



Chirurgische Klinik und Poliklinik am Klinikum rechts der Isar  
der Technischen Universität München  
(Direktor: Prof. Dr. H. Friess)

**Syndecan-3:  
Mediator der neuralen Invasion im Pankreaskarzinom**

Maciej Kazimierz Albiński

Vollständiger Abdruck der von der  
Fakultät für Medizin der Technischen Universität München  
zur Erlangung des akademischen Grades eines

**Doktors der Medizin (Dr. med.)**

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. E. J. Rummeny  
Prüfer der Dissertation: 1. Priv.-Doz. Dr. G. O. Ceyhan  
2. Prof. Dr. H. Friess

Die Dissertation wurde am 19.11.2015 bei der Technischen Universität München eingereicht  
und durch die Fakultät für Medizin am 19.10.2016 angenommen.



*Meinen Eltern*



## Zusammenfassung

Das Pankreaskarzinom gilt als eine der aggressivsten Krebsformen und ist durch eine ausgesprochen schlechte Prognose gekennzeichnet. Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung haben sich die Krebszellen häufig bereits über die Grenzen des Organs ausgebreitet. Die dichte Innervation der Bauchspeicheldrüse begünstigt den frühen Kontakt von Pankreaskarzinomzellen zu Neuronen und ihre Ausbreitung entlang der Nervenscheiden, die sogenannte neurale Invasion. Syndecane sind ubiquitäre Rezeptoren, die eine Interaktion von Zellen untereinander und mit Faktoren der extrazellulären Matrix ermöglichen. Im neuralen Gewebe ist von den vier Syndecanen hauptsächlich Syndecan-3 vorhanden. Es spielt im heranreifenden Nervensystem eine wegweisende Rolle in der Reifung und Ausrichtung von Nervenzellen. Zu den Wachstumsfaktoren, die über Syndecan-3 die Reifung des Nervensystems bewirken, gehören jene, die im Pankreas Wachstum und Ausbreitung der Krebszellen fördern. Bisherige Untersuchungen zeigen sowohl eine Zunahme dieser Wachstumsfaktoren, als auch eine Überexpression von Syndecan-3 im Pankreaskarzinom. Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wird der Einfluss von Syndecan-3 auf die neurale Invasion im Pankreaskarzinom erforscht. Dazu wurden Expression, Lokalisation und die Wirkung von Syndecan-3 auf biologische Funktionen von Pankreaskarzinomzellen in der neuralen Invasion untersucht. Die Überexpression von Syndecan-3 in Pankreaskarzinomzellen konnte bestätigt werden, fiel in den einzelnen Zelllinien jedoch unterschiedlich stark aus. Eine weitere Steigerung der Expressionsrate durch Plasmidtransfektion bewirkte eine aktive Sekretion des überflüssigen Syndecan-3 durch die Karzinomzellen. Die Lokalisation von Syndecan-3 in intrapankreatischen Nerven zeigte den engsten Bezug zu CD 34+ Zellen, die wahrscheinlich undifferenzierte Fibroblasten markieren. Die Korrelationsanalyse von Syndecan-3 mit neuralen Wachstumsfaktoren in der neuralen Invasion deutete auf eine direkte Interaktion hin. Zudem bewirkte die Zugabe der Faktoren ins Medium von Nervenzellen eine gezielte Ausrichtung von Syndecan-3 an der Membran. Die Inhibition von Syndecan-3 via spezifischer siRNA in Krebszellen wirkte sich nicht auf die Proliferation der Zellen aus. Lokomotion und Invasion der Krebszellen wurden jeweils nur geringfügig verändert. Den größten Einfluss jedoch erzielte die Inhibition von Syndecan-3 auf die Nerv-gerichtete Migration von Krebszellen. Euklidische Distanz, Geschwindigkeit und Linearität der Migration wurden nach Syndecan-3 Inhibition signifikant reduziert. Die molekulare Wirkung von Syndecan-3 in der Migration von Krebszellen wurde auf Ebene der intrazellulären Signalwege dargestellt. Durch Syndecan-3 Inhibition nahm die Rate von aktivierter Src-Kinase signifikant ab. Da Src über Cortactin auf das Aktinzytoskelett einwirkt, bedeutet dies in der Folge, dass die Inhibition des Membranrezeptors Syndecan-3 das Migrationspotential der Krebszellen in Richtung der Nerven reduziert. Zusammenfassend konnte die Rolle von Syndecan-3 in der neuralen Invasion im Pankreaskarzinom als Mediator zwischen Krebszellen und Neuronen aufgezeigt werden. Über die Vermittlung der Signale von neuralen Wachstumsfaktoren bewirkt Syndecan-3 eine Zunahme der gerichteten Migration von Krebszellen auf Nerven hin und spielt somit eine wichtige Rolle in der Interaktion von Krebszellen und Nerven im Pankreaskarzinom.



## Summary

Pancreatic cancer is one of the most aggressive cancer types displaying a dismal prognosis. Cancer cells are often spread across the organ's boundaries at the time of diagnosis. The dense innervation of the pancreas enables early contact of pancreatic cancer cells with neurons and spreading along the nerves' sheaths: the process of neural invasion. Syndecans represent ubiquitary receptors potentiating the interaction between cells and the extracellular matrix. Among the four types of Syndecans, Syndecan-3 is the major representative in neural tissue. It plays a pivotal role in maturation and focussing of neurons. The growth factors involved in Syndecan-3 mediated maturation of the nervous system include those very factors promoting growth and spreading of pancreatic cancer cells. Prior research demonstrates an increase of these growth factors as well as an overexpression of Syndecan-3 in pancreatic cancer. In this thesis, the role of Syndecan-3 in neural invasion in pancreatic cancer is investigated. Therefore, expression, localisation and impact of Syndecan-3 on biological functions of pancreatic cancer cells in neural invasion were analysed. Overexpression of Syndecan-3 in pancreatic cancer cells was confirmed. However the degree of activation varied among different cell lines. Further plasmid-induced increase of expression rate was limited by active secretion of excessive Syndecan-3 by the cells. Localisation of Syndecan-3 in intrapancreatic nerves revealed closest relation to CD 34+ cells, most likely representing undifferentiated fibroblasts. Correlation analysis of Syndecan-3 with neural growth factors in neural invasion pointed to a close interaction. Furthermore, adding these factors to neural cell medium prompted targeted alignment of Syndecan-3 on the cell membrane. Syndecan-3 knockdown via specific siRNA in pancreatic cancer cells did not influence proliferation. Locomotion and invasion varied marginally. Yet, nerve-targeted migration of cancer cells was decisively impaired. Euclidian distance, velocity and directionality of migration were significantly reduced after Syndecan-3 knockdown in cancer cells. The molecular impact of Syndecan-3 on cancer cell migration was demonstrated on the level of intracellular signalling pathways. Following Syndecan-3 knockdown, the rate of activated src tyrosine-kinase was significantly reduced. Since src acts via cortactin on the actin cytoskeleton, knockdown of the membrane receptor Syndecan-3 subsequently reduces the migratory potential of cancer cells towards neurons. Summing up, the role of Syndecan-3 as mediator of neural invasion in pancreatic cancer was demonstrated. Transferring the signals of neural growth factors, Syndecan-3 induces an increase of targeted cancer cell migration towards neurons and thus plays an important role in the neuro-cancer interaction of pancreatic cancer.





## Abkürzungsverzeichnis

ECM	Extrazelluläre Matrix
EGFR	Epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor
FGF	Fibroblasten Wachstumsfaktor
GAG	Glykosaminoglykan
GDNF	<i>Glial cell line-derived neurotrophic factor</i>
GFL	GDNF Ligandenfamilie
GFR	GDNF Rezeptor- $\alpha$
HRP	Meerrettichperoxidase ( <i>horseradish peroxidase</i> )
HSPG	Heparansulphat Proteoglykan
MMP	Matrix-Metalloproteinase
MTT	3-(4,5-methylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyl-Tetrazolium Bromid
NCAM	Neurales Zelladhäsionsmolekül
ns	nicht signifikant
NGF	Neuraler Wachstumsfaktor
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCC	Pankreaskarzinomzellen
PDAC	Pankreatisches Duktales Adenokarzinom
PNE	Perineurale Epithelzellen
PNS	Peripheres Nervensystem
Ret	<i>Rearranged during transformation</i> Rezeptortyrosinkinase
SDC-3	Syndecan-3
TGF	Transformierender Wachstumsfaktor
Trk	Tropomyosin Kinase
ZNS	Zentrales Nervensystem



# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Neurale Invasion im Pankreaskarzinom .....	2
1.2	Einfluss neuraler Wachstumsfaktoren auf die neurale Invasion im Pankreaskarzinom .....	3
1.3	Syndecane und ihre Bedeutung bei Tumorleiden .....	6
1.4	Syndecan-3 in neuralem Gewebe und Tumoren .....	8
1.5	Interaktion von Syndecan-3 und neuralen Wachstumsfaktoren .....	9
1.6	Expression von Syndecan-3 im Pankreaskarzinom .....	10
2	Ziele der Arbeit.....	13
3	Material und Methoden .....	15
3.1	Patientenproben und Chemikalien .....	15
3.2	Immunoblot der Syndecan-3 Expression in Pankreaskarzinomzellen.....	15
3.3	Enzymatischer Verdau von Syndecan-3 .....	16
3.4	Plasmidtransfektion zur Überexpression von Syndecan-3 .....	17
3.5	Immunzytochemie von Gewebe und Nervenzellen .....	17
3.6	Syndecan-3 spezifische siRNA.....	18
3.7	Untersuchung biologischer Funktionen von Pankreaskarzinomzellen.....	18
3.7.1	MTT-Ansatz .....	19
3.7.2	<i>Woundhealing</i> -Ansatz .....	19
3.7.3	Invasions-Ansatz .....	19
3.7.4	3D Neurale-Migration-Ansatz.....	20
3.8	Untersuchung intrazellulärer Signalwege .....	22
3.9	Statistische Auswertung.....	22
4	Ergebnisse.....	23
4.1	Expression von Syndecan-3 in Pankreaskarzinomzellen.....	23
4.1.1	Enzymatischer Verdau der Syndecan-3 Seitenäste .....	23
4.1.2	Basalexpression von Syndecan-3 in Pankreaskarzinomzellen .....	24
4.1.3	Sekretion von Syndecan-3 bei Überexpression .....	26
4.2	Immunolokalisation von Syndecan-3 in intrapancreatischen Nerven .....	27
4.3	Interaktion von Syndecan-3 mit neuralen Wachstumsfaktoren.....	29
4.4	Immunzytochemische Untersuchung von Nervenzellen .....	30
4.5	Funktionelle Analyse von Pankreaskarzinomzellen mit Syndecan-3 spezifischer siRNA .....	32
4.5.1	Anwendung von Syndecan-3 spezifischer siRNA.....	32
4.5.2	Einfluss von Syndecan-3 auf die Proliferation von Pankreaskarzinomzellen....	33
4.5.3	Einfluss von Syndecan-3 auf die Lokomotion von Pankreaskarzinomzellen ....	35

4.5.4	Einfluss von Syndecan-3 auf die ungerichtete Invasion von Pankreaskarzinomzellen .....	37
4.5.5	Einfluss von Syndecan-3 auf die Nerv-gerichtete Migration von Pankreaskarzinomzellen .....	38
4.6	Intrazelluläre Signalweiterleitung von Syndecan-3 .....	44
5	Diskussion.....	47
6	Schlussfolgerung.....	65
7	Literatur.....	67
8	Anhang.....	75
9	Abbildungsverzeichnis.....	85
10	Tabellenverzeichnis .....	86
11	Publikationen .....	87
12	Kongressbeiträge.....	87
13	Urheberrechte.....	88
14	Danksagung.....	89

# 1 Einleitung

Den Zahlen der *American Society of Cancer* für 2013 zufolge nimmt das Pankreaskarzinom immer noch eine Spitzenstellung unter den besonders aggressiven Krebserkrankungen ein (Siegel, Naishadham, & Jemal, 2013). Die Diagnose des Pankreaskarzinoms wird in 3% aller Krebsneuerkrankungen gestellt und rangiert somit bei Männern auf dem zehnten und bei Frauen auf dem neunten Rang unter allen Krebsformen (Siegel et al., 2013). Die Rate der Todesfälle hingegen erreicht mehr als das Doppelte dessen. Somit ist das Pankreaskarzinom mit einer der höchsten krebsbedingten Todesraten gekennzeichnet. Entgegen der allgemeinen Tendenz der Krebserkrankungen über die letzten Jahrzehnte, steigt die Inzidenz des Pankreaskarzinoms weltweit und liegt derzeit bei 13,6 pro 100.000 bei Männern und 10,5 pro 100.000 bei Frauen (Siegel et al., 2013). Bezeichnend für das Pankreaskarzinom ist die ausgesprochen schlechte Prognose mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von 6% (Siegel et al., 2013). Als gesicherte Risikofaktoren der Krankheit gelten Zigarettenrauch, Fettleibigkeit, Diabetes mellitus und chronische Pankreatitis. Zudem treten in bis zu 10% der Fälle hereditäre Karzinomformen auf, die von einem besonders schwerwiegenden Verlauf geprägt sind (Siegel et al., 2013).

90% der Tumoren im Pankreas entfallen auf das pankreatische duktales Adenokarzinom (PDAC) (Bornman & Beckingham, 2001). Das PDAC ist zum Zeitpunkt der Diagnosestellung oft schon weit fortgeschritten. Gerade einmal 15% der Fälle bei Erstdiagnose werden als operabel eingestuft (Bornman & Beckingham, 2001). Dieses spezielle Patienten-Kollektiv zeigt eine 5-Jahres-Überlebensrate von 10-15%, in seltenen Fällen von maximal 20-30% (Bornman & Beckingham, 2001). Nach chirurgischer Resektion liegt die mittlere Überlebensrate bei 18 Monaten, ohne Resektion und ohne Metastasen jedoch nur bei sechs Monaten (Bornman & Beckingham, 2001). Ein großes Problem in der Diagnostik des Tumors liegt in der unspezifischen und klinisch verhaltenen Symptomatik, die über lange Zeit selbst den Patienten unerkant bleibt. Sie manifestiert sich lediglich in Form von Missempfindungen im Oberbauch, gürtelförmigen Schmerzen und Gewichtsverlust.

Ausschlaggebend für die oft aussichtslose Situation ist die rasche Ausbreitung des Tumors in umliegendes Gewebe. Karzinome im Bereich des Pankreaskorpus und Schwanzes sind aufgrund der anatomischen Nähe zum Truncus coeliacus und der Arteria mesenterica superior frühzeitig von einer kurativen Operation ausgenommen. Das PDAC im Pankreaskopf hingegen tritt in der Regel durch deutlichere Symptome in Erscheinung. Hierzu zählen

Verschlussikterus, Gewichts- und Appetitverlust und ein erhöhtes Sättigungsgefühl durch mechanische Obstruktion vor allem bei fortgeschrittenen Tumoren.

Die bekannten Ausbreitungsformen des PDAC umfassen die hämatogene und lymphogene Metastasierung. Entsprechend des portalen Blutabflusses aus dem Pankreas bilden sich zunächst Metastasen in der Leber aus. Über den kavalen Abfluss erfolgen ein Befall der Lunge und eine peritoneale Aussaat. Die lymphogene Metastasierung umfasst regionäre Lymphknoten. Darüber hinaus weist das PDAC eine Besonderheit unter allen Tumorerkrankungen auf, die neurale Invasion durch Krebszellen. Bis auf das Prostatakarzinom und die Gruppe der Kopf-Hals Karzinome findet sich in keinem anderen Malignom eine derart ausgeprägte Dissemination von Krebszellen über die Nervenbahnen, welche Symptomatik, Verlauf und Heilungschancen der Krankheit so entscheidend beeinflusst (Bapat, Hostetter, Von Hoff, & Han, 2011; Demir et al., 2010; Liebig, Ayala, Wilks, Berger, & Albo, 2009).

## **1.1 Neurale Invasion im Pankreaskarzinom**

Die anatomische Lage des Pankreas im Retroperitoneum bedingt eine unmittelbare Nähe zu großen Bündeln des enterischen Nervensystems. Postmortale Untersuchungen von PDAC Patienten ergaben, dass in rund 80% der Fälle eine Invasion des umgebenden Nervengeflechts durch Krebszellen vorliegt (Demir et al., 2010). Diese richtet sich nach der Lokalisation des Tumors und umfasst Nervenbündel sowie die gefäßassoziierten Plexus. Neben dem extrapankreatischen Befall zeigt sich auch innerhalb des Krebsgewebes eine stark ausgeprägte intrapankreatische neurale Invasion. Unter den abdominalen Krebsformen nimmt das PDAC eine führende Rolle ein mit nahezu hundertprozentigem Auftreten von neuraler Invasion intrapankreatischer Nerven (Demir et al., 2010; Liebl et al., 2014)

Die Definition der neuralen Invasion ist bis heute umstritten (Liebig et al., 2009). Die Nervenbahnen im peripheren Nervensystem (PNS) werden in drei Schichten unterteilt. Das Epineurium aus Bindegewebe, Kollagen und Elastinfasern bildet die äußere Schicht und enthält die Vasa nervorum und die nerveigenen Lymphkanäle. Das darunter liegende Perineurium umgibt die einzelnen Faszikel und stellt eine hochselektive Barriere dar. Es bildet die Grundlage der Blut-Nerven-Schranke, der eine tragende Rolle in der Versorgung und zugleich dem Schutz der Nerven vor äußeren Einflussfaktoren zukommt. Die innerste Schicht, das Endoneurium liegt den Axonen und der umgebenden Glia direkt an. Der Begriff der neuralen Invasion bezieht sich auf einen Befall jeder der drei Schichten, auch unabhängig

voneinander (Liebig et al., 2009). Zudem wird von neuraler Invasion gesprochen, wenn die Krebszellen mehr als 33% des Nervenrandes infiltrieren. Der Befall von Nerven ermöglicht zum einen die Ausbreitung von Krebszellen im Perineurium entlang der Nervenscheiden. Pour et al. konnten zeigen, dass über diesen Weg selbst entfernte Lymphknotenstationen erreicht werden und neue Metastasen entstehen (Pour, Egami, & Takiyama, 1991). Zum anderen wird durch den direkten Einbruch von Krebszellen in das Endoneurium der Nerv geschädigt. Die betroffenen Nerven heben sich von gesunden Nerven durch Hypertrophie und erhöhte Dichte des Gewebes ab (Ceyhan, Bergmann, et al., 2009; Demir et al., 2010). Klinisch konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen endoneuraler Invasion und vermehrtem Schmerzempfinden nachgewiesen werden (Ceyhan, Bergmann, et al., 2009). Ferner wirkt sich die neurale Invasion auf das Überleben der Patienten aus. Die 5-Jahres-Überlebensrate in Fällen mit positiver neurale Invasion liegt bei 29% gegenüber 75% ohne Befall (Ozaki et al., 1999).

Um die faserreichen, kompakten Nervenscheiden zu überwinden, bedienen sich die Krebszellen der enzymatischen Wirkung von Matrix-Metalloproteinasen (MMP). Okada et al. zeigten, dass die Expression der MMP unter dem Einfluss von neuronalen Wachstumsfaktoren steigt. Krebszellen, denen neuraler Wachstumsfaktor (NGF) zugegeben wird, zeichnen sich durch eine erhöhte Expression von MMP und eine gesteigerte neurale Invasion aus (Okada et al., 2004). Eine ähnliche Rolle wurde für den Wachstumsfaktor *glial cell line-derived neurotrophic factor* (GDNF) nachgewiesen, der ebenfalls zu einem Anstieg an MMP im PDAC führt (Okada, Eibl, Duffy, Reber, & Hines, 2003). Erste Anwendungen einer gerichteten Therapie stammen aus Tiermodellen. In Mausmodellen kann durch den Einsatz von NGF-Antikörper das Wachstum des PDAC signifikant reduziert werden (Miknyoczki et al., 2002). Diese Ergebnisse unterstreichen die Bedeutung neuraler Wachstumsfaktoren für das PDAC.

## **1.2 Einfluss neuraler Wachstumsfaktoren auf die neurale Invasion im Pankreaskarzinom**

Entwicklung, Wachstum, Funktion und Überleben von Nerven werden durch neurale Wachstumsfaktoren gesteuert. Die heterogene Gruppe neuraler Wachstumsfaktoren umfasst primäre Faktoren des Nervensystems wie Neurotrophine oder Neurokine und externe Wachstumsfaktoren wie Fibroblasten Wachstumsfaktor (FGF), Hepatozyten Wachstumsfaktor und Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor. Auch Zytokine der

Transformierenden Wachstumsfaktor (TGF) Familie sind von großer Bedeutung für die Funktionsfähigkeit und Regeneration von geschädigten Nerven. Beide Superfamilien, TGF $\alpha$  und TGF $\beta$ , sind essentiell für das Überleben von Nerven.

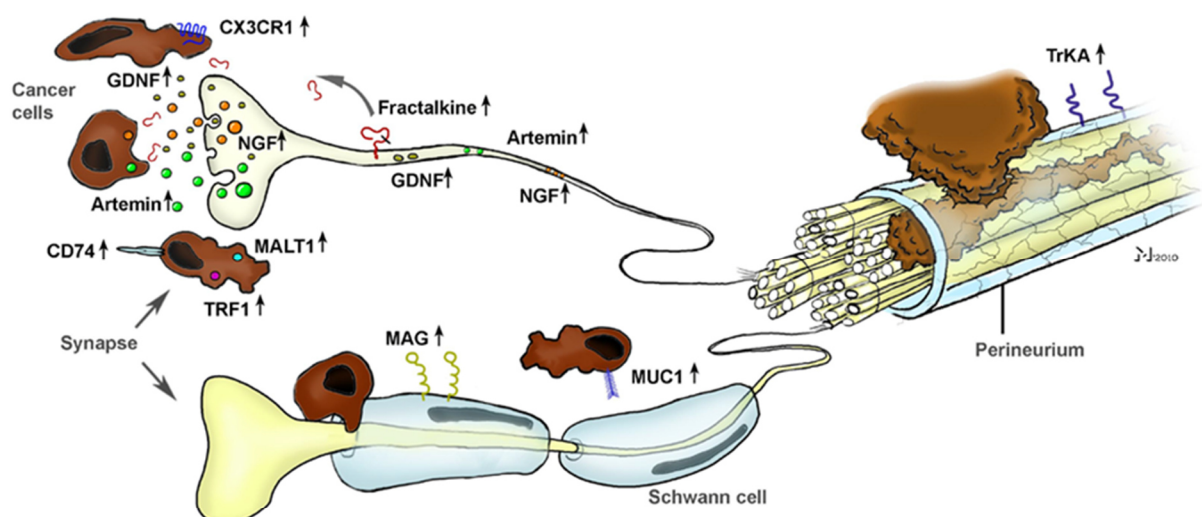
Eine besondere Stellung in der TGF $\beta$  Superfamilie nimmt die Familie der glialen Wachstumsfaktoren, die GDNF Ligandenfamilie (GFL) ein. Diese umfasst die Faktoren *glial cell line-derived neurotrophic factor* (GDNF), Neurturin, Artemin und Persephin und vermittelt ihre Signale, anders als TGF $\beta$ , über die Rezeptortyrosinkinase *rearranged during transformation* (Ret) (Saarma, 2000). Die Kopplung an Ret erfordert eine Bindung der GFL an den primären Rezeptor GFL Rezeptor  $\alpha$  (GFR $\alpha$ ). Die einzelnen GFL Faktoren verfügen über spezifische Rezeptoren: GDNF bindet an GFR $\alpha$ 1, Neurturin an GFR $\alpha$ 2, Artemin an GFR $\alpha$ 3 und Persephin an GFR $\alpha$ 4. Die Bedeutung der GFL für das Überleben von Nerven wird sichtbar an der Wirkung von GDNF. Ohne Bindung des Liganden wird durch Ret die Apoptose der Zelle induziert, ein Prozess, der in der Kombination von Ret und GFR $\alpha$  bei fehlendem GDNF sogar noch deutlich beschleunigt wird (Saarma, 2000). Ret vermittelt über intrazelluläre Signalkaskaden weitere Funktionen wie Differenzierung, Proliferation, Migration, Chemotaxis, Ausbildung von Dendriten und Plastizität der Synapse (Sariola & Saarma, 2003). Eine Signalvermittlung in die Zelle erfolgt jedoch auch in Abwesenheit von Ret. Mit geringer Affinität bindet GDNF an neurales Zelladhäsionsmolekül (NCAM) (Sariola & Saarma, 2003). Die Bindungsstärke steigt deutlich nach Anlagerung von GFR $\alpha$  an den Komplex. Analog zur Situation von Ret besteht für die Wirkung von NCAM eine Abhängigkeit von seinem Liganden. Durch alleinige Kombination von NCAM und GFR $\alpha$  in Abwesenheit von GDNF nimmt die Adhäsion der Zelle deutlich ab (Sariola & Saarma, 2003). Andererseits verfügt auch Ret über eine unabhängige Signalgebung von der GFL. Im zentralen Nervensystem (ZNS) wird das Protoonkogen durch die Interaktion des Neurotrophins NGF mit seinem Rezeptor Tropomyosin Kinase A (TrkA) aktiviert und unterhält Wachstum, Stoffwechsel und Funktion reifer Nerven (Tsui-Pierchala, Milbrandt, & Johnson, 2002).

Während im gesunden Pankreas GFL, NGF und Ret kaum nachgewiesen werden, steigt ihr Anteil im PDAC deutlich an (Abb. 1) (Ceyhan et al., 2006; Okada et al., 1999; Z. Zhu et al., 1999). NGF findet sich in Krebszellen, sein Rezeptor TrkA im Perineurium intrapancreatischer Nerven (Z. Zhu et al., 1999). Die Expression korreliert mit neuraler Invasion, Neuropathie und Schmerz. Zudem entwickeln Nerven, in denen die Expression von NGF und Artemin vermindert wurde, nach Zugabe von Krebszellüberständen eine ausgeprägte Hypertrophie (Ceyhan et al., 2010). Diese Ergebnisse deuten auf eine



entscheidende Rolle von Neurotrophinen und GFL in der Entwicklung der pankreatischen Neuropathie hin (Abb. 1). Für Artemin liegen bereits Ergebnisse vor, die zeigen dass Artemin zwar nicht mit Schmerz korreliert, jedoch die Invasion der Krebszellen um ein Vielfaches steigert (Ceyhan et al., 2006). In einem weiteren Schritt konnten diese Beobachtungen auf Neurturin ausgeweitet werden. Neurturin steigert die Invasivität der Krebszellen und bewirkt eine reziproke Ausrichtung von Nerven und Krebszellen aufeinander (Wang et al., 2014). Ähnliche Daten existieren für GDNF, das über die Expression von Integrinen die Invasion und Adhäsion von Krebszellen erhöht (Funahashi et al., 2005). Okada et al. zeigten, dass GDNF unabhängig von GFR $\alpha$  Ret aktiviert und so die neurale Invasion im PDAC fördert (Okada et al., 1999).

