biology, 1989. **108**(4): p. 1547-1556.
146. Couchman, J.R. and A. Woods, *Syndecans, signaling, and cell adhesion*. Journal of cellular biochemistry, 1996. **61**(4): p. 578-584.
147. Kato, M., et al., *Loss of cell surface syndecan-1 causes epithelia to transform into anchorage-independent mesenchyme-like cells*. Mol Biol Cell, 1995. **6**(5): p. 559-76.
148. Ohashi, M., et al., *Expression of syndecan-1 and E-cadherin is inversely correlated with poor patient's prognosis and recurrent status of extrahepatic bile duct carcinoma*. Biomedical Research, 2009. **30**(2): p. 79-86.
149. Ledezma, R., et al., *Altered expression patterns of syndecan-1 and-2 predict biochemical recurrence in prostate cancer*. Asian J Androl, 2011. **13**(3): p. 476-480.
150. Shin, J., et al., *Function of the syndecan-4 cytoplasmic domain in oligomerization and association with alpha-actinin in turkey muscle satellite cells*. Mol Cell Biochem, 2012. **363**(1-2): p. 437-44.
151. Choi, Y., et al., *The oligomeric status of syndecan-4 regulates syndecan-4 interaction with alpha-actinin*. Eur J Cell Biol, 2008. **87**(10): p. 807-15.
152. Gopal, S., et al., *Heparan sulfate chain valency controls syndecan-4 function in cell adhesion*. J Biol Chem, 2010. **285**(19): p. 14247-58.
153. Bernfield, M. and R. Sanderson, *Syndecan, a developmentally regulated cell surface proteoglycan that binds extracellular matrix and growth factors*. Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences, 1990. **327**(1239): p. 171-186.
154. Ridley, R.C., et al., *Expression of syndecan regulates human myeloma plasma cell adhesion to type I collagen*. Blood, 1993. **81**(3): p. 767-774.
155. Sanderson, R.D. and M. Bernfield, *Molecular polymorphism of a cell surface proteoglycan: distinct structures on simple and stratified epithelia*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1988. **85**(24): p. 9562-9566.
156. Woods, A., et al., *Syndecan-4 binding to the high affinity heparin-binding domain of fibronectin drives focal adhesion formation in fibroblasts*. Archives of biochemistry and biophysics, 2000. **374**(1): p. 66-72.

157. Longley, R.L., et al., *Control of morphology, cytoskeleton and migration by syndecan-4*. Journal of Cell Science, 1999. **112**(20): p. 3421-3431.
158. Bloom, L., K.C. Ingham, and R.O. Hynes, *Fibronectin regulates assembly of actin filaments and focal contacts in cultured cells via the heparin-binding site in repeat III13*. Molecular biology of the cell, 1999. **10**(5): p. 1521-1536.
159. Huhtala, P., et al., *Cooperative signaling by alpha 5 beta 1 and alpha 4 beta 1 integrins regulates metalloproteinase gene expression in fibroblasts adhering to fibronectin*. The Journal of Cell Biology, 1995. **129**(3): p. 867-879.
160. Echtermeyer, F., et al., *Syndecan-4 core protein is sufficient for the assembly of focal adhesions and actin stress fibers*. Journal of Cell Science, 1999. **112**(20): p. 3433-3441.
161. Wilcox-Adelman, S.A., et al., *Syndecan-4: dispensable or indispensable?* Glycoconj J, 2002. **19**(4-5): p. 305-13.
162. Woods, A. and J.R. Couchman, *Heparan sulfate proteoglycans and signalling in cell adhesion, in Heparin and Related Polysaccharides*. 1992, Springer. p. 87-96.
163. Eunyong, K., et al., *Syndecan-4 regulates localization, activity and stability of protein kinase C-alpha*. Biochemical Journal, 2004. **378**(3): p. 1007-1014.
164. Greene, D.K., et al., *Syndecan-4 associates with alpha-actinin*. Journal of Biological Chemistry, 2003. **278**(9): p. 7617-7623.
165. Baciuc, P., et al., *Syndesmos, a protein that interacts with the cytoplasmic domain of syndecan-4, mediates cell spreading and actin cytoskeletal organization*. Journal of Cell Science, 2000. **113**(2): p. 315-324.
166. Borm, B., et al., *Role of filopodia in adhesion formation during migration of epithelial cells. From computational biophysics to systems biology*, 2007. **36**: p. 159-163.
167. Huang, W., et al., *Interference of tenascin-C with syndecan-4 binding to fibronectin blocks cell adhesion and stimulates tumor cell proliferation*. Cancer research, 2001. **61**(23): p. 8586-8594.
168. Echtermeyer, F., et al., *Delayed wound repair and impaired angiogenesis in mice lacking syndecan-4*. The Journal of clinical investigation, 2001. **107**(2): p. R9-R14.
169. Humphries, M.J., *Cytoplasmic interactions of syndecan-4 orchestrate adhesion receptor and growth factor receptor signalling*. Biochemical Journal, 2002. **368**(1): p. 1-15.