Die Signalvermittlung von GDNF erfordert neben den Rezeptoren GFR $\alpha$  und Ret die Anwesenheit von Glykosaminoglykanen (GAG) (Barnett, Fisher, Perona-Wright, & Davies, 2002). In embryonalen Nieren hindert eine Blockade von GAG tragenden Heparansulphat Proteoglykanen (HSPG) die weitere Entwicklung. Diese kann nur durch übermäßig hohe Zugaben von externem GDNF aufrechterhalten werden (Barnett et al., 2002). Die Interaktion von NGF mit Heparansulphat und HSPG ist in neuronalen Krebsformen beschrieben worden. Im Phäochromozytom interagieren Heparansulphate mit NGF in der Differenzierung und Sprossung von Nerven (Margolis, Salton, & Margolis, 1987). NGF wiederum induziert die Hypersulphatierung und Hypersekretion von HSPG im Neuroblastom (Leveugle, Ding, Buee, & Fillit, 1995).



### Abbildung 1: Die Bedeutung neuraler Faktoren für das Pankreaskarzinom

Die neurale Invasion intrapancreatischer Nerven durch Pankreaskarzinomzellen wird durch die Überexpression einer Vielzahl von Faktoren induziert, darunter NGF, die GFL Faktoren GDNF und Artemin, sowie Neurturin, das hier nicht dargestellt ist. Abb. nach Demir (Demir et al., 2010).

### 1.3 Syndecane und ihre Bedeutung bei Tumorleiden

Syndecane sind ubiquitär vorhandene HSPG, die die Kommunikation der Zellen untereinander, mit der extrazellulären Matrix (ECM) und mit externen Liganden ermöglichen (Tkachenko, Rhodes, & Simons, 2005). Die vier Syndecane werden in unterschiedlichen Gewebearten exprimiert: Syndecan-1 findet sich auf Fibroblasten und Epithel, Syndecan-2 in Endothel, Nerven und Fibroblasten, Syndecan-3 in Nerven, Chondrozyten und in neonatalem Gewebe, Syndecan-4 in Epithel und Fibroblasten. Ihre Lokalisation an der Zelloberfläche und ihre transmembranäre Struktur ermöglichen den Kontakt der Zelle mit der ECM und eine Überleitung von Signalen ins Zytoplasma.

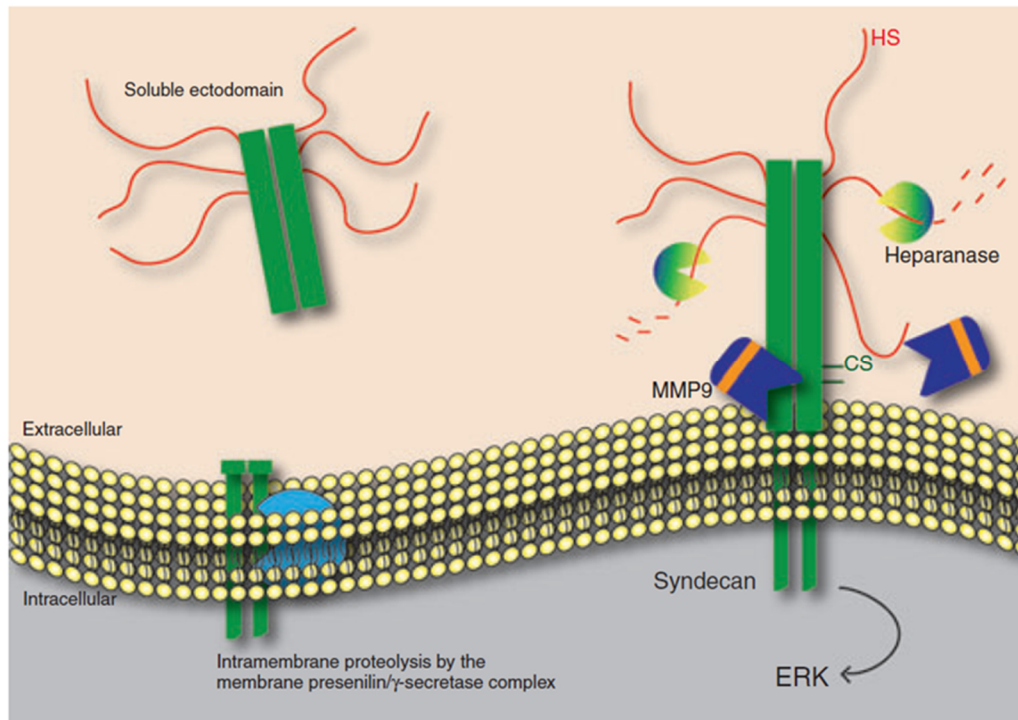
Syndecane verfügen über eine variable extrazelluläre Domäne, die GAG enthält und über diese eine Vielzahl an Faktoren bindet. Die Mehrheit der GAG besteht aus den namensgebenden Heparansulphaten, daneben werden auch Chondroitinsulphate eingebaut. Der Abbau von Syndecanen, das *Shedding*, bezeichnet die Abtrennung der extrazellulären Domäne von der Zelloberfläche (Abb. 2) (Choi, Lee, Choi, & Oh, 2010). Dieser Prozess dient unter anderem der Regulation der Ligandenbindung. Die Membran-nahen, ersten vier Aminosäuren der extrazellulären Domäne sowie der transmembranäre Bereich sind konserviert, ebenso die flankierenden Bereiche der zytoplasmatische Domäne (Lambaerts, Wilcox-Adelman, & Zimmermann, 2009). Die Syndecane unterscheiden sich somit hauptsächlich in der variablen extrazellulären Domäne, die unterschiedliche Liganden bindet, sowie in einer kurzen Sequenz der zytoplasmatische Domäne, die den Signalweg in der Zelle bestimmt. Der transmembranäre Bereich verankert Syndecane an der Zelloberfläche (Tkachenko et al., 2005). Das ermöglicht die Anlagerung mehrerer Proteine zu Homo- sowie Heteromultimeren, die durch eine erhöhte physikalische Resistenz gekennzeichnet sind (Lambaerts et al., 2009). Nach Bindung der Liganden und Oligomerisierung werden Syndecane vermutlich in Form der Makropinozytose in das Zelllumen eingeschleust (Lambaerts et al., 2009). Innerhalb dieser Vesikel kommt es zur Signalvermittlung über die in das Plasma ragende zytoplasmatische Domäne. So bewirkt beispielsweise Syndecan-2 in Nerven über die Proteinkinase A die Bildung von Dendriten, während Syndecan-4 in Melanomzellen über die Proteinkinase C eine gesteigerte Migration vermittelt (Lambaerts et al., 2009).

Durch ihre Einbeziehung in wesentliche Prozesse der Tumorgenese, wie Adhäsion, Migration und Wachstum, werden Syndecane zunehmend als einflussreiche Mediatoren in der Entwicklung von Neoplasien betrachtet (Beauvais & Rapraeger, 2004; Iozzo & Sanderson, 2011). Die meisten Untersuchungen hierzu liegen für Syndecan-1 vor. In Epithelzellen

bewirkt Syndecan-1 die Adhäsion der Zellen an die ECM (Iozzo & Sanderson, 2011). Durch seine Abtrennung von der Zelloberfläche sinkt die Adhäsion, was die Lösung von Krebszellen aus dem Zellverbund ermöglicht und dadurch die Aggressivität von Tumoren steigert. Im Multiplen Myelom wird dieser Schritt aktiv durch den Tumor induziert: erhöhte Expression von Heparinase begünstigt das *Shedding* von Syndecan-1 durch MMP (Choi et al., 2010). Die Wirkung von Syndecan-1 auf Malignome weist aber große Unterschiede auf. Daten aus dem Mammakarzinom zeigen, dass der tumorfördernde Effekt von Syndecanen nicht nur Organ-, sondern sogar Zelllinien-abhängig ist (Lambaerts et al., 2009). In der Brustkrebszelllinie MCF7 erhöht gebundenes Syndecan-1 die Proliferation, während durch *Shedding* gelöstes Syndecan-1 die Invasion der Zellen steigert. Eine mögliche Ursache dieser Wirkung ist die Fähigkeit von Syndecanen, im gelösten Zustand Wachstumsfaktoren und andere Liganden zu akkumulieren und dadurch einen chemotaktischen Gradienten für die umgebenden Zellen zu entwickeln. Wie spezifisch dieser Effekt ist, wird durch Untersuchungen an T47D Brustkrebszellen deutlich, in denen das *Shedding* nicht die Invasion, sondern die Proliferation der Zellen fördert. Auch im Stroma begünstigt Syndecan-1 die Entwicklung der Krebszellen und fördert Wachstum und Angiogenese (Lambaerts et al., 2009). Ebenso wird Syndecan-1 eine wichtige Rolle in der Entstehung und Aktivierung von Krebsvorläuferzellen zugeschrieben (Iozzo & Sanderson, 2011). Das PDAC gehört zu den Malignomen, die eine Zunahme von Syndecan-1 zeigen (Conejo et al., 2000). Verglichen mit dem gesunden Organ, aber auch mit anderen gastrointestinalen Tumoren, steigt die Expression von Syndecan-1 während der Karzinogenese im Pankreas deutlich an.

Syndecan-2 reguliert die Organisation des Aktinzytoskeletts und induziert dadurch die Ausbildung von Zellausläufern und die Migration von Krebszellen (Iozzo & Sanderson, 2011). Hohe Expressionsraten von Syndecan-2 werden in Karzinomen unterschiedlichen Ursprungs gefunden, im Abdomen insbesondere im kolorektalen Karzinom, wo Syndecan-2 Entstehung, Überleben und Metastasierung beeinflusst. Zudem reguliert Syndecan-2 die Gefäßversorgung in Tumoren (Iozzo & Sanderson, 2011). Erhöhte Werte von Syndecan-2 finden sich auch im PDAC, wo ein Invasions-fördernder Effekt gezeigt wurde (De Oliveira et al., 2012).

Syndecan-4 hingegen zeigt ein ähnliches Wirkungsprofil zu Syndecan-1. Es erhöht durch Bindung von Wachstumsfaktoren wie FGF die Adhäsion und limitiert somit die Invasion. Jedoch kann in Abhängigkeit von intrazellulären Signalwegen, etwa Wnt, auch die Invasionsfähigkeit der Zellen durch Syndecan-4 gesteigert werden (Iozzo & Sanderson, 2011).



### Abbildung 2: *Shedding* von Syndecanen

Im *Shedding* wird die extrazelluläre Domäne von Syndecan durch MMP abgetrennt und diffundiert als löslicher Teil in die ECM. Durch Verdau der Seitenketten wird das *Shedding* gesteigert. Der verbliebene intrazelluläre Teil wird proteolytisch aufgelöst.

CS = Chondroitin-Sulphat

HS = Heparan-Sulphat

MMP = Matrix-Metalloproteinasen

Abb. nach Manon-Jensen (Manon-Jensen, Itoh, & Couchman, 2010).

## 1.4 Syndecan-3 in neuralem Gewebe und Tumoren

Im gesunden Organismus wird Syndecan-3 nahezu ausschließlich in Nerven und dem muskuloskelettalen System exprimiert (Tkachenko et al., 2005). Eine wichtige Rolle kommt dem Rezeptor in der Entwicklung und Reifung von Gewebe zu. So findet sich Syndecan-3 in großen Mengen im heranreifenden Nervensystem (Tkachenko et al., 2005). Im ZNS steigt der Gehalt von Syndecan-3 während der Differenzierung von Oligodendrozyten und der Ausbildung der Myelinscheiden. Tiermodelle mit Inhibition von Syndecan-3 zeigen, dass die Tiere gesund und fruchtbar sind, aber große Defizite im Futterverhalten aufweisen (Tkachenko et al., 2005). Außerdem zeigen sie Leistungsstörungen bei Aufgaben, die den Hippocampus umfassen, was auf abnormales Lernverhalten und Gedächtnisfunktion hindeutet (Tkachenko et al., 2005). Mehrere Wachstumsfaktoren binden an Syndecan-3, darunter

Pleiotrophin, das als primärer Ligand identifiziert wurde (Raulo, Chernousov, Carey, Nolo, & Rauvala, 1994). Die Interaktion von Syndecan-3 mit Wachstumsfaktoren induziert eine Kaskade an intrazellulären Signalwegen über Src und Cortactin zum Aktinzytoskelett, die das Auswachsen von Nerven reguliert (T. Kinnunen et al., 1998).

Die Inhibition von Syndecan-3 in den Nerven bewirkt eine verzögerte Migration, die in einer geringen Nervendichte an der Gehirnoberfläche sichtbar wird (Hienola, Tumova, Kuleskiy, & Rauvala, 2006). Nach Bindung von Pleiotrophin zeigt Syndecan-3 im Nervensystem eine Interaktion mit epidermalem Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR). Da die Signalkaskade von EGFR durch aktives Src retrograd potenziert wird, ist neben der extrazellulären Stabilisierung des EGFR-Rezeptorkomplexes durch Syndecan-3 eine gemeinsame intrazelluläre Wirkung in der Aktivierung von Src durch Syndecan-3 wahrscheinlich (Hienola et al., 2006). Beide Interaktionen, extra- und intrazellulär, fördern die Migration von Neuronen.

In Tumoren steht Syndecan-3 in engem Bezug zur neuralen Invasion. Als Rezeptor von Midkin steigert Syndecan-3 im Pankreas die neurale Invasion und erhöht somit die Aggressivität des PDAC (Yao, Li, Li, Feng, & Gao, 2014). Weitere Beobachtungen liegen bislang nur aus dem Brustkrebs und Prostatakarzinom vor. Im Mammakarzinom ist die neurale Invasion jedoch ein selten beobachtetes Phänomen (Karak, Quatrano, Buckley, & Ricci, 2010). Passend dazu konnte für Syndecan-3 keine Bedeutung als prognostischer Marker gezeigt werden (Wu et al., 2013). Das Prostatakarzinom hingegen zeigt eine der höchsten Raten an neuraler Invasion sowie hohe Expression von neuralen Wachstumsfaktoren (Liebig et al., 2009). Entsprechend fördert Syndecan-3 über die Bindung seines Liganden Pleiotrophin die Migration der Krebszellen im Prostatakarzinom (Diamantopoulou, Kitsou, Menashi, Courty, & Katsoris, 2012).

## **1.5 Interaktion von Syndecan-3 und neuralen Wachstumsfaktoren**

Der erste Nachweis einer direkten Interaktion von Wachstumsfaktoren mit Syndecan-3 wurde im Nervensystem erbracht. Besselov et al. zeigten, dass das HSPG als alternativer Rezeptor der GFL Faktoren GDNF, Artemin und Neurturin dient (Besselov et al., 2011). Während lösliche GFL Faktoren ihre Signale über die primären Rezeptoren GFR $\alpha$  vermitteln, binden an Matrix fixierte Liganden an Syndecan-3. Die Bindungsaffinität der GFL an Syndecan-3 ist ähnlich stark ausgeprägt wie die Kopplung von Syndecan-3 an Pleiotrophin. Die Autoren schlossen daraus, dass Syndecan-3 in der Entwicklung des Nervensystems einen natürlichen Bindungspartner für die GFL darstellt. Zugleich kann ein Syndecan-3 Molekül über GAG

zugleich mehrere GFL Faktoren binden. Im Gegensatz zu den üblichen Rezeptoren der GFL stellt Syndecan-3 somit einen Rezeptor mit hoher Affinität und hoher Kapazität dar (Bespalov et al., 2011).

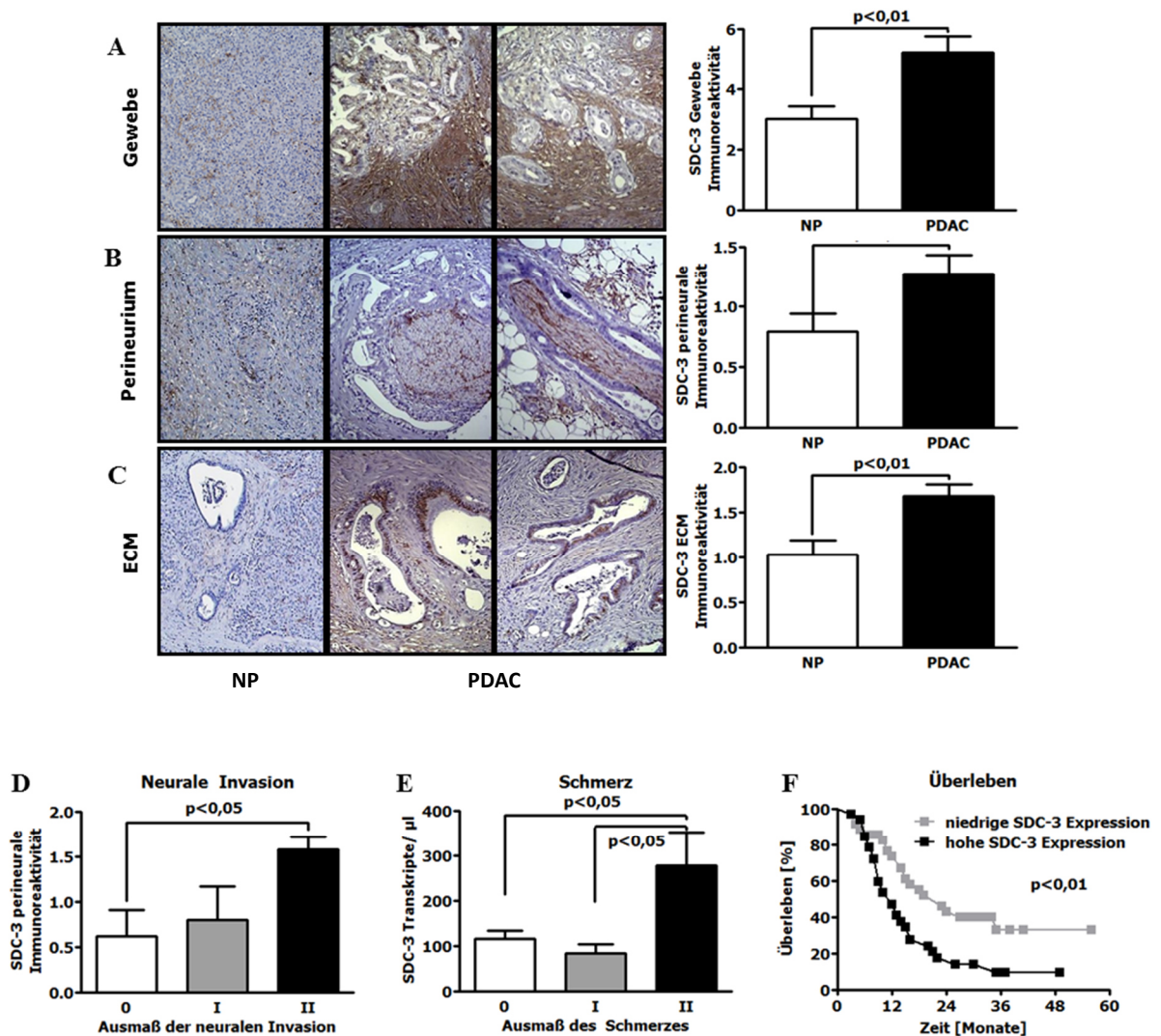
Ein weiteres, wesentliches Kennzeichen, das Syndecan-3 unabhängig von den  $GFR\alpha$  erscheinen lässt, ist seine Fähigkeit zur eigenständigen Signalweiterleitung über Src in das Zellplasma (Bespalov et al., 2011). Dadurch agiert Syndecan-3 neben den primären Rezeptoren der GFL selbstständig in der Vermittlung von Adhäsion und Migration der Nerven. Analysen des heranreifenden Gehirns ergaben, dass Syndecan-3 in den Hauptmigrationsrouten der Nerven ausgebildet ist (Bespalov et al., 2011; Hienola et al., 2006). Die Migration von Neuronen zeigt eine Unabhängigkeit von Ret und NCAM. Auch die Bindung von GDNF an Syndecan-3 kann in Abwesenheit von Ret und NCAM erfolgen. Da GDNF durch seine chemoattraktive Funktion die Migration der Nerven steuert, ist eine Übermittlung der Signale durch Syndecan-3 sehr wahrscheinlich (Bespalov et al., 2011). Die Inhibition von Syndecan-3 induziert einen sehr ähnlichen Phänotyp des Gehirns wie die Inhibition von GDNF (Bespalov et al., 2011). Syndecan-3 erscheint somit im Nervensystem unverzichtbar für die Signalgebung der GFL. Die im *Shedding* abgetrennte Ektodomäne ermöglicht eine Akkumulation und Konzentration der gelösten Liganden an den primären Rezeptoren  $GFR\alpha$ -Ret und  $GFR\alpha$ -NCAM. Fixierte GFL Faktoren hingegen geben ihre Signale über Syndecan-3 direkt in das Zellplasma ab (Bespalov et al., 2011).

Für das Neurotrophin *brain-derived neurotrophic factor* konnte keine Interaktion mit Syndecan-3 gezeigt werden (Bespalov et al., 2011). Bisher gibt es keine Untersuchungen zu Interaktionen zwischen NGF und Syndecan-3. Die einzigen vorhandenen Daten stammen ebenfalls aus dem heranreifenden Nervensystem und zeigen, dass Syndecan-3 in der ersten postnatalen Woche essentiell für das Überleben der Zellen ist (Paveliev et al., 2008). Nach Inhibition von Syndecan-3 kann der Untergang der Nervenzellen durch die Zugabe von NGF nicht verhindert werden. Eine mögliche Erklärung, die auf die allgemein vermutete Wechselwirkung von NGF mit Syndecan-3 hinweisen würde, ist eine abgeschwächte oder aufgehobene Signalübermittlung von NGF in Abwesenheit von Syndecan-3.

## **1.6 Expression von Syndecan-3 im Pankreaskarzinom**

Unsere Forschungsgruppe konnte zeigen, dass Syndecan-3 eine erhöhte Expression im Gewebe des PDAC gegenüber dem gesunden Gewebe aufweist (Tardio, 2008). Besonders ausgeprägt war die Expression von Syndecan-3 in Pankreaskarzinomzellen, der ECM und in

intrapankreatischen Nerven, darunter vor allem im Perineurium (Abb. 3 A-C). Die hohen Werte korrelierten mit dem Ausmaß an neuraler Invasion, Schmerz und Überleben (Abb. 3 D-F).



### Abbildung 3: Syndecan-3 Expression im Gewebe des PDAC

Im Vergleich zum gesunden Pankreas ist Syndecan-3 im PDAC-Gewebe überexprimiert (A), insbesondere in Pankreaskarzinomzellen, dem Perineurium (B) und der ECM (C) und korreliert mit dem Ausmaß an neuraler Invasion (D), Schmerz (E) und Überleben (F).

NP = normales Pankreas

Abb. nach Tardio (Tardio, 2008).





## **2 Ziele der Arbeit**

Ziel dieser Dissertation ist es, den Einfluss von Syndecan-3 auf die neurale Invasion im Pankreaskarzinom zu untersuchen.

Es soll überprüft werden, ob die Expression von Syndecan-3 in Pankreaskarzinomzellen die neurale Invasion fördert und somit einen eigenständigen Risikofaktor für die rasche Ausbreitung der Krebszellen und die daraus folgende ungünstige Prognose des Pankreaskarzinoms darstellt.

Um diese Hypothese zu testen, werden:

- 1) die Expression von Syndecan-3 in Pankreaskarzinomzellen,
- 2) die Lokalisation von Syndecan-3 in intrapancreatischen Nerven,
- 3) der Bezug zu neuronalen Wachstumsfaktoren,
- 4) die Bedeutung von Syndecan-3 für biologische Funktionen der Krebszellen,
- 5) der Einfluss von Syndecan-3 auf intrazelluläre Signalwege untersucht.

Die Experimente wurden an humanen Gewebepräparaten und isolierten Krebszellen durchgeführt. Die Interaktion mit neuralem Gewebe wurde anhand von Spinalganglien aus neugeborenen Ratten analysiert.



### **3 Material und Methoden**

Folgende Versuche im Labor wurden zur Überprüfung der Hypothese angewandt:

- Expression von Syndecan-3 im *Immunoblot* von Pankreaskarzinomzellen,
- Lokalisation von Syndecan-3 in der Immunzytochemie intrapankreatischer Nerven,
- Bezug von Syndecan-3 zu neuronalen Wachstumsfaktoren in der Immunzytochemie von dorsalen Spinalganglien aus neugeborenen Ratten,
- Einfluss der Syndecan-3 Inhibition mittels spezifischer siRNA in Pankreaskarzinomzellen auf Proliferation, Lokomotion, Invasion und Nerv-gerichtete Migration in jeweils eigenen Funktionsansätzen,
- Einfluss der Syndecan-3 Inhibition mittels spezifischer siRNA in Pankreaskarzinomzellen auf intrazelluläre Signalwege im *Immunoblot*.

Die angewandten Methoden werden im Text sowie im Anhang IV als Algorithmen dargestellt.

#### **3.1 Patientenproben und Chemikalien**

Gewebeproben aus dem Pankreaskopfkarcinom von 65 Patienten der Universität Heidelberg und der Technischen Universität München wurden nach Resektion gesammelt (33 männlich, 32 weiblich; mittleres Alter 64 Jahre). Der UICC-Klassifikation von 2010 zufolge entsprachen 14 der Organproben Grad IIa und 51 Grad IIb. Das Grading war überwiegend „schlecht differenziert“ oder „undifferenziert“. Proben aus normalem Pankreasgewebe stammten von 21 gesunden Organspendern (13 männlich, 8 weiblich; mittleres Alter 39 Jahre) unter der Voraussetzung, dass kein geeigneter Empfänger gefunden wurde. Alle Patienten wurden aufgeklärt und stimmten der Sammlung von Gewebe schriftlich zu. Die Studie wurde von den Ethikkommissionen der Universität Heidelberg und der Technischen Universität München genehmigt.

Eine detaillierte Darstellung der angewandten Chemikalien findet sich im Anhang I, der verwendeten Medien und Puffer mit ihrer Zusammensetzung im Anhang II, und der eingesetzten Antikörper und ihrer Verdünnungen im Anhang III.

#### **3.2 Immunoblot der Syndecan-3 Expression in Pankreaskarzinomzellen**

Acht humane Pankreaskarzinomzell-Linien (Aspc1, BxPc3, Capan1, Colo-357, MiaPaCa2, Panc1, SU86.86, und T3M4) wurden bei ATCC (Rockville, USA) erworben und in

Zellkulturmedium bei 37°C unter feuchten Bedingungen (gesättigt mit 5% CO<sub>2</sub>) inkubiert. Zur Analyse wurden die Pankreaskarzinomzellen mit RIPA Puffer lysiert, der einen Proteinase-Inhibitor und Phosphatase-Inhibitor enthielt. Die Proteinkonzentration wurde in einem UV Spektrometer bestimmt. Je 30µg der Proben wurden mit destilliertem Wasser ad 20µl ergänzt und durch 20% LSB-Puffer farblich markiert. Nach fünf Minuten Erhitzung auf 95°C und anschließender fünfminütiger Kühlung in Eis, wurden die Proben in ein 7,5% SDS-Polyacrylamid-Trenngel eingesetzt. Die Gelelektrophorese bei 25mA erfolgte zur Auftrennung der Proteinbanden entsprechend ihres molekularen Gewichts. Anschließend wurden die Proteinbanden auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran übertragen. Die Membran wurde zunächst für drei Minuten in 100% Ethanol äquilibriert und in Anode2-Puffer gelagert. Zum semi-trockenen *Immunoblot* wurde das Gel auf die Membran zwischen Whatman-Papieren gelagert mit Anode1-, Anode2- und Kathode-Puffer und über 1,5 Stunden bei 0,8mA/cm<sup>2</sup> übertragen. Das Blocken unspezifischer Bindungen auf der Membran erfolgte mit 5% Milch in phosphatgepufferter Salzlösung mit 0,1% Tween 20 („Milch/PBST“) über 1 Stunde bei Raumtemperatur. Die Membranen wurden mit in „Milch/PBST“ gelösten Syndecan-3 Antikörpern bedeckt und bei 4°C über Nacht inkubiert. Nach Waschen mit „Milch/PBST“ wurden auf die Membranen die in „Milch/PBST“ gelösten HRP-Zweitantikörper aufgetragen und bei Raumtemperatur über 45 Minuten inkubiert. Nach erneutem Waschen mit „Milch/PBST“ und Spülen mit PBST wurden die Proteinbanden auf den Membranen mit Chemilumineszenz visualisiert. Das Prozedere zur Ladungskontrolle mit GAPDH wurde analog durchgeführt. Die gemessenen Signale wurde mittels Densitometrie in der ImageJ Software (Wayne Rasband version 1.45S, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland) erfasst und als mehrfacher Intensitätsanstieg über dem Hintergrund dargestellt.

### **3.3 Enzymatischer Verdau von Syndecan-3**

Der Verdau zur molekularen Analyse der Syndecan-3 Struktur in Pankreaskarzinomzellen wurde mit Harnstoff, Heparinase und Chondroitinase durchgeführt. 100µg der Zelllysate aus AsPc-1, Colo-357, Panc-1, SU86.86 und T3M4 wurden zunächst unter Gabe von 12mol/l Harnstoff in Natriumacetat im Verhältnis 1:1 denaturiert. Unter Erhitzung auf 42°C wurden die Lysate in zwei Blöcken von je 30 Minuten mit Heparinase in einer Verdünnung von 1:100 in bovinem Serum Albumin 0,01% verdaut. In zwei weiteren Erhitzungen auf 37°C wurde analog Chondroitinase in einer Verdünnung von 1:10 angewandt. Die Lysate wurden nach Bestimmung der Proteinkonzentration in die *Immunoblot* Analyse eingesetzt.

### **3.4 Plasmidtransfektion zur Überexpression von Syndecan-3**

Zur Überexpression von Syndecan-3 wurde ein virales Plasmid in *Escherichia coli* Bakterien gezüchtet. Dazu wurde ein genetisch hergestelltes Plasmid im Puc-19 Vektor mittels SOC *Outgrowth* Medium in NEB Turbo *Competent E. coli* transformiert und repliziert. Die Isolation aus der bakteriellen DNA erfolgte im Doppelverdau mit den Restriktionsenzymen EcoRI und XhoI. Unter mehreren Klonen wurde das wirksamste Plasmid durch PCR selektiert. Nach Zentrifugation der Bakterien wurde das Plasmid mittels Mini-Prep isoliert. Zur Transfektion wurden  $5 \cdot 10^5$  Pankreaskarzinomzellen ausgesät. Als Transfektionsreagenz diente Exgen 500. Der optimale Zeitpunkt der Syndecan-3 Überexpression nach Transfektion wurde mittels PCR in einer Zeitreihe von 0 bis 96 Stunden bestimmt. Diese ergab ein Intervall von 72 Stunden nach Transfektion als besonders wirksam. Zu diesem Zeitpunkt wurden die Zellen lysiert und die Expression von Syndecan-3 im *Immunoblot* ausgewertet.

### **3.5 Immunzytochemie von Gewebe und Nervenzellen**

Gewebeschnitte aus normalem Pankreas und PDAC wurden durch dreimal zehnteilige Lagerung in Rotoclear entparaffinisiert und in einer absteigenden Ethanol-Reihe rehydriert. Anschließend wurden die Präparate für fünf Minuten mit PBS und 0,1% Triton X-100 permeabilisiert. Unspezifische Bindungsstellen wurden mit Ziegen Serum blockiert. Die Schnitte wurden über Nacht bei 4°C mit den Erstantikörpern (beta-III Tubulin, p75, Vimentin, Syndecan-3, Glut1, S100, CD34), den Alexa-Zweitantikörpern mit grüner (488nm) und roter (594nm) Fluoreszenz sowie mit DAPI inkubiert. Kaninchen polyklonale und Maus monoklonale IgG dienten als Negativkontrollen.

Die Interaktion von Syndecan-3 mit neuronalen Wachstumsfaktoren wurde mittels Immunzytochemie von Nervenzellen untersucht. Dazu wurden Neuronen aus Spinalganglien neugeborener Wistar Ratten isoliert. Nach Enthauptung der Tiere wurden die Spinalganglien nach einer vorderen Laminektomie und stereomikroskopischer Dissektion aus der gesamten Spinalregion isoliert. Durch wiederholte, aufeinanderfolgende Aspiration in 20- und 23-Gauge Nadeln wurden die Spinalganglien mechanisch dissoziiert. Auf 13mm Deckgläsern, die mit 40 mg/m<sup>2</sup> Poly-D-Lysin beschichtet waren, wurden 10000 Nervenzellen in einer 24-Loch-Platte (NUNC, Langenselbold, Deutschland) ausgesät. Die Zellen ruhten für 30 Minuten, um sich an das Substrat anzuheften. Nach kurzem Eintauchen in 500µl MEM-Medium wurde 500µl Neurobasalmedium hinzugegeben, das NGF oder Neurturin enthielt.

Als Negativkontrolle diente reines RPMI-Medium sowie RPMI unter Zugabe von 10% FCS. Nach 24 Stunden Inkubation wurden die Zellen mit 4% Formalaldehyd in PBS fixiert und mit Syndecan-3 und DAPI wie oben beschrieben gefärbt. Die Bildaufnahme in digitaler Mikroskopie erfolgte mittels eines Keyence Biorevo BZ-9000 Mikroskops (Keyence, Neu-Isenburg, Deutschland).

### **3.6 Syndecan-3 spezifische siRNA**

Eine Inhibition der Expression von Syndecan-3 in den Pankreaskarzinomzellen wurde durch Transfektion mit Syndecan-3 spezifischer siRNA erzielt: UCGAAGUAGCCCGAGCCCGAC (*sense*) und CGGGCUCGGGCUACUUCGAGC (*antisense*). Als Negativkontrolle wurden Pankreaskarzinomzellen verwendet, die mit der nicht kodierenden AllStars *negative control* siRNA transfiziert wurden.  $15 \times 10^4$  Pankreaskarzinomzellen pro Loch wurden in einer 6-Loch-Platte ausgesät und über Nacht inkubiert. Die Lösung zur Transfektion enthielt 60nmol Syndecan-3 spezifischer siRNA beziehungsweise 30nmol der Negativkontroll-siRNA. Diese wurde mit HiPerfect Transfektionsreagenz und Opti-MEM Medium zu einem Gesamtvolumen von 100µl ergänzt und für zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, ehe sie den ausgesäten Pankreaskarzinomzellen beigegeben wurde.

Die Wirkung der siRNA auf die Expression von Syndecan-3 in Pankreaskarzinomzellen wurde mithilfe von qRT-PCR gemessen. Jeweils 24, 48, 72, 96 und 120 Stunden nach Transfektion wurden die Pankreaskarzinomzellen Linien Panc1 und SU86.86 lysiert und die mRNA mithilfe von Trizol extrahiert. Anschließend wurde nach Verdau der Proben mit RNase-freier DNase eine cDNA entwickelt. Die Vervielfachung der mRNA in der *Real-Time* PCR wurde unter Gebrauch des *Light Cycler Fast Start DNA SYBR Green* Sets von Roche (Mannheim, Deutschland) durchgeführt. Nach Vervielfachung der mRNA wurde die errechnete Anzahl spezifischer Transkripte anhand von Cyclophilin B normalisiert und als Betrag pro Mikroliter eingesetzter cDNA dargestellt.

### **3.7 Untersuchung biologischer Funktionen von Pankreaskarzinomzellen**

Nach Analyse von Syndecan-3 Expression, Lokalisation und Bezug zu neuronalen Wachstumsfaktoren wurde der Einfluss der Syndecan-3 Inhibition durch spezifische siRNA auf folgende biologische Funktionen in-vitro getestet: Proliferation, Lokomotion, Invasion und Nerv-gerichtete Migration.

### **3.7.1 MTT-Ansatz**

Das Zellwachstum wurde mithilfe von MTT (3-(4,5-Methylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyl-Tetrazolium Bromid) analysiert. 5000 Zellen pro Loch einer 96-Loch-Platte wurden über Nacht inkubiert und mit 30nmol Syndecan-3 siRNA oder Negativkontroll-siRNA transfiziert. Nach 24, 48, 72 beziehungsweise 96 Stunden in Inkubation wurde MTT (20µg/Loch) hinzugefügt. Vier Stunden später wurden die Formazan-Produkte mit azidem Isopropanol gelöst. Zur Messung wurde die optische Dichte bei 570nm in einem optischen Lesegerät erhoben. Alle Experimente wurden in drei biologischen und drei technischen Replikaten verifiziert.

### **3.7.2 Woundhealing-Ansatz**

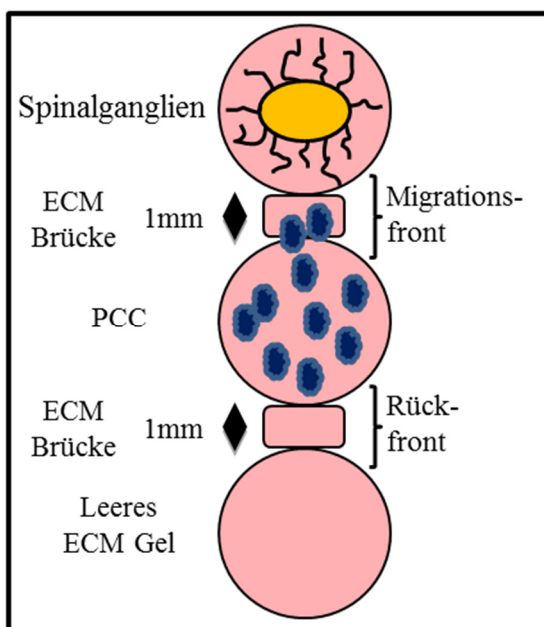
15 x 10<sup>4</sup> Pankreaskarzinomzellen pro Loch einer Sechs-Loch-Platte wurden ausgesät, über Nacht inkubiert und mit 60nmol Syndecan-3 siRNA oder Negativkontroll-siRNA transfiziert. Nach sechs Stunden wurde der Zellrasen mit der Spitze einer 200µm Pipette gespalten. Die Bewegung der Pankreaskarzinomzellen in Richtung der freien Fläche wurden 60 Stunden nach erfolgter Transfektion über 60 Stunden mit einem multitemporalen Mikroskop in einem Zeiss Axio Observer D1 System aufgenommen. Die gewonnenen Aufnahmen wurden mithilfe von WimScratch Quantitative Image Analysis Automation (Wimasis, München, Deutschland) ausgewertet.

### **3.7.3 Invasions-Ansatz**

BD *Biocoat Matrigel* Invasionskammern mit einer Porengröße von 8µm (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) wurden mit je 0,6ml vollständigen RPMI Mediums pro Loch hydriert und für zwei Stunden inkubiert. 5000 Zellen, mit 60nmol Syndecan-3 siRNA beziehungsweise Negativkontroll-siRNA transfiziert, wurden in den oberen Bereich der Invasionskammern ausgesät und für 22 Stunden inkubiert. Dieser Zeitraum wurde im Bereich der effektivsten siRNA-Wirkung, dem Intervall zwischen 56 und 78 Stunden nach Transfektion gewählt. Die eindringenden Zellen wurden mit DAPI gefärbt und ihre Anzahl durch manuelle Auszählung in drei Replikaten bestimmt.

### 3.7.4 3D Neurale-Migration-Ansatz

Für den 3D Neurale-Migration-Ansatz wurden  $15 \times 10^4$  Pankreaskarzinomzellen pro Loch einer Sechs-Loch-Platte mit 60nmol Syndecan-3-spezifischer siRNA oder Negativkontroll-siRNA transfiziert. Sechs Stunden nach Transfektion wurden  $10^5$  Pankreaskarzinomzellen entnommen, in 25ml ECM Gel aufgelöst und auf eine neue Platte aufgetragen. Nach Isolation von Spinalganglien aus neugeborenen Wistar-Ratten wurden drei Spinalganglien ebenso in 25ml ECM Gel aufgelöst und in genau 1mm Abstand zum Pankreaskarzinomzellen enthaltenden Gel gesetzt. Eine 1mm lange ECM Gel Verbindung wurde zwischen beide Gele gesetzt, um eine Interaktion der Pankreaskarzinomzellen mit den Neuronen zu ermöglichen. Um eine unspezifische Migration der Pankreaskarzinomzellen auszuschließen, wurde ein freies ECM Gel von 25ml auf der gegenüberliegenden Seite gesetzt und durch eine 1mm lange Verbindung mit dem Pankreaskarzinomzellen enthaltenden Gel verbunden (Abb. 4). Der gesamte Ansatz wurde in Migrations-Medium eingetaucht. Die Analyse der Zellmigration erfolgte mittels *live cell microscopy* in einem Zeiss Observer D1 System, ausgestattet mit einer CO<sub>2</sub> Inkubationskammer, einer AxioCam Kamera und einem Planneoluar x 10/0,3 PH1 M27 Objektiv. Die Aktivität der Pankreaskarzinomzellen und Spinalganglien wurde über eine Gesamtbeobachtungszeit von 12 Stunden in digitaler multi-temporaler Mikroskopie untersucht. Beide Fronten („Rückfront“ und „Migrationsfront“) wurden in einer 100-fachen Vergrößerung, sowie fünfminütigen Intervallen aufgenommen und zu einem Video zusammengefasst.



**Abbildung 4: 3D Neurale-Migration-Ansatz**

Zur Analyse der Nerv-gerichteten Migration von Pankreaskarzinomzellen wurde der 3D Neurale-Migration-Ansatz angewandt. Dazu wurden Panc-1 und SU86.86 Pankreaskarzinomzellen mit neuralem Gewebe in Form von Spinalganglien aus neugeborenen Ratten konfrontiert. 60 Stunden nach Transfektion der Pankreaskarzinomzellen wurde die Migration video-assistiert für ein Zeitintervall von 12 Stunden untersucht.

PCC = Pankreaskarzinomzellen

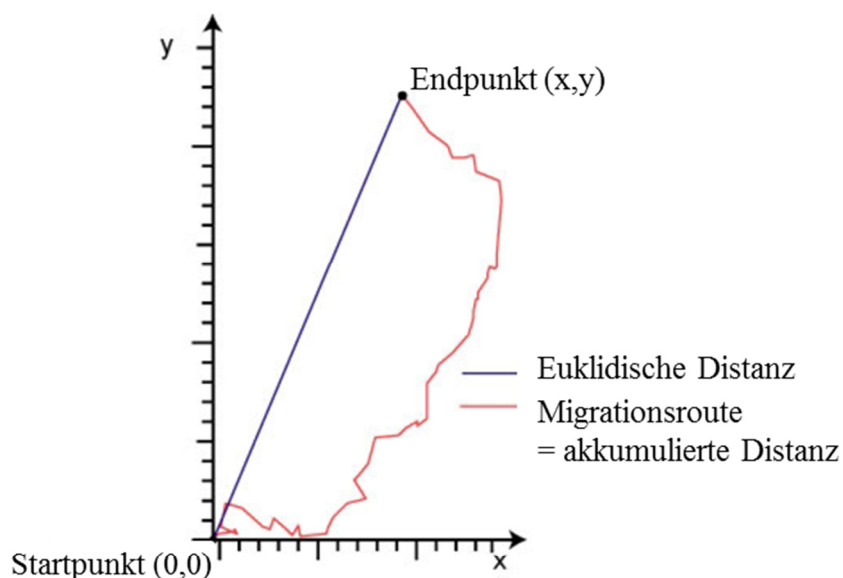
Abb. nach Ceyhan (Ceyhan 2008).



*Live cell imaging analysis*: 30 Zellen an jeder Front wurden nach dem Zufallsprinzip zur morphometrischen Analyse ausgewählt. Im Programm *manual tracking* von ImageJ wurden die Bewegungen der Pankreaskarzinomzellen nachverfolgt. Die erhobenen Daten wurden anschließend in die Anwendung *chemotaxis and migration tool* von Ibidi (ibidi GmbH: Trapp, 2010, June 28) zur Auswertung eingebracht. Ermittelt wurden folgende Parameter (Abb. 5):

- Euklidische Distanz: der Abstand von Anfangs- und Endpunkt, in gerader Linie gemessen
- Geschwindigkeit
- Linearität der Bewegung
- *Forward Migration Index*: Index der gerichteten Migration in der x-Achse

Der Versuch wurde dreimal wiederholt, um die Ergebnisse zu verifizieren.



$$\text{Linearität} = \frac{\text{euklidische Distanz}}{\text{akkumulierte Distanz}}$$

$$\text{x FMI} = \frac{x_{\text{Ende}}}{\text{akkumulierte Distanz}}$$

### Abbildung 5: Chemotaxis Parameter

Die Euklidische Distanz gibt das Ausmaß der gerichteten Bewegung an. Sie wird aus der direkten Verbindung von Start- und Endpunkt der Migrationsroute ermittelt.

Die Linearität ist ein Maß der Bewegungsbahn von Zellen.

Der *Forward Migration Index* gibt die Vorwärtsbewegung der Zellen entlang einer Achse an.

$x\text{FMI}$  = *Forward Migration Index* entlang der x-Achse

$x_{\text{Ende}}$  = Endposition auf der x-Achse

Abb. nach Ibidi *Chemotaxis and Migration Tool* (ibidi GmbH: Trapp, 2010, June 28).

### 3.8 Untersuchung intrazellulärer Signalwege

Der Einfluss von Syndecan-3 auf intrazelluläre Signalwege wurde an der Aktivität der Tyrosinkinase Src getestet. Krebszellen der Pankreaskarzinomzell-Linie SU86.86 wurden zunächst mit Syndecan-3 siRNA beziehungsweise Negativkontroll-siRNA transfiziert und nach 72 Stunden in RIPA-Puffer (versehen mit Proteinase- und Phosphatase-Inhibitor) lysiert. Die Aktivität von Src wurde im *Immunoblot* mit Antikörpern gegen die aktive (am Tyr416-Ende phosphorylierte) und die inaktive (am Tyr416-Ende nicht phosphorylierte) Form von Src bestimmt. Um Unterschiede im Src-Gehalt der Zellen auszuschließen, wurde das endogene Src dargestellt. Als Ladungskontrolle diente in allen Proben GAPDH. Die gewonnenen Signale wurden durch Messung der Dichte quantifiziert. Alle Ergebnisse wurden auf den Wert unbehandelter Pankreaskarzinomzellen relativiert und auf das endogene Src normalisiert.

### 3.9 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit GraphPad Prism version 5.01 for Windows, GraphPad Software, San Diego California USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com). Die Ergebnisse sind als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwerts (SEM) dargestellt. Der Vergleich multipler Gruppen erfolgte mit der *analysis of variance for random measures* (ANOVA) mit nachfolgender post hoc Analyse, wobei auf Grund multipler Tests eine Bonferroni-Korrektur vorgenommen wurde. Der Vergleich zweier Parameter erfolgte mit dem Mann-Whitney U Test. In den Messungen zur Wirkung der Syndecan-3 siRNA, Proliferation und Lokomotion wurde die *area under the curve* berechnet und im Mann-Whitney U Test ausgewertet. Zur Bestimmung der Korrelation der Syndecan-3 Expression mit neuronalen Wachstumsfaktoren und ihren Rezeptoren diente als r-Wert der Spearmans Rangkorrelationskoeffizient. Die p-Werte wurden immer zweiseitig berechnet und der beobachtete Effekt wurde als statistisch signifikant ab einem p-Wert kleiner 0,05 eingestuft.

## **4 Ergebnisse**

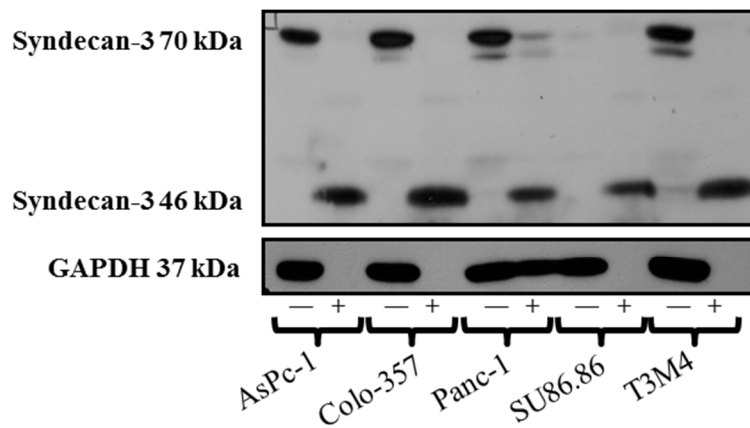
Nachfolgend werden die Ergebnisse der Analyse von Syndecan-3 im Pankreaskarzinom dargestellt: Expression in Pankreaskarzinomzellen, Lokalisation in intrapancreatischen Nerven, Bezug zu neuronalen Wachstumsfaktoren, sowie Einfluss auf biologische Funktionen (Proliferation, Lokomotion, Invasion und Nerv-gerichtete Migration) und intrazelluläre Signalwege.

### **4.1 Expression von Syndecan-3 in Pankreaskarzinomzellen**

Nach Aufspaltung der Struktur von Syndecan-3 im enzymatischem Verdau wurde die Basalexpression und Plasmid-induzierte Überexpression unter Berücksichtigung der einzelnen Domänen von Syndecan-3 bestimmt.

#### **4.1.1 Enzymatischer Verdau der Syndecan-3 Seitenäste**

Das Molekulargewicht der nativen Form von Syndecan-3 liegt bei 46kDa. Ein Charakteristikum der HSPG ist die zusätzliche Bindung von Seitenketten in Form von Heparansulphat und Chondroitinsulphat GAG. Eine naheliegende Erklärung für die Ausbildung einer größeren, bei 70kDa detektierten Bande ist die oben beschriebene Bindung von GAG-Ketten, die die aktive Wirkungsform von Syndecan-3 charakterisieren. Deshalb wurde ein enzymatischer Verdau der Pankreaskarzinomzell-Lysate mit Harnstoff, Heparinase und Chondroitinase durchgeführt (Abb. 6). Mehrere Pankreaskarzinomzelllinien mit unterschiedlichem Syndecan-3 Expressionsprofil wurden dazu verwendet. Die Pankreaskarzinomzellen AsPc-1, Colo-357, Panc-1 und T3M4 zeigten eine prominente Bande bei 70kDa, während SU86.86 nur geringe Ausgangswerte aufwies. In allen Pankreaskarzinomzell-Linien kam es aber nach dem Verdau zu einem einheitlichen Wechsel der Banden von der aktiven Form auf die native Größe, die bei 46kDa detektiert wurde. Der Einsatz der Enzyme bewirkte auch einen Verdau von GAPDH in allen untersuchten Pankreaskarzinomzellen.



**Abbildung 6: Enzymatischer Verdau der Seitenäste von Syndecan-3**

Der enzymatische Verdau der Pankreaskarzinomzell-Lysate mit Harnstoff, Heparinase und Chondroitinase zeigt die Bedeutung der Heparan Sulphat und Chondroitin Sulphat GAG für die aktive Struktur von Syndecan-3 im PDAC.

– = Lysat vor enzymatischem Verdau

+ = Lysat nach enzymatischem Verdau

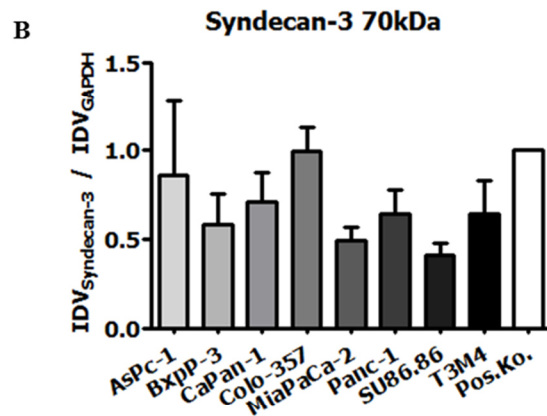
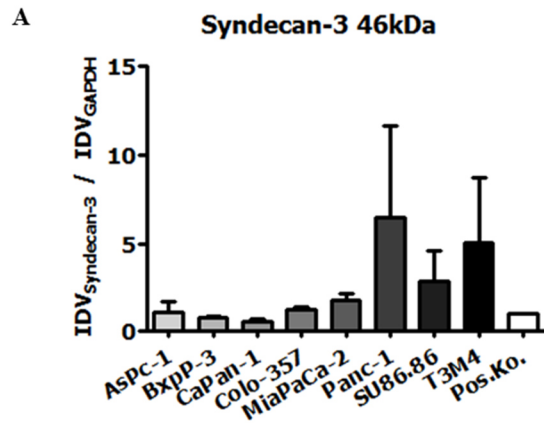
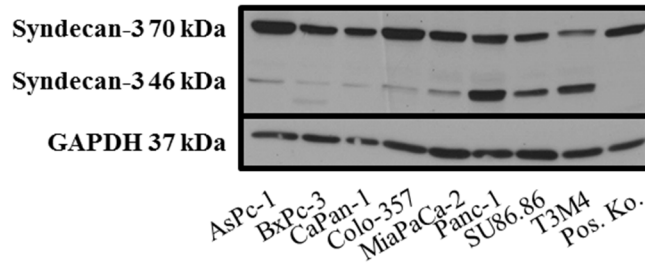
#### 4.1.2 Basalexpression von Syndecan-3 in Pankreaskarzinomzellen

Erste Untersuchungen hatten auf mRNA Ebene gezeigt, dass die Sydecan-3 Expression in Pankreaskarzinomzellen stark erhöht ist (Tardio, 2008). Diese Daten wurden nun auf Proteinebene untersucht. Dazu wurde die Syndecan-3 Expression in den acht Pankreaskarzinomzellen Linien AsPc-1, BxPC-3, CaPan-1, Colo-357, MiaPaCa-2, Panc-1, SU86.86 und T3M4 bestimmt. Nach Gelelektrophorese wurden die native Form bei 46kDa und die aktive Form bei 70kDa identifiziert und mittels Densitometrie ausgewertet (Abb. 7). In Relation zur Positivkontrolle traten folgende Werte auf (Tabelle 1):

Tabelle 1: *Immunoblot* der Syndecan-3 Expression in Pankreaskarzinomzellen.