170. Saoncella, S., et al., *Syndecan-4 signals cooperatively with integrins in a Rho-dependent manner in the assembly of focal adhesions and actin stress fibers*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1999. **96**(6): p. 2805-2810.
171. Bass, M.D., M.R. Morgan, and M.J. Humphries, *Integrins and syndecan-4 make distinct, but critical, contributions to adhesion contact formation*. Soft Matter, 2007. **3**(3): p. 372-376.
172. Mostafavi-Pour, Z., et al., *Integrin-specific signaling pathways controlling focal adhesion formation and cell migration*. The Journal of cell biology, 2003. **161**(1): p. 155-167.
173. Bass, M.D., et al., *Syndecan-4-dependent Rac1 regulation determines directional migration in response to the extracellular matrix*. The Journal of cell biology, 2007. **177**(3): p. 527-538.
174. Pankov, R., et al., *A Rac switch regulates random versus directionally persistent cell migration*. The Journal of cell biology, 2005. **170**(5): p. 793-802.
175. Tkachenko, E., et al., *Syndecan-4 clustering induces cell migration in a PDZ-dependent manner*. Circulation research, 2006. **98**(11): p. 1398-1404.
176. Ng, T., et al., *PKC α regulates β 1 integrin-dependent cell motility through association and control of integrin traffic*. The EMBO Journal, 1999. **18**(14): p. 3909-3923.
177. Morgan, M.R., M.J. Humphries, and M.D. Bass, *Synergistic control of cell adhesion by integrins and syndecans*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2007. **8**(12): p. 957-969.
178. Burbach, B.J., Y. Ji, and A.C. Rapraeger, *Syndecan-1 ectodomain regulates matrix-dependent signaling in human breast carcinoma cells*. Experimental cell research, 2004. **300**(1): p. 234-247.
179. Sulka, B., et al., *Tyrosine dephosphorylation of the syndecan-1 PDZ binding domain regulates syntenin-1 recruitment*. Journal of Biological Chemistry, 2009. **284**(16): p. 10659-10671.
180. Bobardt, M.D., et al., *Syndecan captures, protects, and transmits HIV to T lymphocytes*. Immunity, 2003. **18**(1): p. 27-39.
181. De Francesco, M.A., M. Baronio, and C. Poiesi, *HIV-1 p17 matrix protein interacts with heparan sulfate side chain of CD44v3, syndecan-2, and syndecan-4 proteoglycans expressed on human activated CD4+ T cells affecting tumor necrosis factor alpha and interleukin 2 production*. J Biol Chem, 2011. **286**(22): p. 19541-8.
182. Freissler, E., et al., *Syndecan-1 and syndecan-4 can mediate the invasion of OpaHSPG-expressing Neisseria gonorrhoeae into epithelial cells*. Cell Microbiol, 2000. **2**(1): p. 69-82.

183. Gallo, R., et al., *Syndecans-1 and -4 are induced during wound repair of neonatal but not fetal skin*. J Invest Dermatol, 1996. **107**(5): p. 676-83.
184. Gallo, R.L., et al., *Syndecans, cell surface heparan sulfate proteoglycans, are induced by a proline-rich antimicrobial peptide from wounds*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(23): p. 11035-9.
185. Brooks, R., R. Williamson, and M. Bass, *Syndecan-4 independently regulates multiple small GTPases to promote fibroblast migration during wound healing*. Small GTPases, 2012. **3**(2): p. 73-9.
186. Echtermeyer, F., et al., *Delayed wound repair and impaired angiogenesis in mice lacking syndecan-4*. J Clin Invest, 2001. **107**(2): p. R9-r14.
187. Ikesue, M., et al., *Syndecan-4 deficiency limits neointimal formation after vascular injury by regulating vascular smooth muscle cell proliferation and vascular progenitor cell mobilization*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2011. **31**(5): p. 1066-74.
188. Xie, J., et al., *Syndecan-4 over-expression preserves cardiac function in a rat model of myocardial infarction*. J Mol Cell Cardiol, 2012. **53**(2): p. 250-8.
189. Cizmeci-Smith, G., et al., *Differential expression of transmembrane proteoglycans in vascular smooth muscle cells*. J Biol Chem, 1993. **268**(25): p. 18740-7.
190. Hashimoto, Y., M. Skacel, and J.C. Adams, *Association of loss of epithelial syndecan-1 with stage and local metastasis of colorectal adenocarcinomas: An immunohistochemical study of clinically annotated tumors*. BMC Cancer, 2008. **8**: p. 185.
191. Fujiya, M., et al., *Reduced expression of syndecan-1 affects metastatic potential and clinical outcome in patients with colorectal cancer*. Jpn J Cancer Res, 2001. **92**(10): p. 1074-81.
192. Lundin, M., et al., *Epithelial syndecan-1 expression is associated with stage and grade in colorectal cancer*. Oncology, 2005. **68**(4-6): p. 306-13.
193. Peretti, T., et al., *Heparanase-2, syndecan-1, and extracellular matrix remodeling in colorectal carcinoma*. Eur J Gastroenterol Hepatol, 2008. **20**(8): p. 756-65.
194. Kim, S.Y., et al., *Syndecan-1 Expression Is Associated with Tumor Size and EGFR Expression in Colorectal Carcinoma: A Clinicopathological Study of 230 Cases*. International journal of medical sciences, 2015. **12**(2): p. 92.
195. Jechorek, D., *Der Einfluß von Syndecan-1 und Syndecan-4 auf Adhäsion, Migration und Invasion von Kolonkarzinomzellen in vivo und in vitro*. ZB-Diss. 13.667, 2012: p. 227.