Pos.Ko. = Positiv-Kontrolle (Niere Ratte)

	AsPc-1	BxPc-3	CaPan-1	Colo-357	MiaPaCa-2	Panc1	SU86.86	T3M4	Pos. Ko.
46kDa	1,04	0,75	0,56	1,23	1,74	6,48	2,88	5,06	1
70kDa	0,86	0,58	0,71	0,99	0,49	0,64	0,41	0,64	1



**Abbildung 7: Syndecan-3 Expression in Pankreaskarzinomzellen**

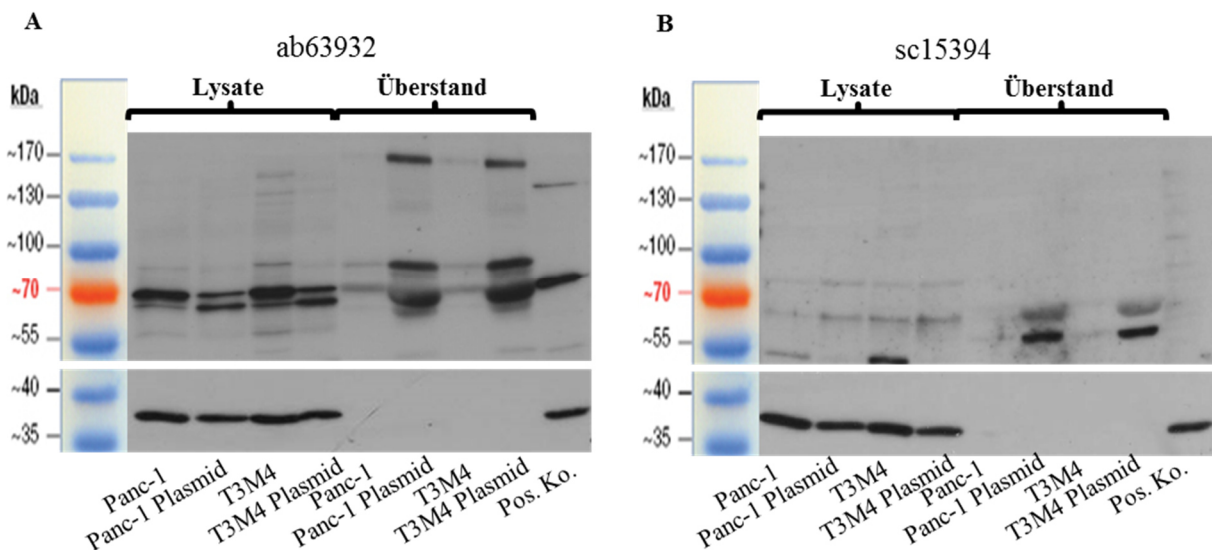
In allen Pankreaskarzinomzellen finden sich zwei konstant exprimierte Banden von Syndecan-3 unterschiedlicher Signalstärke. (A) Die native Größe von Syndecan -3 wird bei 46 kDa detektiert. (B) Die durchgehend prominente Bande bei rund 70 kDa identifiziert die aktive Form von Syndecan-3 in Pankreaskarzinomzellen.

IDV = *integrated density value*

### 4.1.3 Sekretion von Syndecan-3 bei Überexpression

Die Transfektion der Pankreaskarzinomzellen mit dem Syndecan-3 spezifischen Plasmid bewirkte wie erwartet eine Zunahme der Signale für Syndecan-3 im *Immunoblot*. Der Effekt trat jedoch nicht auf Höhe der bekannten Banden auf. Interessanterweise lag in den transfizierten Zellen das Molekulargewicht der neuen Isoform von Syndecan-3 um wenige kDa tiefer als die aktive Bande von 70kDa. Zwei weitere Proteine fielen in den Überständen auf: ein Signal bei 90kDa, sowie ein weiteres von 180kDa.

Zur detaillierten Analyse der abgebildeten Syndecan-3 Domäne wurden die Überstände unbehandelter und transfizierter Pankreaskarzinomzellen mit dem Antikörper sc15349 behandelt, der an die extrazelluläre Domäne von Syndecan-3 bindet. Der neue Antikörper lieferte ein vergleichbares Verteilungsmuster der Banden. Im Unterschied zum Antikörper ab63932, der die zytoplasmatische Domäne von Syndecan-3 darstellt, zeigte die neue Bande nach Transfektion aber kein Signal in den Zelllysaten. Innerhalb der Überstände war der Unterschied zur Bande von rund 70kDa dafür besonders intensiv ausgeprägt (Abb. 8).



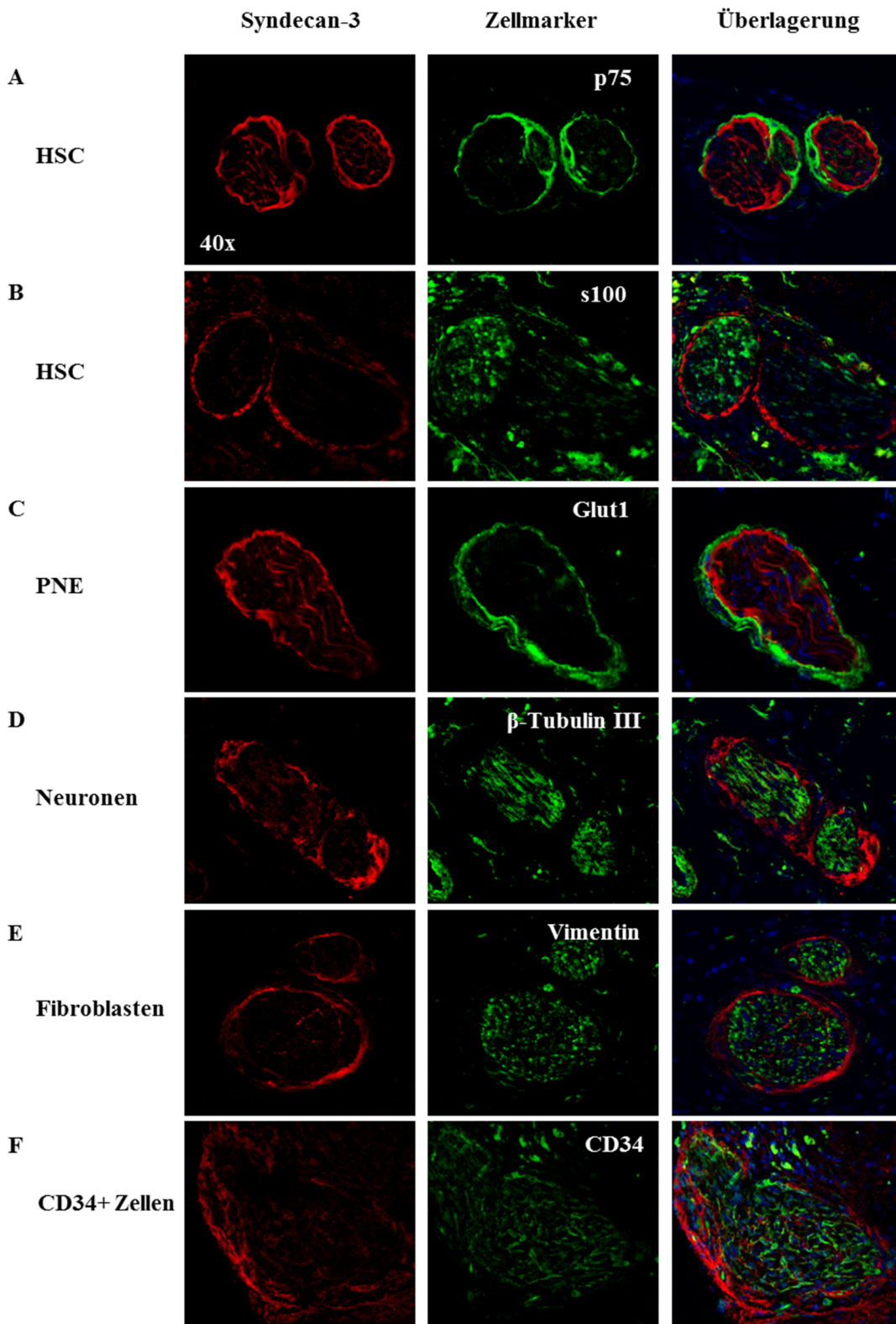
**Abbildung 8: Überexpression von Syndecan-3 in Pankreaskarzinomzellen**

Die Überexpression von Syndecan-3 in Pankreaskarzinomzellen bewirkt eine Abnahme der Basalexpression in den Zellen, während Syndecan-3 in den Überständen zunimmt. Sowohl der gegen die extrazelluläre Domäne gerichtete Antikörper ab63932 (A) als auch der gegen die zytoplasmatische Domäne gerichtete Antikörper sc15394 (B) detektieren das Signal im Überstand.

Pos. Ko. = Positivkontrolle

## **4.2 Immunolokalisation von Syndecan-3 in intrapancreatischen Nerven**

Ein erster Hinweis auf eine Rolle von Syndecan-3 in der Interaktion von Krebs- und Nervenzellen war die Detektion von überhöhten Syndecan-3 Signalen in intrapancreatischen Nerven des PDAC. Innerhalb der Nerven zeigte die Färbung mit Syndecan-3 Antikörpern ein dichtes intra- und perineurales Netzwerk (Tardio, 2008). Um die genaue Herkunft von Syndecan-3 in den Nerven zu identifizieren, wurden sämtliche bekannte Zellpopulationen intrapancreatischer Nerven auf eine Doppelfärbung ihrer Marker mit Syndecan-3 untersucht. Während Analysen des Endothels (CD31), der Neurofilamente (NF H) und der umgebenden ECM (Laminin) keine Ergebnisse erbrachten, fanden sich eindrucksvolle Färbemuster mit Markern folgender Populationen: Neuraler Wachstumsfaktor Rezeptor p75 (Abb. 9 A) und S100 (Abb. 9 B) für Gliazellen, Glukose Transporter Glut-1 (Abb. 9 C) für perineurale Epithelzellen, beta-III Tubulin (Abb. 9 D) für Neuronen und Vimentin (Abb. 9 E) für Fibroblasten. Alle Färbemuster wiesen eine unmittelbare Nähe zum intra- und perineuralen Netzwerk der Syndecan-3 Immunoreaktivität auf. Eine Ko-Lokalisation mit Syndecan-3 und somit der direkte Nachweis des Ursprungs des HSPG konnte jedoch nicht identifiziert werden. Während sich die Färbung von Glia, perineuralen Epithelzellen und Neuronen nach außen beziehungsweise innen von Syndecan-3 abhob, zeigte die Färbung von Fibroblasten mit Vimentin bereits erste Ähnlichkeiten zum Syndecan-3 Netzwerk. Noch eindrucksvoller war die Doppelfärbung von CD34 (Abb. 9 F) und Syndecan-3. In der Überlagerung wurde ein komplementäres Bild beider Färbungen mit alternierenden Arealen der Signale gefunden. Sowohl im Endo- als auch im Perineurium waren die Signale aneinandergereiht, jedoch stets voneinander getrennt. Überwog im Perineurium die Syndecan-3 Färbung, so zeigten endoneurale Bereiche deutlichere Signale für CD34. Letztendlich fand sich auch hier keine vollständige Ko-Lokalisation der Signale.



**Abbildung 9: Immunolokalisation von Syndecan-3 in intrapankreatischen Nerven**

Syndecan-3 zeigt eine intensive Expression in intrapankreatischen Nerven. In der Immunolokalisation mit Markern verschiedener Zellpopulationen innerhalb der Nerven findet sich aber keine Überlappung. Die größte Homologie weisen CD34+ Zellen auf.

HSC = humane Schwann Zellen; PNE = perineurale Epithelzellen



### 4.3 Interaktion von Syndecan-3 mit neuronalen Wachstumsfaktoren

Wie eingangs beschrieben, fördert die Überexpression der neuronalen Wachstumsfaktoren in den Pankreaskarzinomzellen, als auch in den intrapancreatischen Nerven die neurale Invasion im PDAC. Dadurch kommt es zu einem raschen Fortschreiten der Erkrankung, erhöhtem Schmerz und einer Abnahme der Überlebensrate (Abb. 3). Um eine potentielle Interaktion von Syndecan-3 mit diesen Faktoren im PDAC zu überprüfen, wurden die Daten von 65 PDAC-Patienten verwendet und auf eine Korrelation der mRNA-Werte zwischen Syndecan-3 und den neurotrophischen Faktoren GDNF, Artemin, Neurturin, Persephin und NGF untersucht. Darin zeichnete sich eine signifikante Korrelation der Syndecan-3 Expression im PDAC mit nahezu allen getesteten Faktoren. Somit war die Überexpression von Syndecan-3 im PDAC immer mit einer Überexpression aller Mitglieder der GFL bis auf Artemin direkt miteinander assoziiert (Tabelle 2).

Tabelle 2: Korrelationsanalyse der mRNA-Expression von Syndecan-3 und den Liganden GDNF, Neurturin, Artemin, Persephin sowie NGF im Pankreaskarzinom.

	Syndecan-3	Syndecan-3	Syndecan-3	Syndecan-3	Syndecan-3
	GDNF	Neurturin	Artemin	Persephin	NGF
<i>r-Wert</i>	0,48	0,35	-0,21	0,59	0,49
<i>p-Wert</i>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>0,005</b>	0,10	<b>&lt;0,0001</b>	<b>0,0001</b>

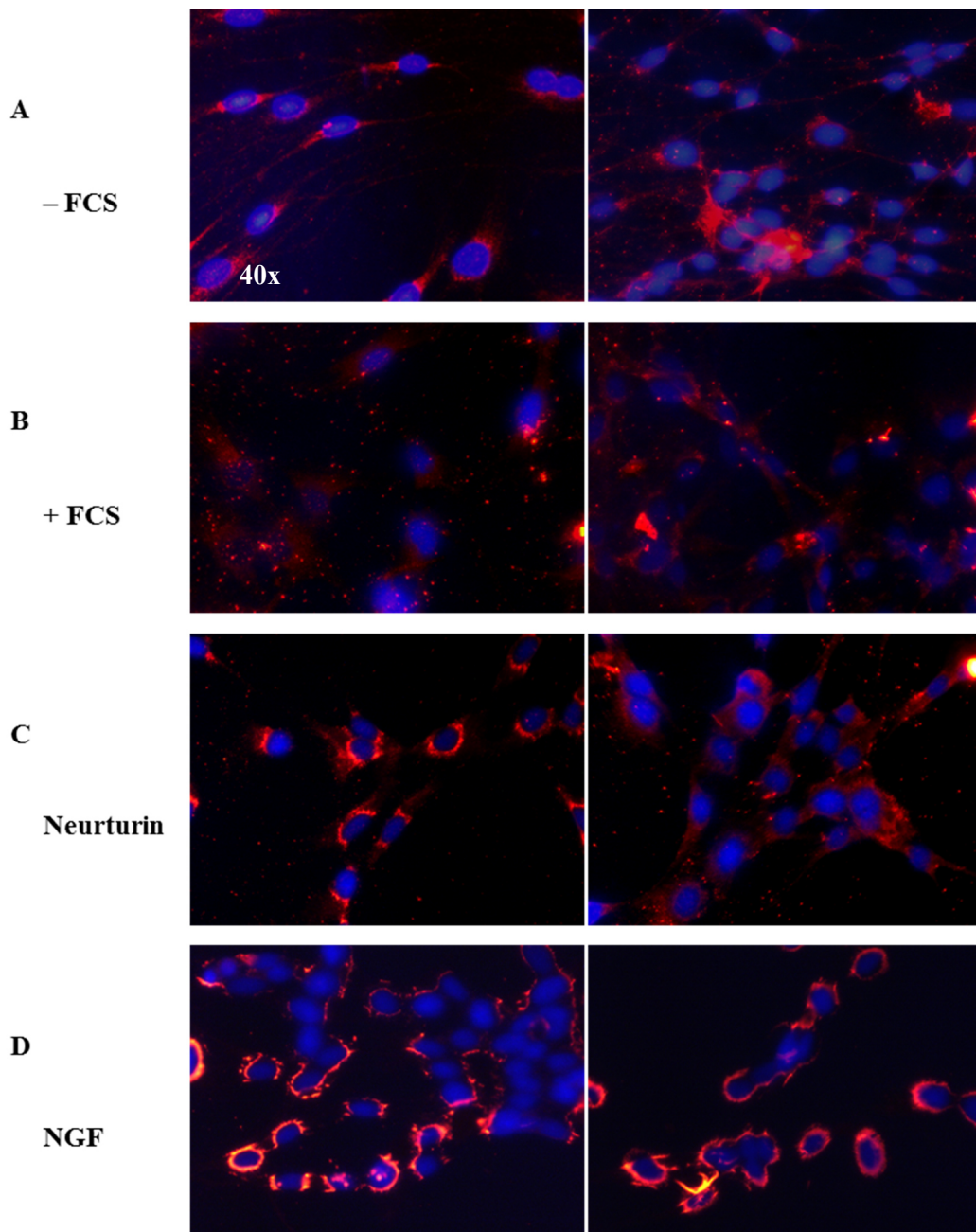
Parallel zur GFL korrelierten auch die mRNA-Werte der primären Ko-Rezeptoren GFR $\alpha$ 1-4 sowie Ret mit der Expression von Syndecan-3. Entgegen der Beobachtung mit den Liganden zeigte sich für die Rezeptoren keine Assoziation mit Syndecan-3. Die Korrelationswerte von GFR $\alpha$ -1, GFR $\alpha$ -2 und Ret mit Syndecan-3 erzielten zwar ähnliche Werte wie die dazugehörigen GFL Faktoren, jedoch ohne statistische Signifikanz (Tabelle 3). Auffällig waren die Ergebnisse von GFR $\alpha$ -3 sowie GFR $\alpha$ -4. GFR $\alpha$ -3 zeigte – in Analogie zu seinem Liganden Artemin – keinerlei Bezug zu Syndecan-3. Im Gegensatz dazu war die Expression von GFR $\alpha$ -4 im PDAC nicht messbar, sodass keine Assoziation mit Syndecan-3 aufgestellt werden konnte.

Tabelle 3: Korrelationsanalyse der mRNA-Expression von Syndecan-3 und den GFL-Rezeptoren GFR $\alpha$ -1, GFR $\alpha$ -2, GFR $\alpha$ -3, GFR $\alpha$ -4 sowie der Rezeptortyrosinkinase *rearranged during transfection* Ret im Pankreaskarzinom.

	Syndecan-3	Syndecan-3	Syndecan-3	Syndecan-3	Syndecan-3
	GFR $\alpha$ -1	GFR $\alpha$ -2	GFR $\alpha$ -3	GFR $\alpha$ -4	Ret
<i>r-Wert</i>	0,50	0,47	0,02	–	0,51
<i>p-Wert</i>	0,12	0,14	0,92	–	0,11

#### 4.4 Immunzytochemische Untersuchung von Nervenzellen

Die Interaktion von Syndecan-3 mit neuronalen Wachstumsfaktoren wurde in immunzytochemischen Färbungen von Nervenzellen bestätigt. Zunächst wurde eine Abhängigkeit der Syndecan-3 Expression vom FCS-Gehalt im Medium ausgeschlossen: Zwischen den FCS-freiem und FCS-haltigem Medium zeigte sich kein Unterschied in Ausmaß und Qualität der Färbung (Abb. 10 A, B). Neuronen aus Spinalganglien, die unter Zugabe von Neurturin oder NGF kultiviert wurden, zeigten hingegen eine klare Zunahme der Syndecan-3 Aktivität und hoben sich deutlich von den Negativkontrollen ab (Abb. 10 C, D). In mehreren Arealen erschienen unter dem Einfluss der neuronalen Wachstumsfaktoren Intensität und Fokussierung der Färbung entlang der Zellmembran ausgeprägter als in den Negativkontrollen. Durch Zugabe von Neurturin dehnte sich der gefärbte Anteil pro Neuron aus, unter Einwirkung von NGF kam es zu einem vollständigen Ringschluss um die Zellkerne.



**Abbildung 10: Wirkung neuraler Wachstumsfaktoren auf Syndecan-3 in Spinalganglien**  
 Die Behandlung der Spinalganglien mit den neuralen Wachstumsfaktoren Neurturin und NGF induziert die Aktivierung und Produktion von Syndecan-3.

-FCS = Medium ohne FCS

+FCS = Medium mit FCS

Neurturin = Medium nach Zugabe von Neurturin

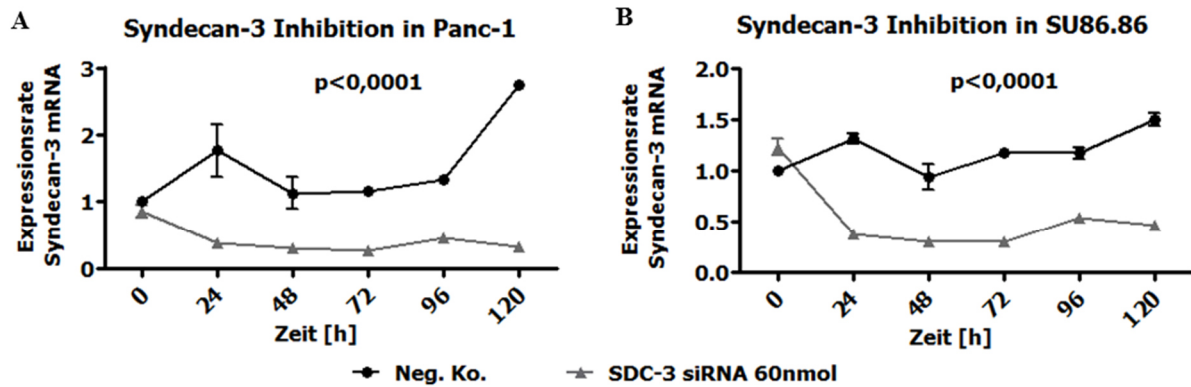
NGF = Medium nach Zugabe von neuralem Wachstumsfaktor.

## **4.5 Funktionelle Analyse von Pankreaskarzinomzellen mit Syndecan-3 spezifischer siRNA**

Die Überexpression von Syndecan-3 im PDAC ist mit einer gesteigerten neuronalen Invasion von Pankreaskarzinomzellen assoziiert (Abb. 3) (Tardio, 2008). Diese Daten deuten auf eine wichtige Rolle von Syndecan-3 in der Tumorbilogie der Pankreaskarzinomzellen hin. Deshalb wurde der Effekt von Syndecan-3 auf Proliferation, Lokomotion, Invasivität und die spezifische neurale Invasion von Pankreaskarzinomzellen *in vitro* untersucht. Für die Untersuchung der Motilität wurden die Pankreaskarzinomzellen Panc-1 und SU86.86 ausgewählt. Panc-1-Pankreaskarzinomzellen zeigten stabil hohe Expressionsraten von Syndecan-3 in allen Messungen, während SU86.86-Pankreaskarzinomzellen niedrige Expressionsraten aufwiesen.

### **4.5.1 Anwendung von Syndecan-3 spezifischer siRNA**

Um gezielt die Rolle von Syndecan-3 zu überprüfen, wurde die Expression in Pankreaskarzinomzellen durch den Einsatz einer spezifischen Syndecan-3 siRNA gesenkt (Abb. 11 A, B). Zur Bestimmung der optimalen Wirksamkeit der Syndecan-3 spezifischen siRNA wurde eine Zeitreihe nach Syndecan-3 siRNA Transfektion erstellt. Hierzu wurden die Pankreaskarzinomzellen Panc-1 und SU86.86 zunächst mit Syndecan-3 spezifischer siRNA beziehungsweise Negativkontroll-siRNA transfiziert. In einem Zeitraum von 120 Stunden wurden in Abständen von 24 Stunden Zelllysate erstellt. Bereits 24 Stunden nach Transfektion kam es zu einem sichtbaren Abfall der Syndecan-3 mRNA Werte in beiden Pankreaskarzinomzellen. Die Inhibition von Syndecan-3 konnte auf niedrige Werte über den gesamten Verlauf der Versuche stabil gehalten werden. Als besonders wirksamer Zeitpunkt für die weitere Analyse erwies sich die Zeitspanne zwischen 48 und 72 Stunden nach Transfektion (relative Expressionsabnahme in Panc-1 um 0,72 und in SU86.86 um 0,70;  $p < 0,0001$ ).



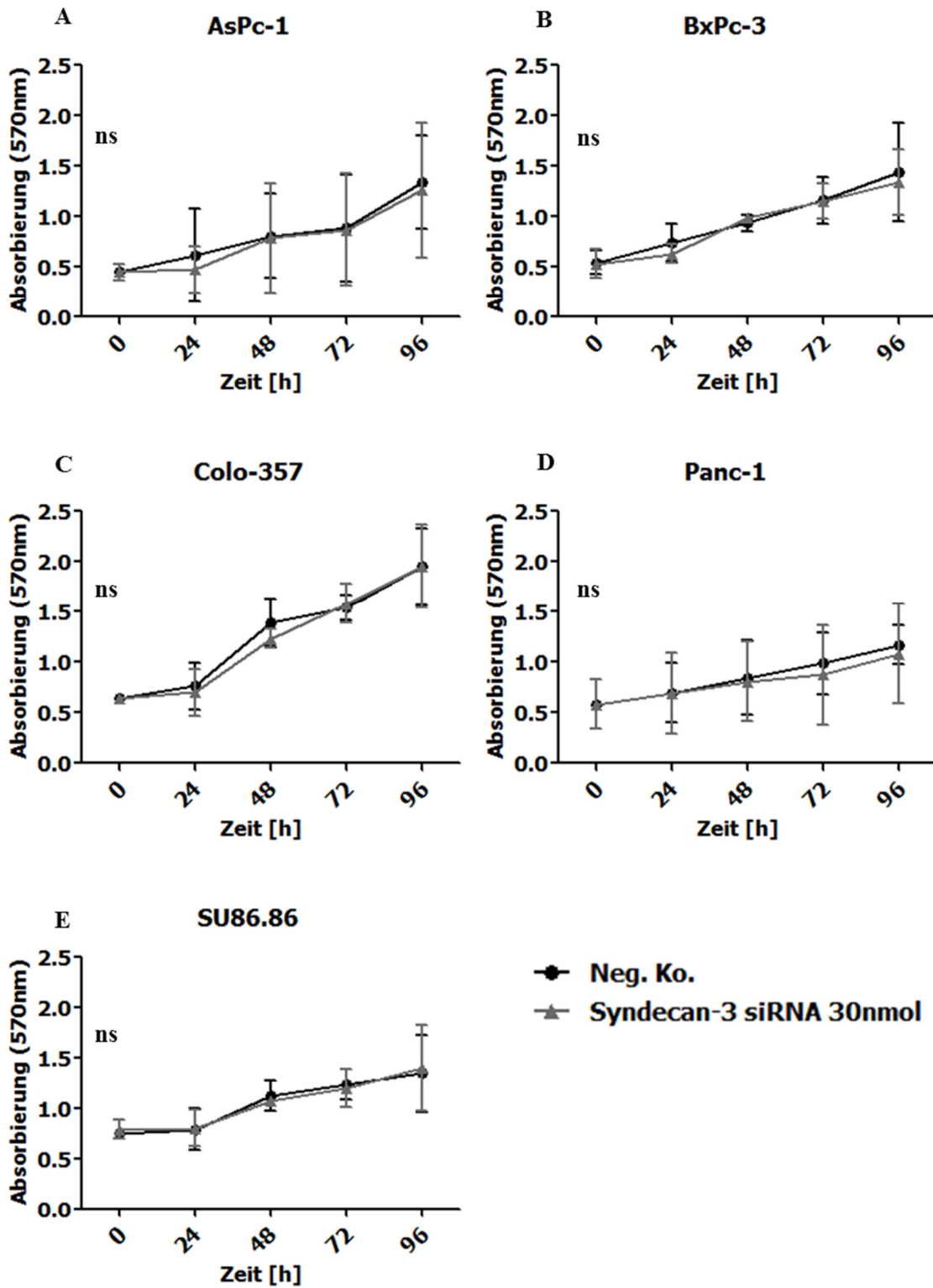
**Abbildung 11: Inhibition der Syndecan-3 Expression mittels siRNA in Pankreaskarzinomzellen**

Zum optimalen Einsatz der Transfektion wurde das Zeitintervall größter Effizienz getestet. In Panc-1 Pankreaskarzinomzellen (A) und SU86.86 (B) erzielt die Syndecan-3 spezifische siRNA ihre größte Wirkung zwischen 48 und 72 Stunden nach Transfektion.