196. Lendorf, M.E., et al., *Syndecan-1 and Syndecan-4 Are Independent Indicators in Breast Carcinoma*. Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 2011. **59**(6): p. 615-629.
197. Na, K.Y., et al., *Syndecan-4 and fibronectin in osteosarcoma*. Pathology, 2012. **44**(4): p. 325-30.
198. Labropoulou, V.T., et al., *Expression of syndecan-4 and correlation with metastatic potential in testicular germ cell tumours*. Biomed Res Int, 2013. **2013**: p. 214864.
199. Robinson, M.J. and M.H. Cobb, *Mitogen-activated protein kinase pathways*. Curr Opin Cell Biol, 1997. **9**(2): p. 180-6.
200. Cobb, M.H. and E.J. Goldsmith, *How MAP kinases are regulated*. Journal of Biological Chemistry, 1995. **270**(25): p. 14843-14846.
201. Robinson, M.J. and M.H. Cobb, *Mitogen-activated protein kinase pathways*. Current opinion in cell biology, 1997. **9**(2): p. 180-186.
202. De Luca, A., et al., *The RAS/RAF/MEK/ERK and the PI3K/AKT signalling pathways: role in cancer pathogenesis and implications for therapeutic approaches*. Expert opinion on therapeutic targets, 2012. **16**(sup2): p. S17-S27.
203. Sugden, P.H. and M.A. Bogoyevitch, *Intracellular signalling through protein kinases in the heart*. Cardiovasc Res, 1995. **30**(4): p. 478-92.
204. Sadoshima, J., et al., *Angiotensin II and other hypertrophic stimuli mediated by G protein-coupled receptors activate tyrosine kinase, mitogen-activated protein kinase, and 90-kD S6 kinase in cardiac myocytes. The critical role of Ca(2+)-dependent signaling*. Circ Res, 1995. **76**(1): p. 1-15.
205. Iordanov, M.S. and B.E. Magun, *Different mechanisms of c-Jun NH(2)-terminal kinase-1 (JNK1) activation by ultraviolet-B radiation and by oxidative stressors*. J Biol Chem, 1999. **274**(36): p. 25801-6.
206. Raingeaud, J., et al., *Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine*. J Biol Chem, 1995. **270**(13): p. 7420-6.
207. Rouse, J., et al., *A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins*. Cell, 1994. **78**(6): p. 1027-37.
208. Yuasa, T., et al., *Tumor necrosis factor signaling to stress-activated protein kinase (SAPK)/Jun NH2-terminal kinase (JNK) and p38. Germinal center kinase couples TRAF2 to mitogen-*

- activated protein kinase/ERK kinase 1 and SAPK while receptor interacting protein associates with a mitogen-activated protein kinase kinase kinase upstream of MKK6 and p38.* J Biol Chem, 1998. **273**(35): p. 22681-92.
209. Sugden, P.H. and A. Clerk, "Stress-responsive" mitogen-activated protein kinases (*c-Jun N-terminal kinases and p38 mitogen-activated protein kinases*) in the myocardium. *Circ Res*, 1998. **83**(4): p. 345-52.
210. Marais, E., et al., *Activation of p38 MAPK induced by a multi-cycle ischaemic preconditioning protocol is associated with attenuated p38 MAPK activity during sustained ischaemia and reperfusion.* J Mol Cell Cardiol, 2001. **33**(4): p. 769-78.
211. Pullikuth, A.K. and A.D. Catling, *Scaffold mediated regulation of MAPK signaling and cytoskeletal dynamics: A perspective.* Cellular signalling, 2007. **19**(8): p. 1621-1632.
212. Ma, L., et al., *Phosphorylation and Functional Inactivation of TSC2 by Erk: Implications for Tuberous Sclerosis and Cancer Pathogenesis.* Cell, 2005. **121**(2): p. 179-193.
213. Chu, B., et al., *Sequential phosphorylation by mitogen-activated protein kinase and glycogen synthase kinase 3 represses transcriptional activation by heat shock factor-1.* Journal of Biological Chemistry, 1996. **271**(48): p. 30847-30857.
214. Schmid, R.-S., W.M. Pruitt, and P.F. Maness, *A MAP kinase-signaling pathway mediates neurite outgrowth on L1 and requires Src-dependent endocytosis.* The Journal of Neuroscience, 2000. **20**(11): p. 4177-4188.
215. Wolf, I., et al., *Involvement of the activation loop of ERK in the detachment from cytosolic anchoring.* Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(27): p. 24490-24497.
216. Zassadowski, F., et al., *Regulation of the transcriptional activity of nuclear receptors by the MEK/ERK1/2 pathway.* Cellular signalling, 2012. **24**(12): p. 2369-2377.
217. Sigoillot, F.D., D.R. Evans, and H.I. Guy, *Growth-dependent regulation of mammalian pyrimidine biosynthesis by the protein kinase A and MAPK signaling cascades.* Journal of Biological Chemistry, 2002. **277**(18): p. 15745-15751.
218. Thomas, R.K., et al., *High-throughput oncogene mutation profiling in human cancer.* Nature genetics, 2007. **39**(3): p. 347-351.
219. Pao, W., et al., *Acquired resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib is associated with a second mutation in the EGFR kinase domain.* PLoS Med, 2005. **2**(3): p. e73.
220. Network, C.G.A., *Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer.* Nature, 2012. **487**(7407): p. 330-337.

221. Davies, H., et al., *Mutations of the BRAF gene in human cancer*. Nature, 2002. **417**(6892): p. 949-954.
222. Tol, J., I.D. Nagtegaal, and C.J. Punt, *BRAF mutation in metastatic colorectal cancer*. New England Journal of Medicine, 2009. **361**(1): p. 98-99.
223. Murugan, A.K., et al., *MEK1 mutations, but not ERK2 mutations, occur in melanomas and colon carcinomas, but none in thyroid carcinomas*. Cell cycle, 2009. **8**(13): p. 2122-2124.
224. Di Nicolantonio, F., et al., *Wild-type BRAF is required for response to panitumumab or cetuximab in metastatic colorectal cancer*. Journal of Clinical Oncology, 2008. **26**(35): p. 5705-5712.
225. Richman, S.D., et al., *KRAS and BRAF mutations in advanced colorectal cancer are associated with poor prognosis but do not preclude benefit from oxaliplatin or irinotecan: results from the MRC FOCUS trial*. Journal of Clinical Oncology, 2009. **27**(35): p. 5931-5937.
226. Prahallad, A., et al., *Unresponsiveness of colon cancer to BRAF (V600E) inhibition through feedback activation of EGFR*. Nature, 2012. **483**(7388): p. 100-103.
227. Mao, M., et al., *Resistance to BRAF inhibition in BRAF-mutant colon cancer can be overcome with PI3K inhibition or demethylating agents*. Clinical cancer research, 2013. **19**(3): p. 657-667.
228. Spreafico, A., et al., *Rational combination of a MEK inhibitor, selumetinib, and the Wnt/calcium pathway modulator, cyclosporin A, in preclinical models of colorectal cancer*. Clinical Cancer Research, 2013. **19**(15): p. 4149-4162.
229. Mahtouk, K., et al., *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, 2007. **109**(11): p. 4914-4923.
230. Fears, C.Y. and A. Woods, *The role of syndecans in disease and wound healing*. Matrix biology, 2006. **25**(7): p. 443-456.
231. Reiland, J., et al., *Heparanase degrades syndecan-1 and perlecan heparan sulfate functional implications for tumor cell invasion*. Journal of Biological Chemistry, 2004. **279**(9): p. 8047-8055.
232. Yang, Y., et al., *Heparanase Enhances Syndecan-1 Shedding A NOVEL MECHANISM FOR STIMULATION OF TUMOR GROWTH AND METASTASIS*. Journal of Biological Chemistry, 2007. **282**(18): p. 13326-13333.

233. Anttonen, A., et al., *High syndecan-1 expression is associated with favourable outcome in squamous cell lung carcinoma treated with radical surgery*. Lung Cancer, 2001. **32**(3): p. 297-305.
234. Stepp, M.A., et al., *Loss of syndecan-1 is associated with malignant conversion in skin carcinogenesis*. Molecular carcinogenesis, 2010. **49**(4): p. 363-373.
235. Kusumoto, T., et al., *Clinical significance of syndecan-1 and versican expression in human epithelial ovarian cancer*. Oncology reports, 2010. **23**(4): p. 917-925.
236. Brattain, M.G., et al., *Heterogeneity of malignant cells from a human colonic carcinoma*. Cancer Res, 1981. **41**(5): p. 1751-6.
237. Duncia, J.V., et al., *MEK inhibitors: the chemistry and biological activity of U0126, its analogs, and cyclization products*. Bioorg Med Chem Lett, 1998. **8**(20): p. 2839-44.
238. Fukazawa, H., et al., *Mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase kinase (MEK) inhibitors restore anoikis sensitivity in human breast cancer cell lines with a constitutively activated extracellular-regulated kinase (ERK) pathway*. Mol Cancer Ther, 2002. **1**(5): p. 303-9.
239. Adams, J.L., et al., *Pyrimidinylimidazole inhibitors of CSBP/p38 kinase demonstrating decreased inhibition of hepatic cytochrome P450 enzymes*. Bioorg Med Chem Lett, 1998. **8**(22): p. 3111-6.
240. Peifer, C., G. Wagner, and S. Laufer, *New approaches to the treatment of inflammatory disorders small molecule inhibitors of p38 MAP kinase*. Curr Top Med Chem, 2006. **6**(2): p. 113-49.
241. Bennett, B.L., et al., *SP600125, an anthrapyrazolone inhibitor of Jun N-terminal kinase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(24): p. 13681-6.
242. Bayer-Garner, I.B., J.A. Nickell, and S. Korourian, *Routine syndecan-1 immunohistochemistry aids in the diagnosis of chronic endometritis*. Archives of pathology & laboratory medicine, 2004. **128**(9): p. 1000-1003.
243. Bayer-Garner, I.B., R.D. Sanderson, and B.R. Smoller, *Syndecan-1 is strongly expressed in the anagen hair follicle outer root sheath and in the dermal papilla but expression diminishes with involution of the hair follicle*. The American journal of dermatopathology, 2002. **24**(6): p. 484-489.
244. Jalkanen, M., *Induced Expression of Syndecan in Healing Wounds*. The Journal of Cell Biology, 1991. **114**.