Neg. Ko. = Negativkontrolle

#### 4.5.2 Einfluss von Syndecan-3 auf die Proliferation von Pankreaskarzinomzellen

Um die Auswirkungen der Syndecan-3 Expression in den Pankreaskarzinomzellen auf die Proliferation zu untersuchen, wurden folgende Pankreaskarzinomzelllinien aufgrund ihrer unterschiedlich hohen Syndecan-3 Werte im *Immunoblot* (Tabelle 1) in die Analyse einbezogen: AsPc-1, BxPc-3, Colo-357, Panc-1 und SU86.86. Diese wurden zunächst mit Syndecan-3 siRNA beziehungsweise Negativkontroll-siRNA transfiziert. Im MTT-Ansatz wurde die Wirkung von Syndecan-3 auf die Proliferation der Pankreaskarzinomzellen von 0 bis 96 Stunden nach Transfektion in Intervallen von 24 Stunden überprüft. Dabei zeigte sich kein Unterschied zwischen den Syndecan-3 inhibierten Zellen und der Negativkontrolle in allen analysierten Pankreaskarzinomzell-Linien (Abb. 12 A-E).



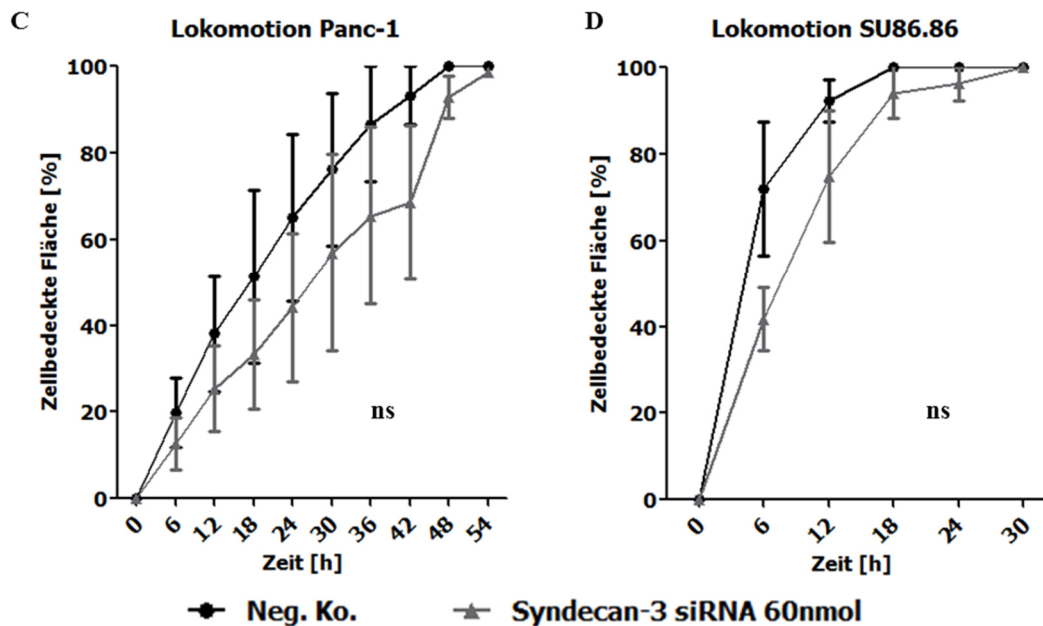
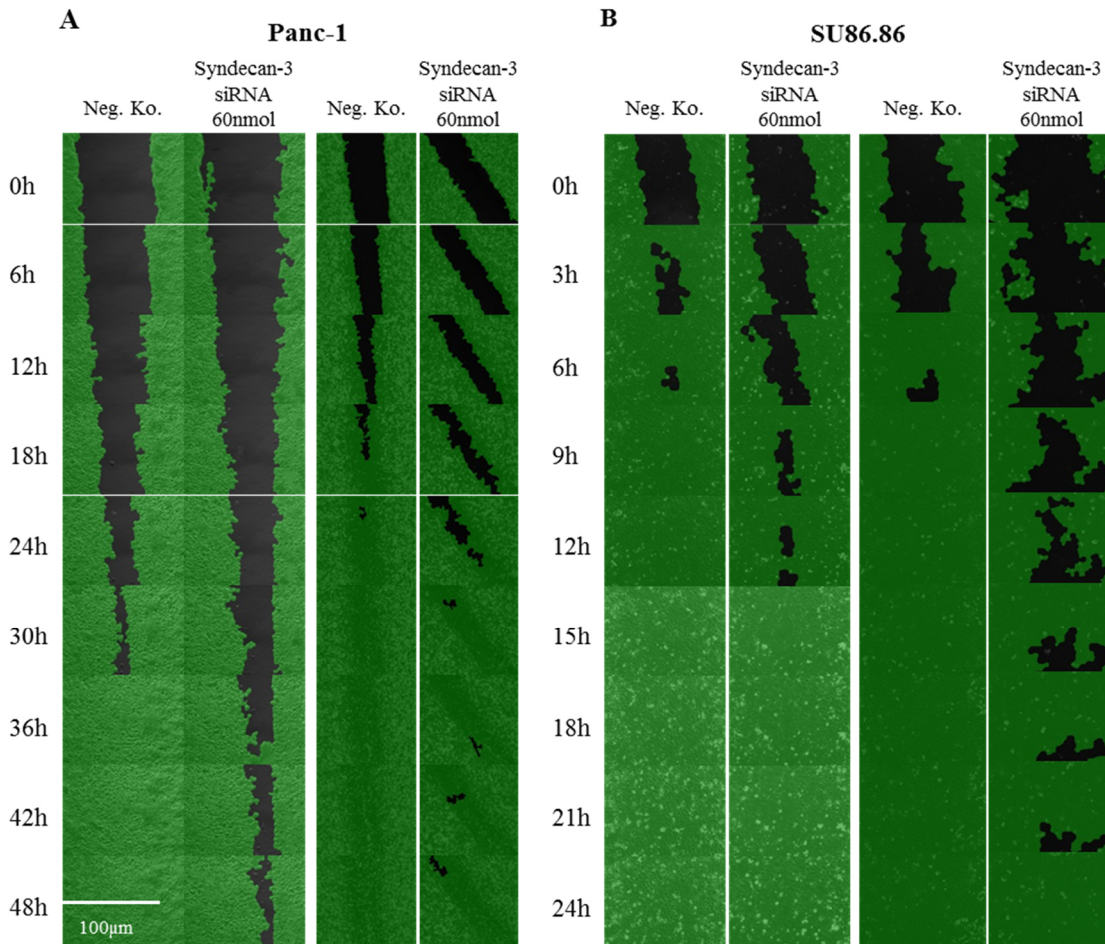
**Abbildung 12: Syndecan-3 in der Proliferation von Pankreaskarzinomzellen**

Syndecan-3 hat keinen Einfluss auf die Proliferation von PCC. Das Zellwachstum in den Zelllinien AsPc-1 (A), BxPc-3 (B), Colo-357 (C), Panc-1 (D) und SU86.86 erfolgt unabhängig vom Einsatz der spezifischen Syndecan-3 siRNA.

Neg. Ko. = Negativkontrolle

### **4.5.3 Einfluss von Syndecan-3 auf die Lokomotion von Pankreaskarzinomzellen**

Untersuchungen zur Lokomotion wurden im *Woundhealing*-Ansatz durchgeführt. Mittels Computer-gestützter Auswertung wurden die Auswirkungen der Syndecan-3 Inhibition auf das Migrationsverhalten der Pankreaskarzinomzellen untersucht. Hier zeigte sich eine Abnahme in der Lokomotion nach Syndecan-3 Inhibition: das Zeitintervall bis zum vollständigen Schluss der „Wunde“ im Zellrasen war größer als in der Negativkontrolle. Die bedeckte Fläche betrug in Panc-1 Negativkontrolle vs. Syndecan-3 siRNA: 51% vs. 33% nach 18 Stunden, 87% vs. 65% nach 36 Stunden (Abb. 13 A, C); in SU86.86: 72% vs. 42% nach 6 Stunden, 100% vs. 94% nach 18 Stunden (Abb. 13 B, D). Da die Einzelwerte der drei Replikate jedoch stark voneinander abwichen, ergab sich für die Differenz zwischen beiden Proben keine statistische Signifikanz. Auffällig war aber der Unterschied zwischen den Pankreaskarzinomzellen Linien. Unabhängig von der eingesetzten siRNA erreichten SU86.86 Pankreaskarzinomzellen den Wundverschluss in nahezu der Hälfte der Zeit, die die Panc-1 Zellen benötigten.



**Abbildung 13: Syndecan-3 in der Lokomotion von Pankreaskarzinomzellen**

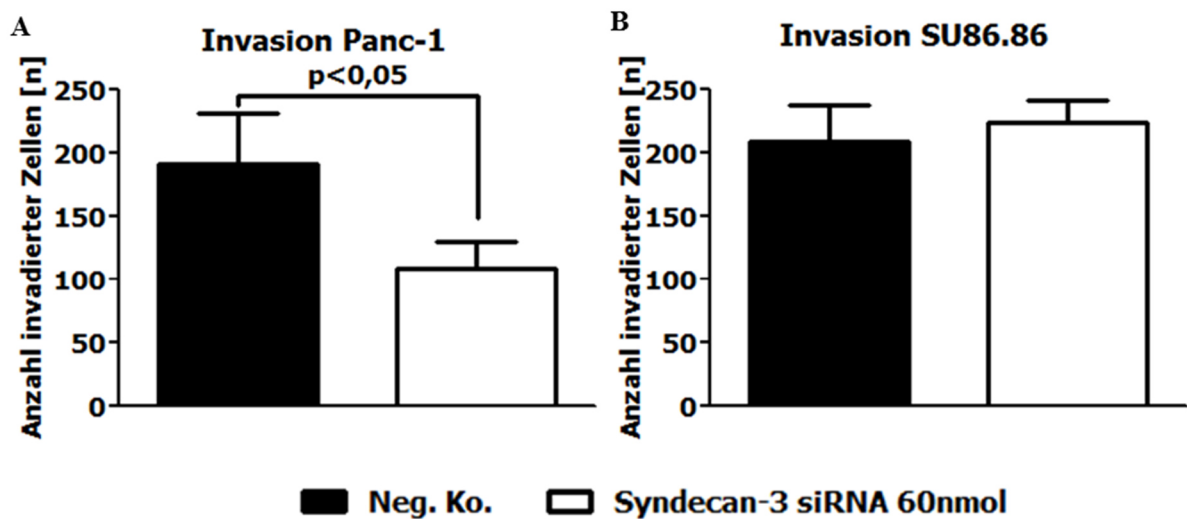
Die Lokomotion wurde im *Woundhealing*-Ansatz an Panc-1 (A, C) und SU86.86 (B, D) getestet. Der Einsatz spezifischer Syndecan-3 siRNA erzielte einen sichtbaren Effekt auf die Lokomotion der Zellen, blieb aber aufgrund der großen Differenzen der Replikate ohne statistische Signifikanz. Beachte die nahezu doppelte Dauer von Panc-1 gegenüber SU86.86 zum Bedecken der kompletten Fläche.

Neg. Ko. = Negativkontrolle



#### 4.5.4 Einfluss von Syndecan-3 auf die ungerichtete Invasion von Pankreaskarzinomzellen

Die Invasion der Pankreaskarzinomzellen zeigte ein uneinheitliches Bild. Panc-1 Pankreaskarzinomzellen, die per se eine erhöhte Basal-Expression von Syndecan-3 aufwiesen, zeigten nach Syndecan-3 Inhibition eine deutliche Abnahme der Invasion gegenüber der Negativkontrolle: Negativkontrolle  $192,0 \pm 87,4$  versus Syndecan-3 siRNA  $109,2 \pm 46,5$  (Mittelwert  $\pm$  SEM;  $p < 0,05$ ; Abb. 14 A). SU86.86 Pankreaskarzinomzellen zeigten keine signifikanten Veränderungen der Invasion in Abhängigkeit von der Syndecan-3-Expression: Negativkontrolle  $208,6 \pm 58,1$  versus Syndecan-3 siRNA  $223,4 \pm 35,6$  (Abb. 14 B).



**Abbildung 14: Syndecan-3 in der Invasion von Pankreaskarzinomzellen**

In der Messung der ungerichteten Invasion von Pankreaskarzinomzellen zeigte sich ein Unterschied zwischen den einzelnen Pankreaskarzinomzell-Linien. Panc-1 zeigte nach Einsatz der Syndecan-3 siRNA einen sichtbaren Abfall der Invasion (A). SU86.86 blieb dagegen konstant (B).

Neg. Ko. = Negativkontrolle

#### 4.5.5 Einfluss von Syndecan-3 auf die Nerv-gerichtete Migration von Pankreaskarzinomzellen

Die Syndecan-3 Expression korreliert mit dem Grad der neuralen Invasion im PDAC (Abb. 3) (Tardio, 2008). Um diesen Bezug auf funktionaler Ebene zu demonstrieren, wurde im 3D Neurale-Migration-Ansatz der Einfluss von Syndecan-3 auf die Nerv-induzierte Pankreaskarzinomzell-Invasion untersucht. Dazu wurde die Expression von Syndecan-3 in Panc-1 und SU86.86 Pankreaskarzinomzellen durch siRNA Transfektion gesenkt. Die Pankreaskarzinomzellen wurden mit frisch isolierten Spinalganglien aus neugeborenen Ratten konfrontiert. Per Videomikroskopie wurden die Bewegungen über 72 Stunden erfasst und die einzelnen Pankreaskarzinomzellen manuell verfolgt: an der Migrationsfront mit Ausrichtung auf die Neuronen der Spinalganglien und an der gegenüberliegenden Rückfront zum leeren ECM Gel (Ceyhan et al., 2008) (Abb. 4).

In diesem Ansatz zeigten weder native noch transfizierte Panc-1 Zellen eine Migration (Abb. 15 E, F). Entsprechend ergaben sich auch keine statistisch signifikanten Unterschiede nach Syndecan-3 Inhibition in Panc-1 Pankreaskarzinomzellen, weder über den einzelnen Fronten, noch in der Gesamtmotilität (Abb. 16, 17).

Euklidische Distanz (Abb. 16 A): Negativkontrolle Migrationsfront ( $20,0\mu\text{m} \pm 21,4\mu\text{m}$ ), Negativkontrolle Rückfront ( $24,2\mu\text{m} \pm 23,9\mu\text{m}$ ), Syndecan-3 inhibierte Panc-1 Zellen Migrationsfront ( $20,4\mu\text{m} \pm 21,8\mu\text{m}$ ), Syndecan-3 inhibierte Panc-1 Zellen Rückfront ( $20,8\mu\text{m} \pm 13,7\mu\text{m}$ ).

Geschwindigkeit (Abb. 16 B): Negativkontrolle Migrationsfront ( $0,20\mu\text{m}/\text{min} \pm 0,18\mu\text{m}/\text{min}$ ), Negativkontrolle Rückfront ( $0,16\mu\text{m}/\text{min} \pm 0,10\mu\text{m}/\text{min}$ ), Syndecan-3 inhibierte Panc-1 Zellen Migrationsfront ( $0,15\mu\text{m}/\text{min} \pm 0,11\mu\text{m}/\text{min}$ ), Syndecan-3 inhibierte Panc-1 Zellen Rückfront ( $0,15\mu\text{m}/\text{min} \pm 0,07\mu\text{m}/\text{min}$ ).

Linearität (Abb. 16 C): Negativkontrolle Migrationsfront ( $0,20 \pm 0,16$ ), Negativkontrolle Rückfront ( $0,27 \pm 0,22$ ), Syndecan-3 inhibierte Panc-1 Zellen Migrationsfront ( $0,20 \pm 0,11$ ), Syndecan-3 inhibierte Panc-1 Zellen Rückfront ( $0,23 \pm 0,16$ ).

*Forward Migration Index* (Abb. 16 D): Negativkontrolle Migrationsfront ( $0,10 \pm 0,19$ ), Negativkontrolle Rückfront ( $0,15 \pm 0,28$ ), Syndecan-3 inhibierte Panc-1 Zellen Migrationsfront ( $0,05 \pm 0,17$ ), Syndecan-3 inhibierte Panc-1 Zellen Rückfront ( $0,13 \pm 0,19$ ).

Die Ergebnisse des 3D-Migration-Ansatz wurden im Weiteren für eine differenzierte Analyse der Gesamtmotilität der Pankreaskarzinomzellen verwendet (Abb. 17 und 19). Dazu wurden die Werte der Migrationsfront und der Rückfront zusammengefügt. In Syndecan-3

inhibierten Panc-1 Zellen zeigte sich dabei, ebenso wie für die Einzelfronten, kein signifikanter Unterschied: Euklidische Distanz (Negativkontrolle  $27,3\mu\text{m} \pm 22,8\mu\text{m}$  vs. Syndecan-3 siRNA  $24,0\mu\text{m} \pm 19,1\mu\text{m}$ ; Abb. 17 A), Geschwindigkeit ( $0,18\mu\text{m}/\text{min} \pm 0,15\mu\text{m}/\text{min}$  vs.  $0,15\mu\text{m}/\text{min} \pm 0,09\mu\text{m}/\text{min}$ ; Abb. 17 B) die Linearität ( $0,23 \pm 0,20$  vs.  $0,21 \pm 0,14$ ; Abb. 17 C) und *Forward Migration Index* ( $0,13 \pm 0,24$  vs.  $0,09 \pm 0,18$ ; Abb. 17 D).

Im starken Kontrast dazu wanderten SU86.86 Zellen zielgerichtet auf die Neuronen der Spinalganglien zu, während die Migration an der Rückfront (Kontrollfront) nur gering ausfiel (Abb. 18 A-D). Zwischen der Negativkontrolle und den Syndecan-3 inhibierten SU86.86 Zellen traten dabei signifikante Unterschiede im Migrationspotential auf.

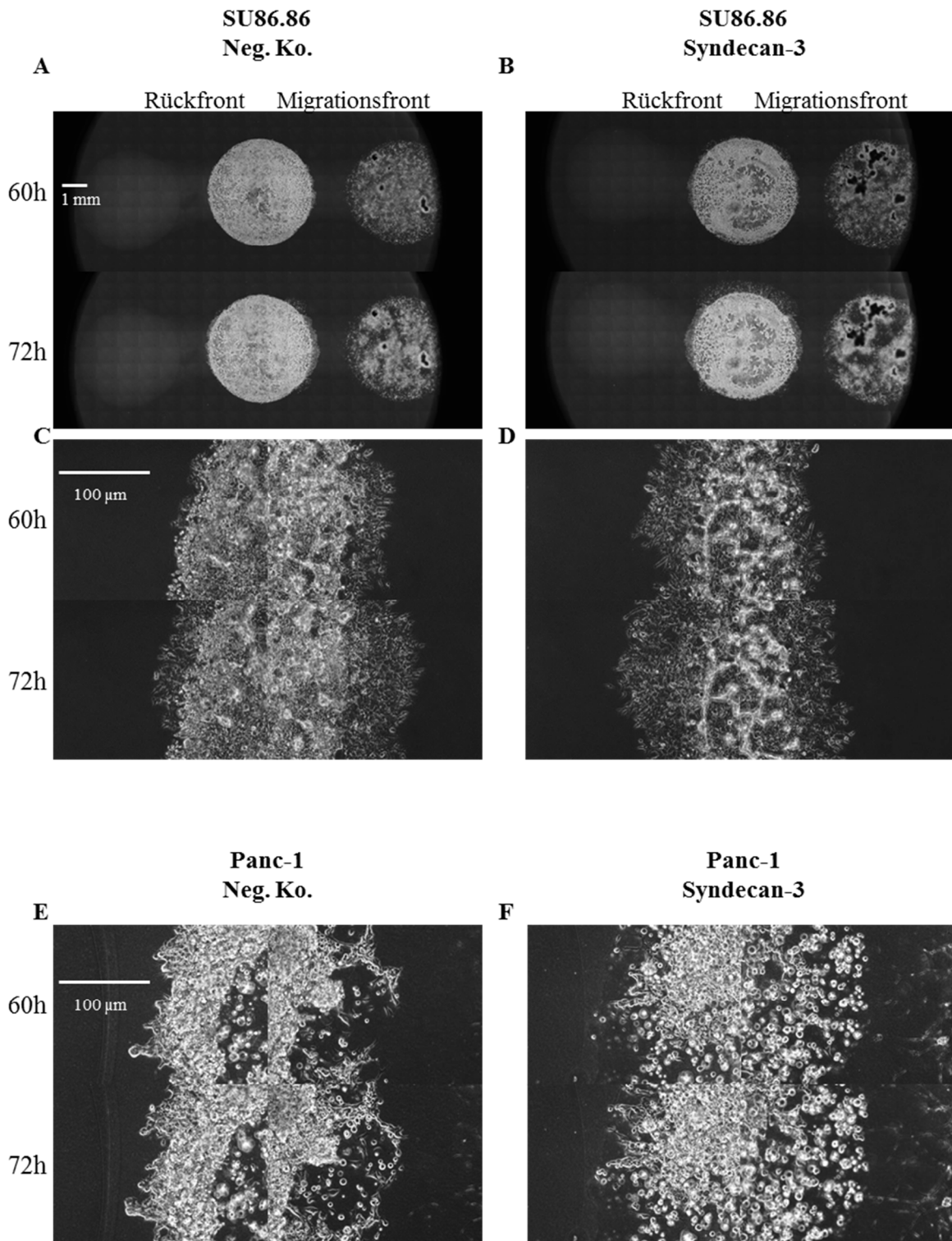
Euklidische Distanz (Abb. 18 A): Im Vergleich zur Negativkontrolle ( $44,6\mu\text{m} \pm 16,2\mu\text{m}$ ) legten Syndecan-3 inhibierte SU86.86 Zellen signifikant kürzere Entfernungen in Richtung der Nerven zurück ( $30,9\mu\text{m} \pm 17,1\mu\text{m}$ ;  $p < 0,001$ ). Wie spezifisch dieser Unterschied war, zeigte der Vergleich der Rückfronten von Negativkontrolle ( $29,4\mu\text{m} \pm 12,8\mu\text{m}$ ) und Syndecan-3 inhibierten SU86.86 Zellen ( $28,3\mu\text{m} \pm 16,0\mu\text{m}$ ) mit nahezu gleichen Werten.

Geschwindigkeit (Abb. 18 B): An der Migrationsfront trat kein signifikanter Unterschied zwischen Negativkontrolle ( $0,36\mu\text{m}/\text{min} \pm 0,15\mu\text{m}/\text{min}$ ) und Syndecan-3 inhibierten Zellen ( $0,33\mu\text{m}/\text{min} \pm 0,16\mu\text{m}/\text{min}$ ) auf. An der Rückfront hingegen lag die Geschwindigkeit der Negativkontrolle ( $0,26\mu\text{m}/\text{min} \pm 0,11\mu\text{m}/\text{min}$ ;  $p < 0,001$ ) unter dem Wert der Syndecan-3 inhibierten Zellen ( $0,34\mu\text{m}/\text{min} \pm 0,13\mu\text{m}/\text{min}$ ).

Linearität (Abb. 18 C): Im Gegensatz zur Negativkontrolle ( $0,26 \pm 0,10$ ;  $p < 0,01$ ) wurde die Linearität der Migration in den Syndecan-3 inhibierten Pankreaskarzinomzellen ( $0,20 \pm 0,11$ ) nahezu aufgehoben. Auch an der Rückfront war im Vergleich mit der Negativkontrolle ( $0,24 \pm 0,11$ ;  $p < 0,001$ ) die Linearität in Syndecan-3 inhibierten SU86.86 Zellen gesenkt ( $0,18 \pm 0,10$ ).

*Forward Migration Index* (Abb. 18 D): Der *Forward Migration Index* ist der wichtigste Parameter in der Analyse der Neuroaffinität von Krebszellen. Entsprechend zeigten sich Unterschiede nach Syndecan-3 Inhibition. An der Migrationsfront der Negativkontrolle ( $0,23 \pm 0,10$ ;  $p < 0,05$ ) zeigten die SU86.86 Zellen eine hohe Neuroaffinität mit einer sichtbaren Abnahme in Syndecan-3 inhibierten SU86.86 Zellen ( $0,18 \pm 0,12$ ). Auch an der Rückfront war die Ausrichtung der Negativkontrolle ( $0,21 \pm 0,12$ ;  $p < 0,001$ ) stärker ausgeprägt als in Syndecan-3 inhibierten SU86.86 Zellen ( $0,15 \pm 0,11$ ).

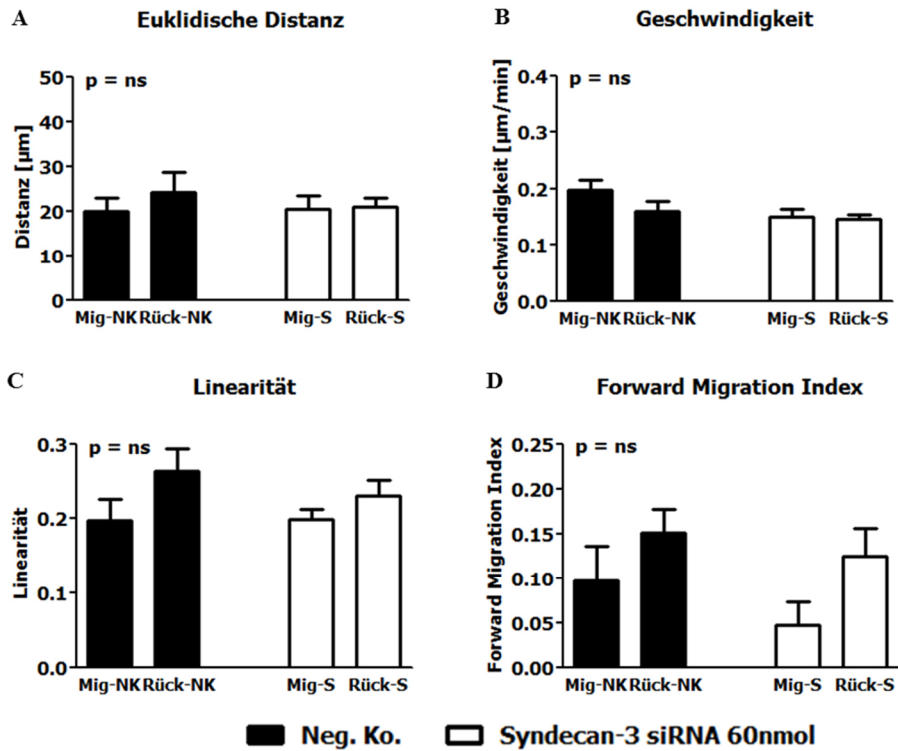
In der Analyse der Gesamtmotilität zeigte sich ebenfalls, dass in Syndecan-3 inhibierten SU86.86 Zellen die Euklidische Distanz (Negativkontrolle  $37,0\mu\text{m} \pm 16,4\mu\text{m}$  vs. Syndecan-3 siRNA  $29,6\mu\text{m} \pm 16,6\mu\text{m}$ ;  $p < 0,0001$ ; Abb. 19 A), die Linearität ( $0,25 \pm 0,11$  vs.  $0,19 \pm 0,11$ ;  $p < 0,0001$ ; Abb. 19 C) und der *Forward Migration Index* ( $0,22 \pm 0,11$  vs.  $0,17 \pm 0,12$ ;  $p < 0,0001$ ; Abb. 19 D) signifikant sanken. Jedoch lag die Geschwindigkeit der Syndecan-3 inhibierten SU86.86 Zellen ( $0,33\mu\text{m}/\text{min} \pm 0,15\mu\text{m}/\text{min}$  vs.  $0,31\mu\text{m}/\text{min} \pm 0,14\mu\text{m}/\text{min}$ ;  $p < 0,05$ ; Abb. 19 B) signifikant höher als in der Negativkontrolle.



**Abbildung 15: Messung der Nerv-gerichteten Migration**

Die Bewegung von SU86.86 (A-D) und Panc-1 (E, F) Pankreaskarzinomzellen zu leerem ECM-Gel (Rückfront) und DRG-Nerven (Migrationsfront) wurde videographisch erfasst und an den Fronten manuell ausgezählt (C-F). Im Gegensatz zu SU86.86 zeigten Panc-1 Pankreaskarzinomzellen keine Bewegung.

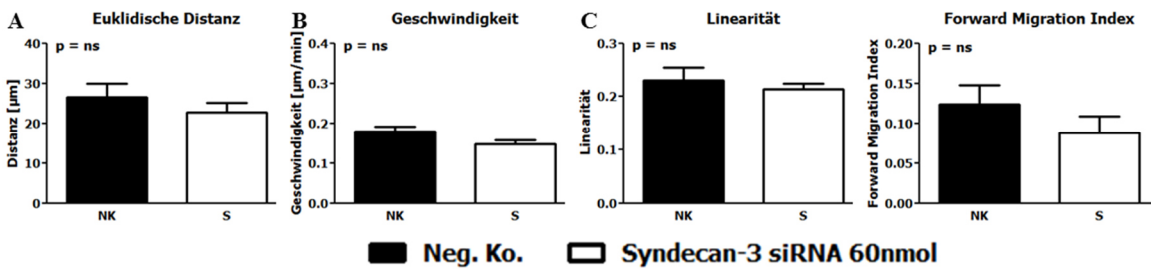
Panc-1 PCC



**Abbildung 16: Syndecan-3 in der Nerv-gerichteten Migration von Panc-1 Pankreaskarzinomzellen**

Panc-1 Pankreaskarzinomzellen lassen keine Nerv-gerichtete Migration erkennen. Der Einsatz der spezifischen Syndecan-3 siRNA nimmt keinen Einfluss auf euklidische Distanz (A), Geschwindigkeit (B), Linearität (C) und FMI (D) der Pankreaskarzinomzellen zu den Nerven.

Mig-NK = Migrationsfront Negativkontrolle, Rück-NK = Rückfront Negativkontrolle, Mig-S = Migrationsfront Syndecan-3 siRNA, Rück-S = Rückfront Syndecan-3 siRNA

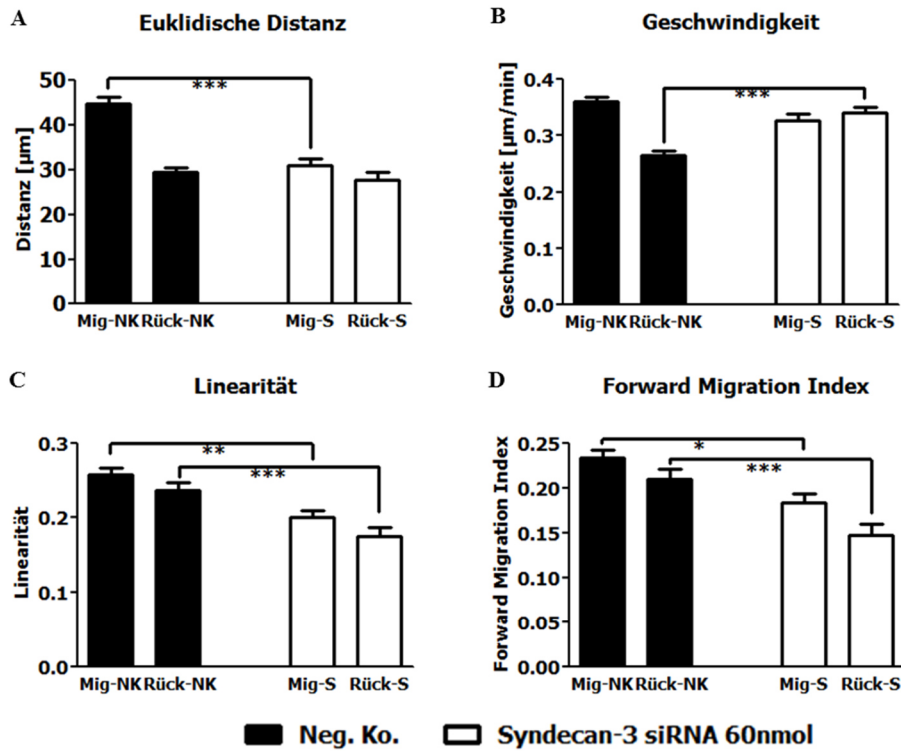


**Abbildung 17: Syndecan-3 in der Gesamtmotilität von Panc-1 Pankreaskarzinomzellen**

Zur quantitativen Darstellung der Gesamtmotilität werden Migrationsfront und Rückfront zusammengefügt. Auch hier zeigen sich keine Unterschiede in Bezug auf Euklidische Distanz (A), Geschwindigkeit (B), Linearität (C) und *Forward Migration Index* (D).

NK = Negativkontrolle, S = Syndecan-3 siRNA.

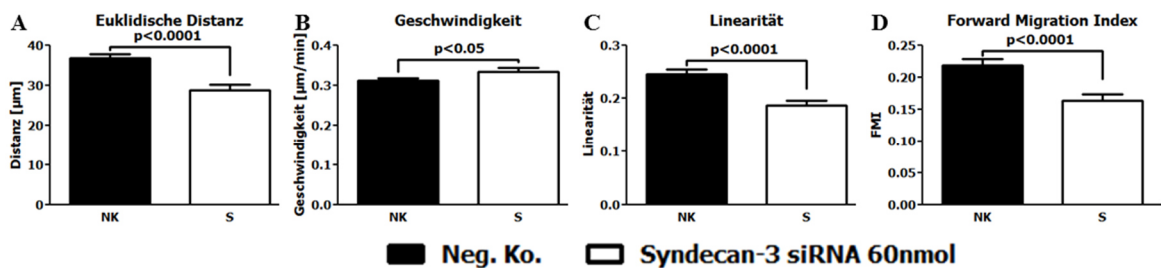
SU86.86 PCC



**Abbildung 18: Syndecan-3 in der Nerv-gerichteten Migration von SU86.86 Pankreaskarzinomzellen**

Die Nerv-gerichtete Migration von PCC zeigt eine signifikante Abhängigkeit von Syndecan-3. Nach Einsatz der spezifischen Syndecan-3 siRNA sinken euklidische Distanz (A), Linearität (C) und FMI (D) der PCC zu den Nerven. Die Geschwindigkeit (B) zeigt an der Migrationsfront keine Abhängigkeit von der Transfektion. An der Rückfront kommt es infolge der Syndecan-3 Inhibition ebenfalls zu einer gesenkten Fokussierung der PCC (C, D).

Mig-NK = Migrationsfront Negativkontrolle, Rück-NK = Rückfront Negativkontrolle, Mig-S = Migrationsfront Syndecan-3 siRNA, Rück-S = Rückfront Syndecan-3 siRNA. \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ , \*\*\* =  $p < 0,001$ .



**Abbildung 19: Syndecan-3 in der Gesamtmotilität von SU86.86 Pankreaskarzinomzellen**

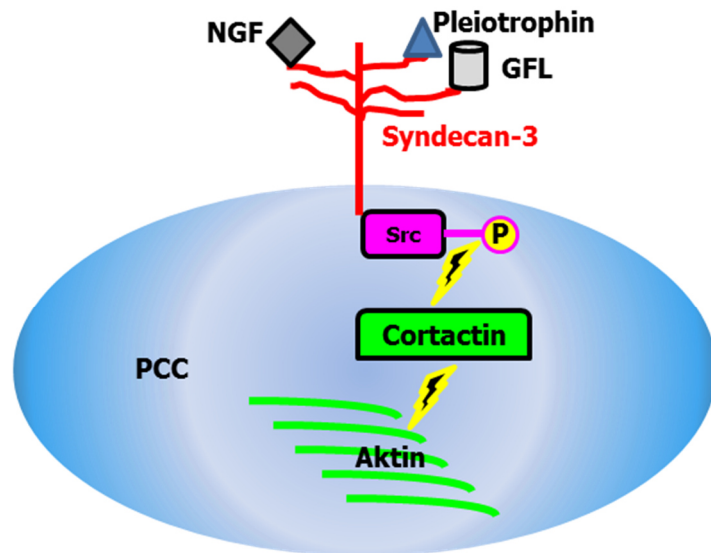
Zur quantitativen Darstellung der Lokomotion werden Migrationsfront und Rückfront zusammengefügt. Die Analyse bestätigt die Abnahme der Distanz (A) und Fokussierung (C, D) von PCC nach Einsatz der spezifischen Syndecan-3 siRNA. Im Gegenzug steigt die Geschwindigkeit (B) in Form einer ungerichteten Bewegung.

NK = Negativkontrolle, S = Syndecan-3 siRNA.

## 4.6 Intrazelluläre Signalweiterleitung von Syndecan-3

Mehrere Interaktionen von Syndecanen mit zytoplasmatischen Signalwegen wurden bereits beschrieben (Hienola et al., 2006; T. Kinnunen et al., 1998; Lambaerts et al., 2009). Die Signalweiterleitung von Syndecan-3 über Cortactin nimmt eine bedeutende Rolle im Verständnis für die Funktion der Proteoglykane auf die Zellmigration und ihre Auswirkungen auf das Aktinzytoskelett ein (T. Kinnunen et al., 1998). In diesen Signalweg ist an früher Stelle die Rezeptortyrosinkinase Src eingebaut (Abb. 20). Die Phosphorylierung von Src führt zu einer Aktivierung von Cortactin, das wiederum den *Actin related protein 2/3* (Arp2/3) Komplex bindet (Abb. 20). Dieser Stimulus bewirkt eine Umbildung der Aktinfilamente und fördert dadurch die Zellmigration (Urano et al., 2001; Weaver et al., 2001). Um die Wirkung von Syndecan-3 auf zytoplasmatische Signalwege in Pankreaskarzinomzellen zu untersuchen, wurde die Phosphorylierung von Src in Pankreaskarzinomzellen nach Syndecan-3 Inhibition analysiert. SU86.86 Zellen, die bereits einen Effekt von Syndecan-3 auf die Migration gezeigt hatten, wurden zum optimalen Wirkungszeitpunkt von 72 Stunden nach Transfektion untersucht. Der Einfluss der Syndecan-3 Inhibition auf die Aktivität von Src wurde im *Immunoblot* mit Antikörpern gegen die Src-Phosphatbindungsstelle Tyr416 untersucht. In der Anordnung von unbehandelten Pankreaskarzinomzellen, Negativkontrolle, niedrigen (20nmol) und hohen Mengen an Syndecan-3 spezifischer siRNA (60nmol) wurde eine signifikante Abnahme des phosphorylierten Src in Syndecan-3 inhibierten SU86.86 Zellen sichtbar ( $p < 0,05$ ; Abb. 21 A, B). Das endogene Src zeigte dabei keine Differenz (ns; Abb. 21 C, D). Die Expression von nicht-phosphoryliertem Src in SU86.86 zeigte einen gegenläufigen Trend mit geringen Mengen in der Negativkontrolle und einem hohen Betrag in der Syndecan-3 siRNA Zellgruppe. Diese Tendenz erreichte jedoch keine statistische Signifikanz (ns, Abb. 21 E, F).



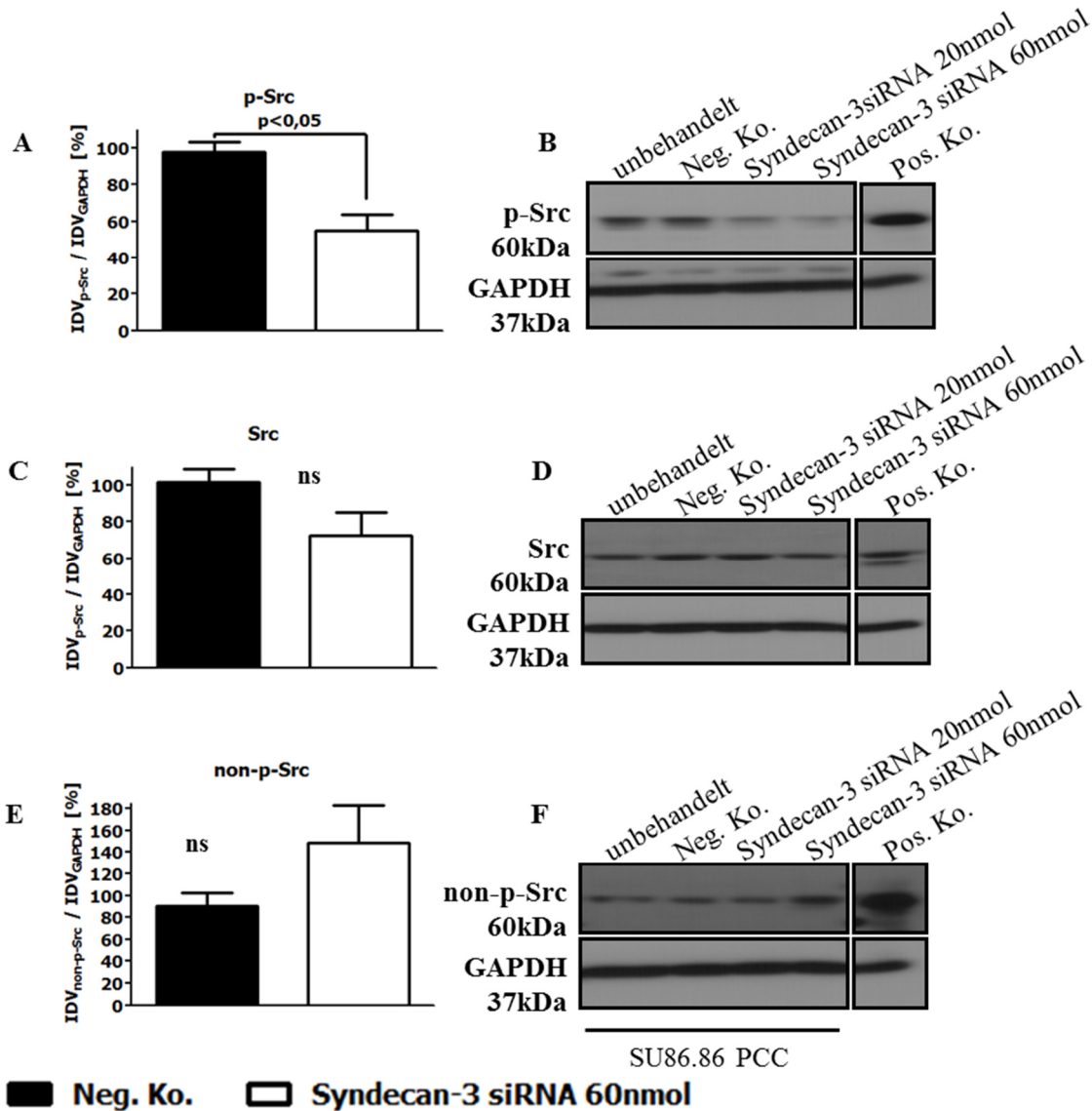


**Abbildung 20: Signalweg von Syndecan-3 in der Migration von Pankreaskarzinomzellen**

An der Zelloberfläche bindet Src Wachstumsfaktoren und leitet die Signale über die PDZ-Domäne an die Tyrosinkinase Src. Nach Aktivierung durch Phosphorylierung wird über Cortactin das Aktinzytoskelett stimuliert und induziert die Migration von Pankreaskarzinomzellen.

PCC = Pankreaskarzinomzellen

SU86.86 PCC



**Abbildung 21: Einfluss von Syndecan-3 auf intrazelluläres Src in SU86.86 Pankreaskarzinomzellen**

Die Aktivierung von Src erfolgt in Abhängigkeit von Syndecan-3. Durch den Einsatz spezifischer Syndecan-3 siRNA nimmt die Phosphorylierung von Src signifikant ab (A, B), bei stabilem endogenem Src (C, D). Im Gegenzug zeigt das nicht phosphorylierte Src eine Tendenz zur Zunahme nach Einsatz der Syndecan-3 siRNA (E, F).

p-Src = phosphoryliertes Src, non-p-Src = nicht phosphoryliertes Src, Neg. Ko. = Negativkontrolle, Pos. Ko. = Positivkontrolle, PCC = Pankreaskarzinomzellen

## 5 Diskussion

In der vorliegenden Dissertation wurde erstmals die Bedeutung des Membranrezeptors Syndecan-3 im Pankreaskarzinom als Mediator zwischen Krebszellen und Nerven untersucht. Die Expression von Syndecan-3 im PDAC scheint in der Interaktion zwischen den Karzinomzellen und den intrapankreatischen Nerven eine wichtige Rolle in der Entstehung der neuralen Invasion zu spielen. Syndecan-3 hat offenbar eine spezifische Wirkung auf die Motilität der Pankreaskarzinomzellen. Als Rezeptor neuraler Wachstumsfaktoren ermöglicht es die Nerv-gerichtete Migration von Pankreaskarzinomzellen, ohne dabei andere biologische Funktionen, wie Proliferation, Lokomotion und Invasion entscheidend zu beeinflussen. Darüber hinaus zeigt Syndecan-3 eigenständige Effekte auf intrazelluläre Signalwege. In der Konsequenz steht den Pankreaskarzinomzellen somit über die bisher bekannten Ligand-Rezeptor Interaktionen hinaus, ein weiterer, alternativer Pfad zum Aktinzytoskelett zur Verfügung, der die Nerv-gerichtete Migration der Zellen entscheidend stimuliert. Zudem deutet die hohe Expression von Syndecan-3 in den intrapankreatischen Nerven auf eine Aktivierung der Neuronen zur entgegengesetzten Migration auf die Pankreaskarzinomzellen, die beschleunigend auf die Ausbreitung der Krebszellen in das Pankreas und über die Grenzen des Organs hinaus wirkt.

Syndecan-3 verfügt über Seitenäste, die zur Bindung von Liganden wie der GFL dienen. Zur Analyse der molekularen Struktur von Syndecan-3 wurde Heparinase eingesetzt. Dieses Enzym tritt auch in vivo in Tumoren auf und wirkt sich auf die Metastasierung der Krebszellen aus. Durch die Aktivität der Heparinase als Endoglykosidase werden die HSPG aufgelöst. Dadurch geht die Vernetzung des Gewebes verloren, die von der Interaktion von HSPG und Kollagen Typ IV in der Basalmembran maßgeblich bestimmt wird (M. Nakajima, Irimura, & Nicolson, 1988). Eine erhöhte Aktivität von Heparinase findet sich in einer Vielzahl von Neoplasien, darunter dem PDAC, wo sie neben der Metastasierung auch die Angiogenese des Tumors fördert und die Überlebensrate senkt (Ostapoff et al., 2013). Daten aus dem Multiplen Myelom deuten darauf hin, dass die Funktion der Heparinase eng mit dem *Shedding* von Syndecanen verknüpft ist (Ramani et al., 2013): durch Abtrennung der Heparansulphat Ketten (Abb. 2) wird das Kernprotein von Syndecan-1 zugänglicher für MMP, deren Expression wiederum von der Heparinase aktiviert wird. Die proteolytische Wirkung der MMP bewirkt die Lösung von Syndecan-1 von der Zelloberfläche. In freier Form diffundiert Syndecan-1 in die ECM und fördert durch die Bindung von Wachstumsfaktoren die Entwicklung des Tumors.

Eine *in vivo* Interaktion mit Heparinase und den MMP wäre aufgrund der vorgelegten Ergebnisse und folgender Daten auch für Syndecan-3 im PDAC denkbar:

- Erstens zeigt der enzymatische Verdau mit Heparinase einen sichtbaren Effekt auf die Struktur von Syndecan-3.
- Zweitens bewirken sowohl NGF als auch GDNF, die im PDAC beide eng mit Syndecan-3 korrelieren (Tabelle 2), eine Hochregulierung der MMP (Liebig et al., 2009). Die Wirkung von MMP auf das *Shedding* von Syndecan-3 wurde in humanen Schwann'schen Zellen im PNS gezeigt. Die Hemmung dieses Prozesses induziert dabei eine erhöhte Adhäsion der Zellen (Asundi, Erdman, Stahl, & Carey, 2003).
- Drittens konnten Ding et al. das *Shedding* von Syndecan-1 im PDAC beweisen und schlussfolgerten, dass die wesentlichen, krebsbegünstigenden Effekte auf die abgetrennte Form der Syndecane zurückzuführen sind (Ding, Lopez-Burks, Sanchez-Duran, Korc, & Lander, 2005). Die Experimente wurden interessanterweise an Panc-1 Zellen durchgeführt, die neben der hohen Syndecan-1 Expression auch hohe Werte von Syndecan-3 sowie von MMP aufweisen (Ellenrieder et al., 2000).

Fortgeführt wurden diese Gedanken durch eine aktuelle Studie, die zeigt, dass *Shedding* von Syndecan-1 unter anderem im Pankreaskarzinom durch den Einsatz von Chemotherapie induziert wird und zu einem Rezidiv des Tumors führen kann (Ramani & Sanderson, 2013). Die Autoren sehen darin die Indikation zur therapeutischen Anwendung von MMP-Inhibitoren zur Hemmung des *Shedding*, während der laufenden Chemotherapie.

Das *Shedding* von Syndecanen hat regulierende Eigenschaften. Wie Lebakken et al. am Beispiel von Syndecan-1 zeigten, sind die transmembranäre und extrazelluläre Domäne der Syndecane essentiell für die Induktion der Zellausbreitung (Lebakken & Rapraeger, 1996). Entsprechend dieser Funktion führt die Abtrennung der extrazellulären Domäne durch das *Shedding* von Syndecan-3 zur Herabsetzung der Signalweiterleitung (Abb. 2) (Manon-Jensen, Itoh, & Couchman, 2010). Bei einer künstlich induzierten Überexpression von Syndecan-3 wäre zu erwarten, dass die Zelle von ihrer Fähigkeit zum *Shedding* Gebrauch macht, um sich des überflüssigen Syndecan-3 zu entledigen. Das in dieser Dissertation eingesetzte Plasmid erreichte in der Tat keine stabile Überexpression in den Pankreaskarzinomzellen. Gemäß der Hypothese des *Shedding* kam es zu einer Zunahme von Syndecan-3 im Überstand. Drei Banden waren darin prominent und zeigen vermutlich folgende Formen von Syndecan-3: die abgetrennte, aktive Form knapp unterhalb der ursprünglich prominenten Bande von rund 70kDa, das Dimer bei 90kDa und ein Oligomer bei rund 180kDa. Beim *Shedding* wird die

extrazelluläre Domäne durch Proteolyse von der Zelloberfläche gelöst (Manon-Jensen et al., 2010). Die Detektion einer Bande nach Transfektion unterhalb der ursprünglichen Größe spiegelt höchstwahrscheinlich die abgetrennte extrazelluläre Domäne wider und dient als gute Erklärung für die Detektion von Syndecan-3 mit dem Antikörper sc15349, der gegen die extrazelluläre Domäne gerichtet ist (Abb. 8). Erstaunlicherweise detektierte aber auch der gegen die zytoplasmatische Domäne gerichtete Antikörper ab63932 vergleichbare Werte im Überstand. Diese Beobachtung reicht über das *Shedding* hinaus, bei dem nur die extrazelluläre Domäne abgetrennt wird und in die ECM diffundiert. Derzeit lassen sich in der Fachliteratur keinerlei vergleichbare Ergebnisse zur Sekretion kompletter Syndecan-3 Moleküle finden. Ein von außen eingeleiteter Effekt durch die Plasmidtransfektion ist mit hoher Wahrscheinlichkeit ursächlich dafür. Zugleich schließen die Ergebnisse aber nicht aus, dass die Sekretion ganzer Syndecan-3 Moleküle einen alternativen Weg in der Lösung der Zelle von überschüssigem Syndecan-3 darstellt.

Die hohe Expression von Syndecan-3 im PDAC findet sich neben den Pankreaskarzinomzellen auch besonders ausgeprägt in intrapancreatischen Nerven (Abb. 9). Sowohl die Intensität als auch das Muster der Färbung deuten auf eine bedeutende Rolle für Syndecan-3 innerhalb der Nerven hin. Umso wichtiger erscheint deshalb die Frage, von welcher Zellpopulation die hohen Werte ausgehen. Im Gegensatz zu Befunden aus der Leber und dem PNS, in denen Syndecan-3 eindeutig in humanen Schwann'schen Zellen lokalisiert wurde (Goutebroze, Carnaud, Denisenko, Boutterin, & Girault, 2003; Roskams, Rosenbaum, De Vos, David, & Desmet, 1996), findet sich in den analysierten Nerven des PDAC keine Überlappung mit dem humanen Schwann-Zell-Marker S100 (T. Nakajima et al., 1982). Die Doppelfärbung der Nerven mit Syndecan-3 und p75 zeigt noch deutlicher, dass Syndecan-3 zwar in unmittelbarer Nähe der gefärbten Strukturen liegt, aber nicht von diesen ausgeht.