245. Bernfield, M., et al., *Biology of the syndecans: a family of transmembrane heparan sulfate proteoglycans*. *Annu Rev Cell Biol*, 1992. **8**: p. 365-93.
246. Trautman, M.S., J. Kimelman, and M. Bernfield, *Developmental expression of syndecan, an integral membrane proteoglycan, correlates with cell differentiation*. *Development*, 1991. **111**(1): p. 213-220.
247. Kato, M., et al., *Loss of cell surface syndecan-1 causes epithelia to transform into anchorage-independent mesenchyme-like cells*. *Molecular Biology of the Cell*, 1995. **6**(5): p. 559-576.
248. Rapraeger, A., M. Jalkanen, and M. Bernfield, *Cell surface proteoglycan associates with the cytoskeleton at the basolateral cell surface of mouse mammary epithelial cells*. *The Journal of cell biology*, 1986. **103**(6): p. 2683-2696.
249. Levy, P., et al., *Syndecan-1 alterations during the tumorigenic progression of human colonic Caco-2 cells induced by human Ha-ras or polyoma middle T oncogenes*. *British journal of cancer*, 1996. **74**(3): p. 423.
250. Dhodapkar, M.V., et al., *Syndecan-1 is a multifunctional regulator of myeloma pathobiology: control of tumor cell survival, growth, and bone cell differentiation*. *Blood*, 1998. **91**(8): p. 2679-2688.
251. Sun, D., et al., *Simultaneous loss of expression of syndecan-1 and E-cadherin in the embryonic palate during epithelial-mesenchymal transformation*. *The International journal of developmental biology*, 1998. **42**(5): p. 733.
252. Leppa, S., et al., *Syndecan-1 expression in mammary epithelial tumor cells is E-cadherin-dependent*. *Journal of Cell Science*, 1996. **109**(6): p. 1393-1403.
253. Kim, Y.I., et al., *Prognostic significance of syndecan-1 expression in cervical cancers*. *Journal of gynecologic oncology*, 2011. **22**(3): p. 161-167.
254. Nackaerts, K., et al., *Heparan sulfate proteoglycan expression in human lung-cancer cells*. *International journal of cancer*, 1997. **74**(3): p. 335-345.
255. Pulkkinen, J.O., et al., *Syndecan-1: a new prognostic marker in laryngeal cancer*. *Acta otolaryngologica*, 1997. **117**(2): p. 312-315.
256. Anttonen, A., et al., *Syndecan-1 expression has prognostic significance in head and neck carcinoma*. *Br J Cancer*, 1999. **79**(3-4): p. 558-64.
257. Mitselou, A., et al., *Syndecan-1, Epithelial-Mesenchymal Transition Markers (E-cadherin/beta-catenin) and Neoangiogenesis-related Proteins (PCAM-1 and Endoglin) in Colorectal Cancer*. *Anticancer Res*, 2016. **36**(5): p. 2271-80.

258. Fujiya, M., et al., *Reduced Expression of Syndecan-1 Affects Metastatic Potential and Clinical Outcome in Patients with Colorectal Cancer*. *Cancer Science*, 2001. **92**(10): p. 1074-1081.
259. Baciú, P.C. and P.F. Goetinck, *Protein kinase C regulates the recruitment of syndecan-4 into focal contacts*. *Molecular biology of the cell*, 1995. **6**(11): p. 1503-1513.
260. Couchman, J.R., L. Chen, and A. Woods, *Syndecans and cell adhesion*. *International review of cytology*, 2001. **207**: p. 113-150.
261. Woods, A. and J.R. Couchman, *Syndecan 4 heparan sulfate proteoglycan is a selectively enriched and widespread focal adhesion component*. *Molecular biology of the cell*, 1994. **5**(2): p. 183-192.
262. Beardsley, A., et al., *Loss of caveolin-1 polarity impedes endothelial cell polarization and directional movement*. *Journal of Biological Chemistry*, 2005. **280**(5): p. 3541-3547.
263. Børset, M., et al., *Syndecan-1 is targeted to the uropods of polarized myeloma cells where it promotes adhesion and sequesters heparin-binding proteins*. *Blood*, 2000. **96**(7): p. 2528-2536.
264. Fukami, K., et al., *alpha-Actinin and vinculin are PIP2-binding proteins involved in signaling by tyrosine kinase*. *Journal of Biological Chemistry*, 1994. **269**(2): p. 1518-1522.
265. Gilmore, A.P. and K. Burridge, *Regulation of vinculin binding to talin and actin by phosphatidyl-inositol-4-5-bisphosphate*. *Nature*, 1996. **381**(6582): p. 531-535.
266. Hsia, D.A., et al., *Differential regulation of cell motility and invasion by FAK*. *The Journal of cell biology*, 2003. **160**(5): p. 753-767.
267. Mukai, M., et al., *Sustained tyrosine-phosphorylation of FAK through Rho-dependent adhesion to fibronectin is essential for cancer cell migration*. *Anticancer research*, 2001. **22**(6A): p. 3175-3184.
268. Rathinam, R. and S.K. Alahari, *Important role of integrins in the cancer biology*. *Cancer and Metastasis Reviews*, 2010. **29**(1): p. 223-237.
269. Wilcox-Adelman, S.A., F. Denhez, and P.F. Goetinck, *Syndecan-4 modulates focal adhesion kinase phosphorylation*. *Journal of Biological Chemistry*, 2002. **277**(36): p. 32970-32977.
270. Chao, W.-T. and J. Kunz, *Focal adhesion disassembly requires clathrin-dependent endocytosis of integrins*. *FEBS letters*, 2009. **583**(8): p. 1337-1343.