Auffallend ist die starke perineurale Färbung der Nerven durch p75, bekannt aus dem PNS (Liang, Marcusson, & Johansson, 1999), die Syndecan-3 direkt anhaftet. Ketterer et al. zeigten, dass Werte des NGF-Rezeptors p75 in intrapancreatischen Nerven, die mit neuraler Invasion durch Pankreaskarzinomzellen gekennzeichnet sind, deutlich höher liegen als in nicht befallenen Nerven (Ketterer et al., 2003). Die Autoren folgerten daraus, dass p75 zur Reparatur verletzter Nerven hochreguliert wird. Die räumlich enge Beziehung beider Rezeptoren im Nerv, insbesondere im Perineurium, sowie die Korrelation von Syndecan-3 mit NGF, dem Liganden von p75, deuten auf folgende, mögliche Interaktion von Syndecan-3, NGF und p75 im Prozess der neuralen Invasion hin:

- Durch mechanische Schädigung der Nerven während der neuralen Invasion wird neben p75 auch Syndecan-3 zur Bindung von NGF vermehrt exprimiert mit dem Ziel der neuralen Regeneration.
- Aufgrund seiner stimulierenden Wirkung auf Pankreaskarzinomzellen zieht Syndecan-3 weitere Pankreaskarzinomzellen an und begünstigt dadurch die weitere neurale Invasion.

Ein weiterer getesteter Marker ist der Glukosetransporter Glut-1. Über die Aktivierung von MMP bewirkt die Expression von Glut-1 eine erhöhte Invasionsfähigkeit von Pankreaskarzinomzellen (H. Ito, Duxbury, Zinner, Ashley, & Whang, 2004). Durch die vermehrte Aufnahme von Glukose in die Krebszellen führt die Expression von Glut-1 zudem zu gesteigertem Tumorwachstum und Aggressivität (Basturk et al., 2011). Innerhalb von Nerven markiert Glut-1 das Perineurium (Hirose et al., 2003). Die Doppelfärbung von Glut-1 und Syndecan-3 zeigt auffallend große Ähnlichkeit mit dem Ergebnis der Syndecan-3 und p75-Färbung. p75 ist im Pankreas als Regulator des Glukosestoffwechsels bekannt (Baeza-Raja et al., 2012). Entsprechend liefert die Doppelfärbung von p75 und Glut-1 im Perineurium eine Überlappung der Signale (Daten nicht dargestellt). Aufgrund der fehlenden Ko-Lokalisation von Syndecan-3 mit Glut-1, können die perineuralen Epithelzellen jedoch als Ursprung der Syndecan-3 Expression mit großer Sicherheit ausgeschlossen werden.

Die Doppelfärbung von Syndecan-3 mit  $\beta$ -Tubulin III, Marker von Nervenzellen zeigt ebenso keine Überlappung der Signale. Dieses Ergebnis ist erstaunlich vor dem Hintergrund der intensiven Verknüpfung von Syndecan-3 mit dem Nervensystem.

Der Fibroblastenmarker Vimentin hat im Perineurium keinen Bezug zu Syndecan-3. Die Färbung des Endoneuriums hingegen enthält Areale mit reiner Fibroblastenfärbung, vereinzelt aber auch erste Ähnlichkeiten mit dem Netzwerk von Syndecan-3.

Wesentlich größer ist die Analogie der Syndecan-3 Färbung zum Marker CD34. Auch diese Doppelfärbung liefert keine Überlagerung der Signale. Die Muster von Syndecan-3 und CD34 zeigen aber die größte Ähnlichkeit unter allen getesteten Markern. Auffallend ist das komplementäre Profil. CD34 findet sich auf hämatopoetischen Zellen, im Endothel, auf Fibroblasten und Immunzellen. Zudem ist CD34 ein passager exprimierter Marker des unreifen Stadiums der Zelle und findet sich deshalb zeitweise in Stammzellen (Sutherland & Keating, 1992).

Mehrere Erklärungsansätze für das ähnliche Färbemuster beider Marker werden hier präsentiert:

CD34 als Marker endoneuraler Fibroblasten: Beobachtungen aus dem PNS stützen die Annahme, dass es sich bei den mit CD34 detektierten Strukturen innerhalb der intrapancreatischen Nerven um endoneurale Fibroblasten handeln könnte. In den Nervenscheiden des PNS stellen diese eine eigene Zellpopulation neben humanen Schwann'schen Zellen und perineuralen Epithelzellen dar und treten gehäuft nach Läsionen der Nervenscheide auf (Hirose et al., 2003). Darauf basierend lässt sich ein Erklärungsansatz für die starke Expression von Syndecan-3 in intrapancreatischen Nerven entwickeln: die Schädigung der Nerven durch eindringende Pankreaskarzinomzellen aktiviert endoneurale Fibroblasten. Dies bedingt eine Hochregulation von Syndecan-3, das zur Regeneration der Neuronen Wachstumsfaktoren wie Pleiotrophin bindet, auf ähnliche Weise wie in der Induktion neuraler Sprossung im ZNS (A. Kinnunen et al., 1999). Durch das *Shedding* wird Syndecan-3 abgetrennt und diffundiert in die ECM, um weitere Wachstumsfaktoren zu binden (Abb. 2). In diesem Milieu entstehen günstige Bedingungen für Pankreaskarzinomzellen, die letztendlich eine Steigerung der neuralen Invasion verursachen (Abb. 1).

CD34 als Marker neuraler Stammzellen: Die ursprünglich hämatopoetischen CD34+ Zellen sind in der Lage, sich in Nervenzellen zu differenzieren (Reali et al., 2006). Inatani et al. präsentierten eine Hochregulierung von Syndecan-3 in neuralen Stammzellen (Inatani et al., 2001). Darüber hinaus zeigen bisherige Untersuchungen in Nerven des PDAC eine Zunahme des neuralen Stammzell-Markers Nestin bei gleichzeitiger Abnahme des glialen Transkriptionsfaktor Sox-10 (Ceyhan, Demir, et al., 2009). Sailer et al. beschrieben nach Stimulation mit FGF-2 eine gesteigerte Migration und Invasion der sonst kaum beweglichen neuralen Stammzellen, verbunden mit erhöhter Expression von p75 (Sailer et al., 2013). Parallel zur Induktion des invasiven Phänotyps weisen die Zellen einen Rückgang in der Proliferationskapazität und Differenzierung auf, gemessen an mehreren Markern, darunter Sox-10 (Sailer et al., 2013). In Übertragung auf die neurale Invasion im PDAC deuten diese Ergebnisse auf eine potentielle Interaktion von Syndecan-3 mit CD34+ neuralen Stammzellen im PDAC hin, gestützt durch folgende Argumente:

- Erstens bindet FGF-2 im ZNS mit hoher Affinität an Syndecan-3 (Chernousov & Carey, 1993). Im PDAC sind entsprechende Daten zwar nur für Syndecan-1 verfügbar, legen aber zusätzlich nahe, dass FGF-2 das *Shedding* von Syndecanen via MMP induziert (Ding et al., 2005). Syndecan-3 würde somit, als möglicher Rezeptor von FGF-2 im PDAC, CD34+ neurale Stammzellen intrapancreatischer Nerven zur Migration stimulieren.

- Zweitens limitiert die Inhibition von Syndecan-3 gezielt die Migration im ZNS, während Proliferation und Differenzierung der Neuronen stabil bleiben (Hienola et al., 2006). Entsprechende Daten werden in dieser Dissertation für die neurale Invasion von Pankreaskarzinomzellen vorgestellt. Eine Fokussierung der CD34+ neuralen Stammzellen auf die Syndecan-3 vermittelte Migration im PDAC würde die Zunahme des neuralen Stammzell-Markers Nestin und den Rückgang von Sox-10 im PDAC erklären.
- Drittens kommt ein wesentliches Argument hinzu: während der Analyse der Nervgerichteten Migration von Pankreaskarzinomzellen trat ein stets ausgeprägter, entgegengesetzter Trend der Nerven zur Migration auf die Pankreaskarzinomzellen auf. Die Neuronen weisen somit eine mindestens ebenso starke, zielgerichtete Migration auf die Pankreaskarzinomzellen, wie die Pankreaskarzinomzellen auf die Neurone. Eine Vermittlung dieser Migration über Syndecan-3 ausgehend von CD34+ neuralen Stammzellen wäre somit denkbar.

Die reziproke Migration von Nerven und Krebszellen wurde von Ayala et al. im Prostatakarzinom beschrieben (Ayala et al., 2001). Von der ursprünglichen Assoziation von Syndecan-3 und CD34 leitet sich somit folgender Erklärungsansatz ab: die Immunfärbung demaskiert neurale Stammzellen, allerdings nur jenen geringen Anteil, der den passageren Marker CD34 in der frühen Entwicklungsphase exprimiert. Eine direkte Expression von Syndecan-3 durch diese Zellen erscheint aufgrund der mangelnden Ko-Lokalisation weniger wahrscheinlich als eine Induktion des *Shedding* von Syndecanen, wie für Syndecan-1 gezeigt. Der Kontakt der Pankreaskarzinomzellen zu neuralen Wachstumsfaktoren wie FGF-2 in der ECM würde diesen Prozess beschleunigen.

CD34 als Marker nicht-neoplastischer Zellen: CD34 vermittelt die Migration von Zellen (Nielsen & McNagny, 2008). Daneben ist CD34 aber auch ein bekannter Faktor in der Regulation der Zelladhäsion (Nielsen & McNagny, 2008). Weiss et al. beschrieben eine CD34+ Zellpopulation in Nervenscheidentumoren und damit verbundenen Läsionen. Diese setzten sich von Fibroblasten und humanen Schwann'schen Zellen ab (Weiss & Nickoloff, 1993). In einer weiteren Studie wurden diese als nicht-neoplastische Zellen beschrieben, die unterstützende Funktionen für die Nerven übernehmen (Khalifa, Montgomery, Ismiil, & Azumi, 2000). In der vorliegenden Dissertation wird gezeigt, dass Syndecan-3 die neurale Invasion von Krebszellen fördert. Dabei handelt es sich um einen Prozess, der die Migration von Pankreaskarzinomzellen zu den Nerven und anschließend eine Adhäsion beider Strukturen erfordert. Eine Interaktion von Syndecan-3 mit den oben genannten CD34+ nicht-



neoplastischen, unterstützenden Zellen könnte deshalb einen wichtigen Schritt in der Ausbreitung der Pankreaskarzinomzellen spielen, damit die Krebszellen die Nerven endgültig erreichen.

CD34 als Marker endoneuraler Makrophagen: Eine andere, in Frage kommende Zellpopulation stellen endoneurale Makrophagen dar, die von CD34+ Vorläuferzellen abstammen (Arrighi et al., 2001; Ryncarz & Anasetti, 1998). Cavel et al. zeigten, dass diese endoneuralen Makrophagen durch Pankreaskarzinomzellen aktiviert werden. In einem parakrinen Mechanismus rufen sie durch die Sekretion von GDNF eine erhöhte Migration der Pankreaskarzinomzellen hervor (Cavel et al., 2012). In der vorliegenden Dissertation deutet die Immunolokalisation auf eine Interaktion von Syndecan-3 und CD34 hin. Zudem wird eine Korrelation von Syndecan-3 mit den GFL Wachstumsfaktoren im PDAC gezeigt.

Untersuchungen zu eben jenen neuralen Wachstumsfaktoren im PDAC geben Hinweise auf den möglichen Ursprung der hohen Syndecan-3 Expression im PDAC. So wurden für den GFL Faktor Artemin im PDAC abweichende Werte von mRNA und Protein gefunden (Ceyhan et al., 2006). In Kombination mit der Beobachtung hoher Expressionsraten der GFL in Spinalganglien wurde vorgeschlagen, dass durch mechanische Schädigung intrapankreatischer Nerven im Rahmen der neuralen Invasion, neurale Wachstumsfaktoren zur Regeneration retrograd aus Spinalganglien ins Pankreas transportiert werden. Die beobachtete Aktivierung von Syndecan-3 in Spinalganglien nach Kontakt mit neuralen Wachstumsfaktoren (Abb. 10) stellt somit eine mögliche Form der autokrinen Stimulation der Spinalganglien durch die sezernierten Faktoren dar. Ähnliche Selbstinduktionen durch die GFL und NGF wurden in verschiedenen Prozessen der Embryologie und Onkologie im Pankreas und Nervensystem beschrieben (Davies, Millar, Johnson, & Milbrandt, 1999; Dolle, El Yazidi-Belkoura, Adriaenssens, Nurcombe, & Hondermarck, 2003; Li et al., 2009; Rosenbaum, Vidaltamayo, Sanchez-Soto, Zentella, & Hiriart, 1998; Steinkamp et al., 2012; Zimmermann, Sutter, & Stephani, 1994). Ein retrograder Transport von Syndecan-3 aus noch undifferenzierten Anteilen der großen Nervenplexus ist somit denkbar.

Die oben erwähnte Anordnung von Syndecan-3 im Nervengewebe zeigt eine Abhängigkeit von neuralen Wachstumsfaktoren (Abb. 10). Auffällig sind die Veränderungen nach Zugabe von Neurturin- oder NGF-Medium zu Spinalganglien. Während die Nervenzellen der Negativkontrolle (-FCS / +FCS) eine unspezifische Anordnung der Syndecan-3 Expression über das ganze Zytoplasma hinweg präsentieren, zeigen die Proben mit den Wachstumsfaktoren Neurturin und NGF eine Konzentrierung und Fokussierung von

Syndecan-3 auf die Zellmembran. Interessanterweise erscheint dieses Phänomen unter NGF stärker ausgeprägt als unter dem GFL Faktor Neurturin. Ein potentieller Grund für diese Beobachtung wäre die Induktion von *lipid rafts* durch Syndecan-3.

Diese wenige hundert Nanometer großen Zellmembraneinheiten mit einem hohen Gehalt an Cholesterol und Glykosphingolipiden stellen eine Plattform dar, auf der Rezeptor und Liganden ko-lokalisieren (Pike, 2003). Zugleich wirken *lipid rafts* regulatorisch auf die Signalgebung ein. Durch Unterteilung in Kompartimente wird eine ungezielte Übertragung der Signale von Liganden auf die Zelle verhindert. Sowohl für die GFL als auch für die Neurotrophine ist die Signalweiterleitung über *lipid rafts* beschrieben. Nach Stimulation durch GDNF wird Ret in *lipid rafts* eingeschleust, wo es mit GFR $\alpha$ 1 einen Signalkomplex bildet (Tansey, Baloh, Milbrandt, & Johnson, 2000). Die dort ausgelöste Interaktion mit Src-Kinasen ist von der korrekten Lokalisierung von Ret in den *lipid rafts* abhängig. Andernfalls kommt es zu einer Hemmung von GDNF-induzierter neuronaler Differenzierung und Überleben. Ein ähnlicher Prozess wurde für die Rezeptoren der Neurotrophine beschrieben. TrkA ist innerhalb der *lipid rafts* an seine zytoplasmatischen Signalmoleküle assoziiert und wird dort aktiviert (Pike, 2003). Diese Ergebnisse lassen sich nicht direkt auf Syndecan-3 übertragen. Denn für Ret konnte keine Korrelation mit Syndecan-3 im PDAC gezeigt werden (Tabelle 3). Die beobachtete stärkere Wirkung von NGF im Vergleich zum GFL Faktor Neurturin auf die Fokussierung von Syndecan-3 an der Zelloberfläche ist somit wahrscheinlich auf die Interaktion von Syndecan-3 mit den primären Rezeptoren von NGF zurückzuführen. Eine Wechselwirkung von Syndecan-3 mit TrkA wurde nicht untersucht, für den zweiten NGF-Rezeptor p75 findet sich aber eine enge Beziehung mit Syndecan-3 innerhalb intrapancreatischer Nerven (Abb. 9). Zudem zeigen andere Studien, dass p75 durch NGF in *lipid rafts* verlegt wird und dort die Sprossung von Neuronen fördert (Higuchi, Yamashita, Yoshikawa, & Tohyama, 2003). Für Syndecan-1 und Syndecan-4 wurde bereits die Aufnahme in *lipid rafts* beschrieben, teilweise nach Aktivierung durch den Wachstumsfaktor FGF-2 (Tkachenko et al., 2005), der ja ein bekannter Ligand von Syndecan-3 ist (Chernousov & Carey, 1993).

Wie eingangs erwähnt, spielen neurale Wachstumsfaktoren eine wichtige Rolle in der neuralen Invasion im PDAC. Der in diesem Zusammenhang am besten untersuchte GFL Faktor ist GDNF. Die Expression seiner Rezeptoren im PDAC ist umstritten. So zeigen zwei Studien hohe Expressionsraten von GFR $\alpha$ 1 und Ret in Pankreaskarzinomzellen (Funahashi et al., 2005; Veit et al., 2004). Im Widerspruch dazu beschrieben Okada et al. das Fehlen des

Rezeptors GFR $\alpha$ 1 in mehreren Pankreaskarzinomzelllinien, bestätigten aber die hohe Expression von Ret (Okada et al., 1999). In derselben Studie wurde in den umgebenden Nervenplexus eine hohe Expression von GDNF detektiert. Aus dem beobachteten chemotaktischen und chemokinetischen Effekt von GDNF auf die Migration der Pankreaskarzinomzellen schlossen die Autoren auf eine Interaktion des Liganden GDNF aus den Nerven mit dem Rezeptor Ret auf den Pankreaskarzinomzellen. Anstelle des primären Rezeptors GFR $\alpha$ 1 wurde ein unabhängiger Signalweg oder die Rezeptoren GFR $\alpha$ 2 und GFR $\alpha$ 3 als Bindeglied zwischen GDNF und Ret vorgeschlagen.

In diesem Kontext sind die vorgelegten Korrelationsanalysen der mRNA-Werte von Syndecan-3, GFL und GFR $\alpha$  von großem Interesse (Tabellen 2-3). Im ZNS wurde eine von den konventionellen Rezeptoren GFR $\alpha$  und Ret unabhängige Bindung und Signalweiterleitung der GFL über Syndecan-3 an zytoplasmatische Effektormoleküle wie die Tyrosinkinase Src beschrieben (Bespalov et al., 2011). In Übereinstimmung damit zeigt Syndecan-3 im PDAC einen beachtlich großen Zusammenhang mit der Expression von GDNF, Neurturin und Persephin. In der Gegenüberstellung von Syndecan-3 mit den GFR $\alpha$  hingegen besteht durchgehend keine Korrelation des HSPG mit den konventionellen Rezeptoren (Tabelle 3). Eine mögliche Interpretation der Korrelationsanalysen lautet, dass die GFL Faktoren GDNF, Neurturin und Persephin – unabhängig von GFR $\alpha$  – mit Syndecan-3 interagieren. Ähnliches wurde bereits für die GFR $\alpha$  beschrieben: so zeigen Befunde aus dem ZNS, dass selbst bei sichtbarem Effekt von Neurturin auf Neuronen keine Korrelation mit seinem vermeintlich primären Rezeptor GFR $\alpha$ 2 vorliegt (Garces, Livet, Grillet, Henderson, & Delapeyriere, 2001). Nichtsdestotrotz ist die von Okada et al. vorgeschlagene Interaktion der GFL mit anderen GFR $\alpha$  ist im PDAC nach wie vor denkbar.

Neurturin zeigt im PDAC eine ebenso große Assoziation mit Syndecan-3 wie GDNF (Tabelle 2). Die Tendenz zur Korrelation mit GFR $\alpha$ 2 als einzige unter allen Ligand-Rezeptor Paaren deutet aber darauf hin, dass Neurturin wahrscheinlich in größerem Umfang mit seinem konventionellen Rezeptor GFR $\alpha$ 2 interagiert. Beobachtungen aus der Embryologie zeigen, dass GFR $\alpha$ 2 zur Innervation des Pankreas essentiell ist (Airaksinen & Saarma, 2002). Diese Bedeutung scheint sich auch auf die Signalweiterleitung in der neuralen Invasion im PDAC zu übertragen.

Erstaunlich sind die Zahlen für Artemin, die keinen Bezug des GFL Faktors zu Syndecan-3 zeigen; ebenso wenig wie zwischen Syndecan-3 und GFR $\alpha$ 3 (Tabellen 2-3). Dieser Befund steht im Einklang mit einer fehlenden Überlappung in der immunzytochemischen

Doppelfärbung (Daten nicht dargestellt). Dies überrascht aufgrund der Tatsache, dass Artemin eine höhere Affinität zu Heparin aufweist als GDNF und Neurturin (Alfano, Vora, Mummery, Mulloy, & Rider, 2007). Interessanterweise hat die Präsenz von Heparin eine spezifische Bedeutung für die Bindung von Artemin an GFR $\alpha$ 3 und Ret: in Abwesenheit von Heparin ist die Affinität von Artemin zu GFR $\alpha$ 3 und Ret signifikant geringer als die Affinität von GDNF zu GFR $\alpha$ 1 und Ret (Silvian et al., 2006). So widersprüchlich diese Aussage zur fehlenden Korrelation von Artemin mit dem HSPG Syndecan-3 erscheinen mag, so deutlich unterstützt sie doch die Hypothese, dass sich die Signalweiterleitung von Artemin im PDAC von den übrigen GFL Faktoren unterscheidet. Artemin, GFR $\alpha$ 3 und Ret sind im PDAC überexprimiert (Ceyhan et al., 2006). Zwar hat Artemin ebenso wie Syndecan-3 keinen Effekt auf die Proliferation der Pankreaskarzinomzellen. Die Invasion der Pankreaskarzinomzellen wird durch Gabe von Artemin aber deutlich gesteigert (Ceyhan et al., 2006), während Syndecan-3 keinen eindeutigen Einfluss auf die Invasion ausübt (Abb. 14). Ausschlaggebend für diese Differenz ist womöglich die chemotaktische Wirkung von Artemin auf Pankreaskarzinomzellen (Ceyhan et al., 2006).

Als weiterer Unterschied hat die Gabe von Artemin – im Gegensatz zu GDNF – keinen Effekt auf die Expression der MMP (Ceyhan et al., 2006). Durch ihre Rolle im *Shedding* beeinflussen MMP wiederum die Funktion von Syndecan-3. In Kombination mit den vorgelegten Ergebnissen deuten diese Erkenntnisse darauf hin, dass Artemin unabhängig von Syndecan-3 im PDAC agiert. Gestützt wird diese Hypothese durch die Lokalisation von Artemin in hypertrophen Nerven des PDAC (Ceyhan et al., 2010). Die Korrelation von Syndecan-3 mit GAP-43, einem Marker der neuralen Hypertrophie, ergibt hingegen keinen Zusammenhang mit der Neuroplastizität (Daten nicht dargestellt). Beobachtungen aus dem Mammakarzinom, wo die neurale Invasion ein seltenes Phänomen ist und nur ein Zehntel des Ausmaßes der lymphatischen Invasion umfasst (Karak et al., 2010), bestätigen die vorgelegten Ergebnisse und zeigen ebenso keine Korrelation von Syndecan-3 mit Artemin auf (Wu et al., 2013). Stattdessen sind Artemin, sowie die beiden Rezeptoren GFR $\alpha$ 1 und GFR $\alpha$ 3 mit der lymphatischen Invasion und dem metastatischen Befall von Lymphknoten assoziiert. Die fehlende Interaktion von Artemin mit Syndecan-3 lässt sich auch auf GFR $\alpha$ 3 übertragen. GFR $\alpha$ 3 zeigt die größte Abweichung in seiner Sequenz von den übrigen GFR $\alpha$ , sodass nur Artemin eine wesentliche biologische Aktivität über diesen Rezeptor entfalten kann (Airaksinen, Titievsky, & Saarma, 1999). Insofern verwundert die fehlende Korrelation von Syndecan-3 und GFR $\alpha$ 3 nicht.

Die vorgelegten Ergebnisse deuten mit hoher Wahrscheinlichkeit darauf hin, dass Syndecan-3 die Signalweiterleitung der GFL im PDAC beeinflusst. Zwei mögliche Signalwege wurden im ZNS aufgezeigt (Bespalov et al., 2011):

- Frei diffundierende GFL Faktoren werden von Syndecan-3 an der Zellmembran konzentriert – vermutlich unter Mitwirkung des *Shedding* von Syndecan-3 – und ihren konventionellen Rezeptoren präsentiert
- In der ECM fixierte GFL Faktoren leiten ihre Signale direkt über Syndecan-3 an das Zytoplasma der Pankreaskarzinomzellen weiter.

Die Korrelation von Syndecan-3 mit Ret im PDAC fällt ebenso negativ aus wie zwischen Syndecan-3 und GFR $\alpha$ 1 oder GFR $\alpha$ 2 (Tabelle 3). Obwohl Ret im PDAC deutlich überexprimiert ist (Funahashi et al., 2005; Okada et al., 1999; Veit et al., 2004), weist es nur eine Assoziation mit der Invasion von Lymphbahnen auf. Die neurale Invasion korreliert nicht mit Ret (Y. Ito et al., 2005).

Im Gegensatz dazu deutet die Korrelation von Syndecan-3 mit NGF auf eine Wechselwirkung hin (Tabelle 2). Dieser Befund wird durch folgende Beobachtungen gestützt:

- Erstens stimuliert NGF im PDAC die Expression von MMP (Liebig et al., 2009). Diese Enzyme sind dafür bekannt, über *Shedding* von Syndecan-3 den Wirkungsradius des HSPG zu erhöhen.
- Zweitens weist Panc-1 mit einer der höchsten Syndecan-3 Expressionsraten unter allen getesteten Pankreaskarzinomzellen (Abb. 7), unter den Neurotrophen und ihren Rezeptoren die höchsten Werte gerade für NGF und TrkA auf (Ketterer et al., 2003).
- Drittens exprimieren die Pankreaskarzinomzellen große Mengen von NGF, während die Rezeptoren TrkA und p75 hauptsächlich im Perineurium der Nerven detektiert werden. Da NGF jedoch auch auf Pankreaskarzinomzellen eine starke Zunahme des Invasionspotentials bewirkt (Ketterer et al., 2003; Z. W. Zhu et al., 2001), ist eine Vermittlung dieser Signale durch einen zusätzlichen Rezeptor sehr wahrscheinlich.

Aufgrund der unmittelbar angrenzenden Lokalisation von Syndecan-3 an p75 in intrapancreatischen Nerven (Abb. 9), ist eine Wechselwirkung dieser beiden Rezeptoren in der Signalweiterleitung von NGF für die neurale Invasion denkbar. Die Expression von p75 nimmt in invadierten intrapancreatischen Nerven (Ketterer et al., 2003) ebenso zu wie die Rate von Syndecan-3 in Abhängigkeit vom Grad der neuralen Invasion (Abb. 3). Die Lokalisation der NGF-Rezeptoren im Perineurium hat zu der Schlussfolgerung geführt, dass

NGF, ähnlich der GFL, chemoattraktiv auf Pankreaskarzinomzellen wirkt und so die neurale Invasion im PDAC stimuliert (Abb. 1) (Z. Zhu et al., 1999).