271. Bass, M.D., et al., *A syndecan-4 hair trigger initiates wound healing through caveolin- and RhoG-regulated integrin endocytosis*. Dev Cell, 2011. **21**(4): p. 681-93.
272. Brabletz, T., et al., *Invasion and metastasis in colorectal cancer: epithelial-mesenchymal transition, mesenchymal-epithelial transition, stem cells and β -catenin*. Cells tissues organs, 2005. **179**(1-2): p. 56-65.
273. Dovas, A., A. Yoneda, and J.R. Couchman, *PKC α -dependent activation of RhoA by syndecan-4 during focal adhesion formation*. Journal of Cell Science, 2006. **119**(13): p. 2837-2846.
274. Mali, M., et al., *Sequence of human syndecan indicates a novel gene family of integral membrane proteoglycans*. Journal of Biological Chemistry, 1990. **265**(12): p. 6884-6889.
275. Endo, K., et al., *Cleavage of syndecan-1 by membrane type matrix metalloproteinase-1 stimulates cell migration*. Journal of Biological Chemistry, 2003. **278**(42): p. 40764-40770.
276. Salmivirta, M., J. Heino, and M. Jalkanen, *Basic fibroblast growth factor-syndecan complex at cell surface or immobilized to matrix promotes cell growth*. Journal of Biological Chemistry, 1992. **267**(25): p. 17606-17610.
277. Elenius, K., et al., *Binding of human syndecan to extracellular matrix proteins*. Journal of Biological Chemistry, 1990. **265**(29): p. 17837-17843.
278. Midwood, K.S., L.V. Williams, and J.E. Schwarzbauer, *Tissue repair and the dynamics of the extracellular matrix*. The international journal of biochemistry & cell biology, 2004. **36**(6): p. 1031-1037.
279. Beauvais, D.M. and A.C. Rapraeger, *Syndecan-1-mediated cell spreading requires signaling by α v β 3 integrins in human breast carcinoma cells*. Experimental cell research, 2003. **286**(2): p. 219-232.
280. Koyama, Y., et al., *Matrix metalloproteinase-9 associated with heparan sulphate chains of GPI-anchored cell surface proteoglycans mediates motility of murine colon adenocarcinoma cells*. Journal of biochemistry, 2008. **143**(5): p. 581-592.
281. Casey, R.C., et al., *Cell membrane glycosylation mediates the adhesion, migration, and invasion of ovarian carcinoma cells*. Clinical & experimental metastasis, 2003. **20**(2): p. 143-152.
282. Chalkiadaki, G., et al., *Fibroblast growth factor-2 modulates melanoma adhesion and migration through a syndecan-4-dependent mechanism*. The international journal of biochemistry & cell biology, 2009. **41**(6): p. 1323-1331.

283. O'Connell, M.P., et al., *Heparan sulfate proteoglycan modulation of Wnt5A signal transduction in metastatic melanoma cells*. Journal of Biological Chemistry, 2009. **284**(42): p. 28704-28712.
284. Nobes, C.D. and A. Hall, *Rho GTPases control polarity, protrusion, and adhesion during cell movement*. The Journal of cell biology, 1999. **144**(6): p. 1235-1244.
285. Nebreda, A., *p 38 MAP kinases beyond the stress response*. Trends Biochem. Sci., 2000. **25**: p. 257-260.
286. Weston, C.R. and R.J. Davis, *The JNK signal transduction pathway*. Current opinion in cell biology, 2007. **19**(2): p. 142-149.
287. Kyriakis, J.M. and J. Avruch, *Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation*. Physiological reviews, 2001. **81**(2): p. 807-869.
288. Karin, M. and E. Gallagher, *From JNK to pay dirt: jun kinases, their biochemistry, physiology and clinical importance*. IUBMB life, 2005. **57**(4-5): p. 283-295.
289. Zlobec, I. and A. Lugli, *Epithelial mesenchymal transition and tumor budding in aggressive colorectal cancer: tumor budding as oncotarget*. Oncotarget, 2010. **1**(7): p. 651-661.
290. Frisch, S.M. and H. Francis, *Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis*. J Cell Biol, 1994. **124**(4): p. 619-26.
291. Christofori, G., *Changing neighbours, changing behaviour: cell adhesion molecule-mediated signalling during tumour progression*. Embo j, 2003. **22**(10): p. 2318-23.
292. Frisch, S.M. and R.A. Screaton, *Anoikis mechanisms*. Curr Opin Cell Biol, 2001. **13**(5): p. 555-62.
293. Hour, M.J., et al., *Antitumor effects of the novel quinazolinone MJ-33: inhibition of metastasis through the MAPK, AKT, NF-kappaB and AP-1 signaling pathways in DU145 human prostate cancer cells*. Int J Oncol, 2012. **41**(4): p. 1513-9.
294. Lin, C.W., et al., *Kaempferol reduces matrix metalloproteinase-2 expression by down-regulating ERK1/2 and the activator protein-1 signaling pathways in oral cancer cells*. PLoS One, 2013. **8**(11): p. e80883.
295. Li, C., et al., *Inhibitory effects of kaempferol on the invasion of human breast carcinoma cells by downregulating the expression and activity of matrix metalloproteinase-9*. Biochem Cell Biol, 2015. **93**(1): p. 16-27.

296. Chen, H.J., et al., *Kaempferol suppresses cell metastasis via inhibition of the ERK-p38-JNK and AP-1 signaling pathways in U-2 OS human osteosarcoma cells*. *Oncol Rep*, 2013. **30**(2): p. 925-32.
297. Cho, S.M., et al., *Essential oil of Pinus koraiensis inhibits cell proliferation and migration via inhibition of p21-activated kinase 1 pathway in HCT116 colorectal cancer cells*. *BMC Complement Altern Med*, 2014. **14**: p. 275.
298. Deng, W., et al., *A Chinese herbal formula, Yi-Qi-Fu-Sheng, inhibits migration/invasion of colorectal cancer by down-regulating MMP-2/9 via inhibiting the activation of ERK/MAPK signaling pathways*. *BMC Complement Altern Med*, 2013. **13**: p. 65.
299. Han, S., et al., *Dexamethasone Inhibits TGF-beta1-induced Cell Migration by Regulating the ERK and AKT Pathways in Human Colon Cancer Cells Via CYR61*. *Cancer Res Treat*, 2015.
300. Chen, S., et al., *[Suppression of Kiss-1 gene inhibits HCT116 human colorectal carcinoma cell migration in vitro via nuclear factor-kappaB signaling pathway]*. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*, 2015. **35**(11): p. 1643-8.
301. Li, A.X., W.Q. Xin, and C.G. Ma, *Fentanyl inhibits the invasion and migration of colorectal cancer cells via inhibiting the negative regulation of Ets-1 on BANC1*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015. **465**(3): p. 594-600.
302. Xiao, R., C. Li, and B. Chai, *miRNA-144 suppresses proliferation and migration of colorectal cancer cells through GSPT1*. *Biomed Pharmacother*, 2015. **74**: p. 138-44.
303. Gu, Y., et al., *TUSC3 promotes colorectal cancer progression and epithelial-mesenchymal transition (EMT) through WNT/beta-catenin and MAPK signalling*. *J Pathol*, 2016. **239**(1): p. 60-71.
304. Kang, Y.J., et al., *Macrophage deletion of p38alpha partially impairs lipopolysaccharide-induced cellular activation*. *J Immunol*, 2008. **180**(7): p. 5075-82.
305. Kim, C., et al., *The kinase p38 alpha serves cell type-specific inflammatory functions in skin injury and coordinates pro- and anti-inflammatory gene expression*. *Nat Immunol*, 2008. **9**(9): p. 1019-27.
306. Cuadrado, A. and A.R. Nebreda, *Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling*. *Biochem J*, 2010. **429**(3): p. 403-17.
307. Elenitoba-Johnson, K.S., et al., *Involvement of multiple signaling pathways in follicular lymphoma transformation: p38-mitogen-activated protein kinase as a target for therapy*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(12): p. 7259-64.

308. Greenberg, A.K., et al., *Selective p38 activation in human non-small cell lung cancer*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2002. **26**(5): p. 558-64.
309. Iyoda, K., et al., *Involvement of the p38 mitogen-activated protein kinase cascade in hepatocellular carcinoma*. Cancer, 2003. **97**(12): p. 3017-3026.
310. Gupta, J., et al., *Pharmacological inhibition of p38 MAPK reduces tumor growth in patient-derived xenografts from colon tumors*. Oncotarget, 2015. **6**(11): p. 8539-51.
311. Gupta, J., et al., *Dual function of p38alpha MAPK in colon cancer: suppression of colitis-associated tumor initiation but requirement for cancer cell survival*. Cancer Cell, 2014. **25**(4): p. 484-500.
312. Xia, Z.X., et al., *CARMA3 regulates the invasion, migration, and apoptosis of non-small cell lung cancer cells by activating NF-small ka, CyrillicB and suppressing the P38 MAPK signaling pathway*. Exp Mol Pathol, 2015.
313. Zhou, H., et al., *AKT and JNK Signaling Pathways Increase the Metastatic Potential of Colorectal Cancer Cells by Altering Transgelin Expression*. Dig Dis Sci, 2016. **61**(4): p. 1091-7.
314. Ai, X., et al., *Targeting the ERK pathway reduces liver metastasis of Smad4-inactivated colorectal cancer*. Cancer Biol Ther, 2013. **14**(11): p. 1059-67.
315. Fu, H., et al., *TGF- β promotes invasion and metastasis of gastric cancer cells by increasing fascin1 expression via ERK and JNK signal pathways*. Acta biochimica et biophysica Sinica, 2009. **41**(8): p. 648-656.
316. Li, A., et al., *IL-8 directly enhanced endothelial cell survival, proliferation, and matrix metalloproteinases production and regulated angiogenesis*. The Journal of Immunology, 2003. **170**(6): p. 3369-3376.
317. Chen, Z., et al., *MAP kinases*. Chemical reviews, 2001. **101**(8): p. 2449-2476.
318. Dong, C., R.J. Davis, and R.A. Flavell, *MAP kinases in the immune response*. Annual review of immunology, 2002. **20**(1): p. 55-72.
319. Ishiguro, K., et al., *Syndecan-4 deficiency leads to high mortality of lipopolysaccharide-injected mice*. Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(50): p. 47483-47488.
320. Götte, M., *Syndecans in inflammation*. The FASEB Journal, 2003. **17**(6): p. 575-591.
321. Burridge, K. and M. Chrzanowska-Wodnicka, *Focal adhesions, contractility, and signaling*. Annual review of cell and developmental biology, 1996. **12**(1): p. 463-519.

322. Houston, M., et al., *Oxidized linoleic acid regulates expression and shedding of syndecan-4*. American Journal of Physiology-Cell Physiology, 2005. **288**(2): p. C458-C466.
323. Nikolova, V., et al., *Differential roles for membrane-bound and soluble syndecan-1 (CD138) in breast cancer progression*. Carcinogenesis, 2009: p. bgp001.

Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei allen Personen bedanken, die mich während der Durchführung des wissenschaftlichen sowie des schriftlichen Teils unterstützt und motiviert haben und mir mit ihrem breiten Hintergrundwissen jederzeit zur Seite standen.

Ganz besonderer Dank gilt dabei zunächst meiner Betreuerin Frau Prof. Dörthe Jechorek, welche nicht nur eine großartige Ideengeberin war, sondern während der ganzen Zeit auch immer ein offenes Ohr für Probleme und meist auch unmittelbar eine Lösung parat hatte. Gerade im Endspurt konnte sie mich trotz ihrer enormen beruflichen und familiären Verpflichtungen motivieren, der Arbeit den finalen Schliff zu verleihen. Das ist für mich nicht als selbstverständlich anzusehen und verdient meine Hochachtung.

Für die fachliche und persönliche Unterstützung vor allem bei Fragen rund um die Molekularbiologie danke ich Frau Dr. Sabine Franke, die mir oftmals Anregungen zum „um-die-Ecke-Denken“ gab.

Dann danke ich ganz herzlich all den Helferlein in den Laboratorien: allen voran den drei „Zellkultur-Damen“ Anja, Doreen und Kirsten, die jederzeit für gute Stimmung sorgten und mir eine Menge beibringen konnten, Frau Staeck für ihre Ruhe und Geduld beim Umgang mit Proben im zehntel Mikroliterbereich bei der PCR sowie Herrn Dr. Roland Hartig für die Expertise im Umgang mit der Videomikroskopie.

Meiner Familie danke ich für die stete Unterstützung und Ablenkung, wenn der Kopf mal wieder rauchte – und das nicht nur während der Erarbeitung und Verfassung dieser Dissertation. Großer Dank gilt besonders meiner Verlobten, die trotz aller zeitlichen Entbehrungen meinerseits immer mit einem Lächeln und einem vollen Kochtopf die Motivation erhalten konnte und mir beim Korrekturlesen viel Arbeit abgenommen hat.

Erklärung

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

**Die Funktion von Syndecan-1 und Syndecan-4 bei der epithelial-mesenchymalen
Transformation und Migration von Kolonkarzinomzellen und ihre Modulation durch
MAP-Kinasen**

im Institut für Pathologie

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

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

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

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

Magdeburg, den 09.06.2016

Sascha Ussat

Lebenslauf

■ Persönliche Daten

Name: Sascha Ussat
Familienstand ledig
Staatsangehörigkeit deutsch
Geburtsdaten: 30.Oktober 1984 in Lutherstadt Wittenberg

■ Schulbildung

1991 – 1995 Besuch der Grundschule am Trajuhnschen Bach in Wittenberg
1995 – 2004 Besuch des Martin-Luther-Gymnasiums in Wittenberg
Abschluss: Abitur

■ Ausbildung

2005 – 2011 Studium der Humanmedizin in Magdeburg
1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung Sommer 2007
2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung Oktober 2011

■ Promotion

Seit 03/2009 Experimentelle Doktorarbeit am Institut für Pathologie der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

■ ärztliche Tätigkeit

12/2011 – 04/2013 Assistenzarzt auf der chirurgischen Intensivstation der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Gefäßchirurgie, Universitätsklinikum Magdeburg
Seit 05/2013 Assistenzarzt in der Klinik für Anästhesiologie und Intensivtherapie, Universitätsklinikum Magdeburg

Magdeburg, den 09.06.2016

Sascha Ussat

Anlagen

Anlage I – Chemikalien, Kits und Geräte

Chemikalien:

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

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

Alle Chemikalien waren von handelsüblicher Reinheit.

Gebrauchsmaterialien:

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

Zellkulturflaschen	Nunc, Wiesbaden
Culture Insert	ibidi, Martinsried
Petrischalen BD Falcon™	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Reaktionsgefäße	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Pipetten (Kunststoff)	Greiner, Frickenhausen
Transwellchamber-Platten	Costar Corning

Kits:

Lipofectamine™2000 Transfektions-Kit	Invitrogen, Groningen, Niederlande
SYBR® Green Kit	Quantace, Berlin
peqGOLD TriFast™	peqLab, Erlangen
peqGOLD Taq-DNA-Polymerase Kit	peqLab, Erlangen
TOPO TA Cloning® Kit	Invitrogen, Karlsruhe
Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Sample Kit	Roche, Mannheim

Geräte:

Brutschrank	Heraeus, Hanau
Coulter Counter ZII Coulter	Immunotech, Marseille, Frankreich
Elektrophorese-Apparaturen	Eurogentec, Taufkirchen
LEICA TCS SP2 Konfokalmikroskop	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
LightCycler®	Roche, Mannheim
Olympus BH-2 Lichtmikroskop	Olympus Optical Co., Hamburg
Photometer	Eppendorf, Hamburg
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Schüttler	IKA Werke, Staufen
Spektralfluorometer SPECTRAMax GEMINI	Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, USA
Thermocycler	Biozym, Hamburg
Tischzentrifuge	Roth, Karlsruhe
Wasserbad	Hettich, Tuttlingen
Zentrifugen	Eppendorf, Hamburg

Weitere Reagenzien und Materialien:

HyperLadder IV	Bioline, Luckenwalde
----------------	----------------------

Anlage II - Reaktionsansatz Reverse Transkription:

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

Anlage III – Reaktionsansatz Real-time PCR:

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

Anlage IV – Tumorstadien des KRK nach UICC, TNM und Dukes

UICC-Stadium	Definition	TNM-System	Dukes
0	Carcinoma in situ	TIS N0 M0	
I	Ia Beschränkung auf Mukosa und Submukosa	T1 N0 M0	A
	Ib Infiltration Muscularis propria	T2 N0 M0	
II	Infiltration aller Wandschichten	T3 N0 M0	B
	Überschreitung der Darmwand	T4 N0 M0	
III	Regionale Lymphknoten oder Infiltration der Umgebung	TX N1-3 M0	C
IV	Fernmetastasen	TX NX M1	D

Tab. 6 Tumorstadien des KRK nach UICC, TNM und Dukes