In der Analyse der Auswirkungen von NGF und Artemin auf die Dichte von Neuronen blieb ein additiver Effekt aus (Ceyhan et al., 2010). Diese Beobachtung wurde angesichts der Interaktion des Neurotrophins mit Ret damit begründet, dass beide Wachstumsfaktoren vermutlich gleiche intrazelluläre Signalwege induzieren. Die Korrelation mit Syndecan-3 zeigt jedoch beträchtliche Unterschiede zwischen NGF und Artemin auf. Da Artemin keinen Bezug zu Syndecan-3 aufwies, ist somit von einem zusätzlichen Signalweg für NGF über Syndecan-3 auszugehen, der die neurale Invasion im PDAC fördert. Daten von Okada et al. bestätigen, dass zusätzlich zur GFL, weitere Mediatoren wie NGF für die neurale Invasion im PDAC von Bedeutung sind (Okada et al., 1999): die Blockade von GDNF bewirkte eine Abnahme der nerv-gerichteten Migration von Pankreaskarzinomzellen um lediglich 30%, sodass andere chemoattraktive Moleküle, wie NGF in diesen Prozess eingebunden sein müssen.

Syndecan-3 als potentieller Rezeptor sowohl der GFL als auch von NGF wirkt sich interessanterweise nicht auf die Proliferation der Pankreaskarzinomzellen aus (Abb. 12). Die Faktoren selbst zeigen unterschiedliche Effekte auf das Zellwachstum. Unter Einfluss von NGF tritt eine gesteigerte Proliferation nur in Pankreaskarzinomzellen mit hohen Werten der Rezeptoren TrkA und p75, wie Panc-1, auf (Z. W. Zhu et al., 2001). Im Gegensatz dazu hat NGF in AsPc-1 Pankreaskarzinomzellen, die gekennzeichnet sind durch niedrige Expressionsraten beider Neurotrophin-Rezeptoren, keinen Effekt auf das Zellwachstum (Z. W. Zhu et al., 2001). Die Beobachtung, dass die Inhibition von Syndecan-3 gleichsam in mehreren Pankreaskarzinomzellen, darunter Panc-1 und AsPc-1, die Proliferationsrate nicht beeinflusst, lässt darauf schließen, dass die Induktion des Zellwachstums von Pankreaskarzinomzellen durch NGF unabhängig von Syndecan-3 verläuft. Innerhalb der GFL existieren bislang nur für Neurturin und Artemin direkte Analysen zur Proliferation von Pankreaskarzinomzellen. Neurturin steigert die Proliferation, Artemin zeigt jedoch keinen Effekt (Ceyhan et al., 2006; Wang et al., 2014). In diesem Zusammenhang ist die vorhandene Korrelation von Syndecan-3 mit Neurturin und die ausbleibende Korrelation mit Artemin erstaunlich. Sie deutet dafür aber umso mehr auf die spezifische Rolle der Interaktion von Syndecan-3 und seinen Liganden für die Motilität und nicht das Wachstum der Zellen hin.

Der Einfluss anderer Syndecane auf die Proliferation von Krebszellen wurde hingegen in verschiedenen Neoplasien aufgezeigt, wie Syndecan-1 im Endometrium-, Mammakarzinom

und Multiplen Myelom (Choi et al., 2010; Teng, Aquino, & Park, 2012), Syndecan-2 im Kolonkarzinom (Park, Kim, Lim, Han, & Oh, 2002) sowie Syndecan-4 im Mesotheliom und hepatozellulären Karzinom (Beauvais & Rapraeger, 2004). Im Gegensatz dazu spielt aber im PDAC die Vermittlung der Proliferation über Syndecane offenbar keine Rolle. Zwar postulierten Villena et al. für Syndecan-2 eine Funktion als Ko-Rezeptor in der Stimulation des Zellwachstums in Fibroblasten, induziert durch FGF-2 (Villena, Berndt, Granes, Reina, & Vilaro, 2003). In Übertragung auf das PDAC wurde nach Unterdrückung des primären Rezeptor von FGF-2 auch ein Rückgang des Zellwachstums gezeigt (Wagner, Lopez, Cahn, & Korc, 1998). In einer direkten Analyse der Proliferation von Pankreaskarzinomzellen hatte jedoch die Inhibition der Syndecan-2 Expression keine Auswirkungen auf das Zellwachstum, weder hemmend noch steigernd (De Oliveira et al., 2012). Diese Ergebnisse entsprechen der hier beobachteten Wirkung von Syndecan-3.

Ähnlich wie für die Proliferation, ergibt die Inhibition von Syndecan-3 in SU86.86 Pankreaskarzinomzellen auch keine sichtbaren Differenzen in der Invasion. Panc-1 Pankreaskarzinomzellen hingegen verzeichnen einen signifikanten Rückgang ihres Invasionspotentials nach Syndecan-3 Inhibition. Als Erklärung kommt hier die hohe Expression von Syndecan-3 in Frage, die in Panc-1 Zellen eine der höchsten Raten unter allen getesteten Pankreaskarzinomzellen zeigt. Die geringe Wirkung von Syndecan-3 auf die Invasion, die in anderen Pankreaskarzinomzellen nicht zu tragen kommt, tritt deshalb offenbar nur in Panc-1 Pankreaskarzinomzellen zum Vorschein.

Ein weiterer möglicher Grund für die Unterschiede in der Invasivität der Pankreaskarzinomzellen sind Unterschiede im Gehalt an k-Ras. Das Protoonkogen ist bekannt dafür, in Kooperation mit Syndecanen die Invasivität von Krebszellen zu steigern (De Oliveira et al., 2012; Vuoriluoto, Hognas, Meller, Lehti, & Ivaska, 2011). Die Interaktion von Syndecan-2 mit k-Ras wurde in SU86.86 gezeigt. Diese Zelllinie zeigt jedoch für Syndecan-3 keinen Bezug zur Invasion. Allerdings ist Syndecan-2 in SU86.86 Pankreaskarzinomzellen stärker ausgeprägt als in Panc-1 mit einem nahezu umgekehrtem Expressionsprofil beider Zelllinien im Gegensatz zu Syndecan-3 (De Oliveira et al., 2012). Erstaunlich ist die erhöhte Invasivität von Panc-1 Zellen auch vor dem Hintergrund, dass die Zellen unabhängig vom Transfektionsstatus im 3D Neurale-Migration-Ansatz nahezu keine Motilität zeigten. Koide et al. zeigten, dass Panc-1 Pankreaskarzinomzellen durch ein geringes Ausmaß an neuraler Invasion gekennzeichnet sind, sowohl zu humanen, als auch zu murinen Nerven (Koide et al., 2006). Diese Wirkung wurde auf das Genexpressionsprofil der Zelllinie zurückgeführt. In der

vorliegenden Dissertation war dieser Effekt besonders in der Nerv-gerichteten Migration sichtbar. Zudem benötigten Panc-1 Pankreaskarzinomzellen bereits im *Woundhealing*-Ansatz rund doppelt so viel Zeit wie SU86.86 zur Bedeckung der gesamten Fläche (Abb. 13). Insofern bestätigen die vorliegenden Ergebnisse die von Koide erhobenen Daten und klassifizieren Panc-1 als eine Zelllinie ohne ausgeprägte Affinität zu Neuronen, wohl aber mit einem ungerichteten Invasionspotential.

Im Gegensatz zum Zellwachstum und der Invasion wird die Motilität von Pankreaskarzinomzellen durch siRNA-induzierte Inhibition von Syndecan-3 deutlich beeinträchtigt. Die Lokomotion der Zellen Inhibition von Syndecan-3 ist im *Woundhealing*-Ansatz bereits eingeschränkt (Abb. 13). Eine Analyse der Zellen an der Rückfront im 3D Neurale Migrations-Ansatz verdeutlicht eine abnehmende Orientierung von SU86.86 Pankreaskarzinomzellen nach Inhibition von Syndecan-3 (Abb. 15-19). Noch intensiver ist dieser Effekt an der Migrationsfront ausgeprägt. Die ungerichtete Bewegung der Zellen spiegelt sich in allen untersuchten Parametern wider:

- Euklidische Distanz: beschreibt die zielgerichtete Strecke der Pankreaskarzinomzellen in Richtung der Nerven (Abb. 4). Der hochsignifikante Unterschied zwischen Mig-NK (Migrationsfront Negativkontrolle) und Rück-NK (Rückfront Negativkontrolle) verdeutlicht die Anziehung der Pankreaskarzinomzellen durch die Neuronen. Durch Syndecan-3 Inhibition kommt es zu einem starken Abfall in den Pankreaskarzinomzellen, sodass sich Mig-S (Migrationsfront Syndecan-3 siRNA) selbst von den Rückfronten kaum noch unterscheidet.
- Geschwindigkeit: Während an den Migrationsfronten kein signifikanter Unterschied auftritt, zeigt die Geschwindigkeit als einziger Parameter einen statistisch signifikanten Anstieg in Rück-NK gegenüber Rück-S. Die Schlussfolgerung dessen lautet: Syndecan-3 ist erforderlich für die Orientierung der Pankreaskarzinomzellen in der neuralen Invasion. Durch Inhibition des HSPG geht die Zielrichtung der Migration verloren. Infolgedessen steigt die Geschwindigkeit, da die Bewegung ungeordnet in verschiedene Richtungen erfolgt. Entsprechend findet sich zwischen Mig-S und Rück-S kein Unterschied, da die Zellen an beiden Fronten ihre Orientierung verloren haben. Auch durch die Präsenz von Nerven im Fall von Mig-S kann dies offensichtlich nicht kompensiert werden.
- Linearität und *Forward Migration Index*: die signifikanten Unterschiede zwischen Negativkontrolle und Syndecan-3 inhibierten SU86.86 Pankreaskarzinomzellen



unterstreichen die Bedeutung von Syndecan-3 für die Ausrichtung und Fokussierung in der neuralen Invasion.

Zur Bestätigung der Effekte auf die Gesamtmotilität wurden die Werte von Migrationsfront und Rückfront zusammengefasst und Negativkontrolle mit Syndecan-3 inhibierten Pankreaskarzinomzellen verglichen (Abb. 17, 19). Darin zeichnet sich ein ebenso deutlicher Rückgang in Euklidischer Distanz, Linearität und *Forward Migration Index* nach Inhibition von Syndecan-3 ab, während die Geschwindigkeit knapp oberhalb der Negativkontrolle liegt.

Die unter dem Mikroskop beobachteten Effekte spiegeln sich auf intrazellulärer Ebene wieder. Die Inhibition von Syndecan-3 hat sichtbare Auswirkungen auf die zytoplasmatische Signalweiterleitung. Durch Syndecan-3 Inhibition geht die Aktivierung von Src in den Pankreaskarzinomzellen zurück. Abb. 20 zeigt den potentiellen Signalweg von Syndecan-3 zum Aktinzytoskelett, der die beobachteten Effekte in der Nerv-gerichteten Migration erklärt, so wie bereits im ZNS dargestellt (T. Kinnunen et al., 1998). Darin wirkt Src als Schaltstation, die die Signale von der zytoplasmatischen Domäne von Syndecan-3 aufnimmt und über das Effektormolekül Cortactin an Aktin weiterleitet. Durch Inhibition von Syndecan-3 wird die Phosphorylierung von Src, und damit seine Aktivierung reduziert. In der Folge nimmt die Aktin-induzierte Motilität der Zelle ab, was sich makroskopisch an einer reduzierten Migration zeigt.

Relevant wird die beobachtete Interaktion von Syndecan-3 und Src für die Ausrichtung zukünftiger Therapieansätze. Interessanterweise deuten in gleicher Weise Ergebnisse aus dem Nervensystem auf einen engen intra- und extrazellulären Zusammenhang von Syndecan-3 und Src (Hienola et al., 2006). Hierbei auffällig ist die intensive Ko-Lokalisation von Syndecan-3 und dem Rezeptor EGFR in *lipid rafts*, die auf eine Wechselwirkung beider Rezeptoren und ihrer Signalwege hindeutet. Die EGFR-induzierte Migration von neuralen Stammzellen ist dabei abhängig von der Interaktion von Syndecan-3 und Src. Eine direkte Übertragung dieser Erkenntnisse auf die Signalwege in der neuralen Invasion im PDAC ist denkbar. Die Tyrosinkinase Src ist nämlich ebenso wie die Syndecane in nahezu allen Organen anzutreffen und zudem in vielen Tumoren wie dem PDAC überexprimiert (Yezhelyev et al., 2004).

Ebenso wie hier für Syndecan-3 dargestellt, zeigen mehrere Studien für Src einen primären Effekt auf die Motilität von Pankreaskarzinomzellen. Die gerichtete Therapie gegen Src beeinflusst Migration, Invasion und Metastasierung stärker als das Zellwachstum (Duxbury, Ito, Zinner, Ashley, & Whang, 2004; Huang et al., 2012; H. Ito, Gardner-Thorpe, Zinner,

Ashley, & Whang, 2003; Morton et al., 2010; Yezhelyev et al., 2004). Ein weiterer Hinweis auf die vorgeschlagene Wechselwirkung von Syndecan-3 und Src sind die Auswirkungen von Src in Abhängigkeit von seiner Lokalisation in der Zelle. Nach Aktivierung im Zytoplasma ordnet sich die Tyrosinkinase an der Zellmembran an und aktiviert dort Enzyme zum *Shedding* von EGFR-Liganden mit daraus resultierender Steigerung der EGFR-Signalweiterleitung (Nagaraj, Smith, Revetta, Washington, & Merchant, 2010). Ein ähnlicher Prozess ist für Syndecan-3 im PDAC denkbar.

Untersuchungen zur gerichteten Therapie des PDAC zeigen, dass der Einsatz von Src-Inhibitoren die Ansprechrate auf Gemcitabin und 5-Fluorouracil erhöht (Nagaraj, Washington, & Merchant, 2011). Deshalb wird übereinstimmend die Kombination mehrerer Therapeutika wie Src-Inhibitoren, EGFR-Antikörper und Chemotherapeutika empfohlen (Jaganathan et al., 2011; Jaganathan, Yue, & Turkson, 2010; Nagaraj et al., 2011). Interessanterweise zeigen gerade Panc-1 Zellen Resistenzen gegen Src-Inhibitoren (Nagaraj et al., 2010). Umso attraktiver erscheint daher eine gerichtete Therapie gegen Syndecan-3 zur Hemmung der neuralen Invasion im PDAC, um das bestehende medikamentöse Potential zu erweitern. Auch in der Entwicklung von Therapieresistenzen machen Pankreaskarzinomzellen Gebrauch von externen Wachstumsfaktoren. So kann die Inhibition von Src durch einen hohen Spiegel von TGF- $\beta$  abgewehrt werden, da der Wachstumsfaktor vermutlich die Degradation der Tyrosinkinase hemmt (Deharvengt, Marmarelis, & Korc, 2012). Diese Beobachtung unterstreicht die Bedeutung von Wachstumsfaktoren im PDAC und die Relevanz einer Blockade ihres potentiellen Rezeptors Syndecan-3.

Die Rolle von Syndecan-3 im künftigen Therapieregime des PDAC wird an seiner Einbindung in die neurale Invasion im PDAC und die damit verbundenen klinischen Parameter Schmerz und Überlebensrate deutlich (Abb. 3). Wie eingangs beschrieben, fördern neurale Wachstumsfaktoren die Invasion von intrapancreatischen Nerven durch Pankreaskarzinomzellen (Abb. 1) (Demir et al., 2010). Mehrere Studien belegen einen ausgeprägten Anstieg von Krebszellinvasion und Schmerz durch die Wirkung der GFL (Bapat et al., 2011; Demir, Friess, & Ceyhan, 2012). Der Reiz auf die Pankreaskarzinomzellen wird sogar durch die Nerven selbst induziert. Durch die Sekretion von weiteren Wachstumsfaktoren bewirken die Neuronen eine noch stärkere Anziehung der Pankreaskarzinomzellen (Demir et al., 2012). Ähnliche Ergebnisse liegen für den neurotrophen Faktor NGF vor. Dieser korreliert eng mit der neuralen Invasion und in der Folge erhöhtem Schmerzempfinden (Bapat et al., 2011; Demir et al., 2012). Die Expression

von Syndecan-3 weist einen Bezug zu neuraler Invasion und Schmerz im PDAC auf (Tardio, 2008) (Abb. 3). Neurale Invasion von Krebszellen zeigt zwar keinen direkten Zusammenhang mit der Überlebensrate (Ceyhan, Bergmann, et al., 2009). Jedoch gilt erhöhter Schmerz als Marker einer schlechten Prognose für die Patienten (Ceyhan, Bergmann, et al., 2009). Wie bereits für den Schmerz konnte dementsprechend auch für das Überleben eine Assoziation mit der Syndecan-3 Expression aufgezeigt werden (Tardio, 2008) (Abb. 3). In gemeinsamer Betrachtung mit den vorgelegten Ergebnissen verspricht Syndecan-3 somit einen wirkungsvollen Angriffspunkt in der gerichteten Therapie des PDAC.



## 6 Schlussfolgerung

Die vorliegenden Ergebnisse zu Syndecan-3 in der neuralen Invasion erweitern die bisherigen Erkenntnisse in diesem hochspezifischen Dialog zwischen Karzinomzellen und dem Neuron. Das Heparansulphat Proteoglykan Syndecan-3 dient als Ko-Faktor in der neuralen Invasion, der Ausbreitung von Pankreaskarzinomzellen über die Nervenbahnen des Pankreas.

Syndecan-3 zeigt sowohl in den Pankreaskarzinomzellen als auch in den intrapancreatischen Nerven eine Überexpression. Im aktiven Zustand trägt Syndecan-3 mehrere Heparansulphat- und Chondroitinsulphat-Seitenketten, die die Bindung neuraler Wachstumsfaktoren ermöglichen. Entsprechend korreliert die Expression von Syndecan-3 im Pankreaskarzinom mit den GFL Faktoren GDNF, Neurturin und Persephin sowie mit NGF. In Nervenzellen wird unter Exposition dieser Faktoren die Anlagerung von Syndecan-3 an der Membran aktiviert. Die Lokalisation im intrapancreatischen Nerv ist unabhängig von Glia, Perineuralzellen, Nervenzellen und adulten Fibroblasten. Die Lage von Syndecan-3 deutet jedoch auf einen Zusammenhang mit CD34+ Zellen hin, einer nicht abschließend identifizierten Zellgruppe, bei denen es sich vermutlich um undifferenzierte Fibroblasten handelt. Durch Plasmid-induzierte in-vitro Überexpression in Pankreaskarzinomzellen kommt es zu einer aktiven Sekretion von Syndecan-3 in die extrazelluläre Matrix. Die in-vitro Inhibition durch siRNA hingegen senkt spezifisch die Neuroaffinität der Pankreaskarzinomzellen. Während Proliferation und unspezifische Invasion kaum beeinflusst werden, nehmen die Motilität der Zellen und darin insbesondere die nerv-gerichtete Migration signifikant ab. Dieser Effekt spiegelt sich auf Ebene der zytoplasmatischen Signalweiterleitung wider: die Inhibition von Syndecan-3 reduziert die Aktivierung der Tyrosinkinase Src und somit über Cortactin die Aktin-induzierte Bewegung der Zelle.

Syndecan-3 spielt somit offensichtlich eine wichtige Rolle in der Interaktion von Nerven und Krebszellen im Pankreaskarzinom. Die vorliegende Dissertation erweitert die Kenntnisse der Neuro-Karzinom Interaktion im Pankreaskarzinom. Die hier erprobte in-vitro Inhibition von Syndecan-3 könnte Bestandteil einer therapeutischen Strategie sein, um die neurale Invasion zu bremsen und so die Ausbreitung von Karzinomzellen ins Pankreas und über das Organ hinaus einzuschränken.



## 7 Literatur

- Airaksinen, M. S., & Saarma, M. (2002). The GDNF family: signalling, biological functions and therapeutic value. *Nat Rev Neurosci*, 3(5), 383-394. doi:10.1038/nrn812
- Airaksinen, M. S., Titievsky, A., & Saarma, M. (1999). GDNF family neurotrophic factor signaling: four masters, one servant? *Mol Cell Neurosci*, 13(5), 313-325. doi:10.1006/mcne.1999.0754
- Alfano, I., Vora, P., Mummery, R. S., Mulloy, B., & Rider, C. C. (2007). The major determinant of the heparin binding of glial cell-line-derived neurotrophic factor is near the N-terminus and is dispensable for receptor binding. *Biochem J*, 404(1), 131-140. doi:10.1042/BJ20061747
- Arrighi, J. F., Zubler, R., Hauser, C., Irion, O., Brouwers, N., Chapuis, B., & Kindler, V. (2001). CD34(+) cord blood cells expressing cutaneous lymphocyte-associated antigen are enriched in granulocyte-macrophage progenitors and support extensive amplification of dendritic cell progenitors. *Exp Hematol*, 29(8), 1029-1037.
- Asundi, V. K., Erdman, R., Stahl, R. C., & Carey, D. J. (2003). Matrix metalloproteinase-dependent shedding of syndecan-3, a transmembrane heparan sulfate proteoglycan, in Schwann cells. *J Neurosci Res*, 73(5), 593-602. doi:10.1002/jnr.10699
- Ayala, G. E., Wheeler, T. M., Shine, H. D., Schmelz, M., Frolov, A., Chakraborty, S., & Rowley, D. (2001). In vitro dorsal root ganglia and human prostate cell line interaction: redefining perineural invasion in prostate cancer. *Prostate*, 49(3), 213-223.
- Baeza-Raja, B., Li, P., Le Moan, N., Sachs, B. D., Schachtrup, C., Davalos, D., Vagena, E., Bridges, D., Kim, C., Saltiel, A. R., Olefsky, J. M., & Akassoglou, K. (2012). p75 neurotrophin receptor regulates glucose homeostasis and insulin sensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(15), 5838-5843. doi:10.1073/pnas.1103638109
- Bapat, A. A., Hostetter, G., Von Hoff, D. D., & Han, H. (2011). Perineural invasion and associated pain in pancreatic cancer. *Nat Rev Cancer*, 11(10), 695-707. doi:10.1038/nrc3131
- Barnett, M. W., Fisher, C. E., Perona-Wright, G., & Davies, J. A. (2002). Signalling by glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) requires heparan sulphate glycosaminoglycan. *J Cell Sci*, 115(Pt 23), 4495-4503.
- Basturk, O., Singh, R., Kaygusuz, E., Balci, S., Dursun, N., Culhaci, N., & Adsay, N. V. (2011). GLUT-1 expression in pancreatic neoplasia: implications in pathogenesis, diagnosis, and prognosis. *Pancreas*, 40(2), 187-192. doi:10.1097/MPA.0b013e318201c935
- Beauvais, D. M., & Rapraeger, A. C. (2004). Syndecans in tumor cell adhesion and signaling. *Reprod Biol Endocrinol*, 2, 3. doi:10.1186/1477-7827-2-3
- Bespalov, M. M., Sidorova, Y. A., Tumova, S., Ahonen-Bishopp, A., Magalhaes, A. C., Kuleskiy, E., Paveliev, M., Rivera, C., Rauvala, H., & Saarma, M. (2011). Heparan sulfate proteoglycan syndecan-3 is a novel receptor for GDNF, neurturin, and artemin. *J Cell Biol*, 192(1), 153-169. doi:10.1083/jcb.201009136
- Bornman, P. C., & Beckingham, I. J. (2001). ABC of diseases of liver, pancreas, and biliary system. Pancreatic tumours. *BMJ*, 322(7288), 721-723.
- Cavel, O., Shomron, O., Shabtay, A., Vital, J., Trejo-Leider, L., Weizman, N., Krelin, Y., Fong, Y., Wong, R. J., Amit, M., & Gil, Z. (2012). Endoneurial macrophages induce perineural invasion of pancreatic cancer cells by secretion of GDNF and activation of RET tyrosine kinase receptor. *Cancer Res*, 72(22), 5733-5743. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-0764
- Ceyhan, G. O., Bergmann, F., Kadihasanoglu, M., Altintas, B., Demir, I. E., Hinz, U., Muller, M. W., Giese, T., Buchler, M. W., Giese, N. A., & Friess, H. (2009). Pancreatic

- neuropathy and neuropathic pain--a comprehensive pathomorphological study of 546 cases. *Gastroenterology*, 136(1), 177-186 e171. doi:10.1053/j.gastro.2008.09.029
- Ceyhan, G. O., Demir, I. E., Altintas, B., Rauch, U., Thiel, G., Muller, M. W., Giese, N. A., Friess, H., & Schafer, K. H. (2008). Neural invasion in pancreatic cancer: a mutual tropism between neurons and cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 374(3), 442-447. doi:10.1016/j.bbrc.2008.07.035
- Ceyhan, G. O., Demir, I. E., Rauch, U., Bergmann, F., Muller, M. W., Buchler, M. W., Friess, H., & Schafer, K. H. (2009). Pancreatic neuropathy results in "neural remodeling" and altered pancreatic innervation in chronic pancreatitis and pancreatic cancer. *Am J Gastroenterol*, 104(10), 2555-2565. doi:10.1038/ajg.2009.380
- Ceyhan, G. O., Giese, N. A., Erkan, M., Kerscher, A. G., Wente, M. N., Giese, T., Buchler, M. W., & Friess, H. (2006). The neurotrophic factor artemin promotes pancreatic cancer invasion. *Ann Surg*, 244(2), 274-281. doi:10.1097/01.sla.0000217642.68697.55
- Ceyhan, G. O., Schafer, K. H., Kerscher, A. G., Rauch, U., Demir, I. E., Kadihasanoglu, M., Bohm, C., Muller, M. W., Buchler, M. W., Giese, N. A., Erkan, M., & Friess, H. (2010). Nerve growth factor and artemin are paracrine mediators of pancreatic neuropathy in pancreatic adenocarcinoma. *Ann Surg*, 251(5), 923-931. doi:10.1097/SLA.0b013e3181d974d4
- Chernousov, M. A., & Carey, D. J. (1993). N-syndecan (syndecan 3) from neonatal rat brain binds basic fibroblast growth factor. *J Biol Chem*, 268(22), 16810-16814.
- Choi, S., Lee, H., Choi, J. R., & Oh, E. S. (2010). Shedding; towards a new paradigm of syndecan function in cancer. *BMB Rep*, 43(5), 305-310.
- Conejo, J. R., Kleeff, J., Koliopanos, A., Matsuda, K., Zhu, Z. W., Goecke, H., Bicheng, N., Zimmermann, A., Korc, M., Friess, H., & Buchler, M. W. (2000). Syndecan-1 expression is up-regulated in pancreatic but not in other gastrointestinal cancers. *Int J Cancer*, 88(1), 12-20.
- Davies, J. A., Millar, C. B., Johnson, E. M., Jr., & Milbrandt, J. (1999). Neurturin: an autocrine regulator of renal collecting duct development. *Dev Genet*, 24(3-4), 284-292. doi:10.1002/(SICI)1520-6408(1999)24:3/4<284::AID-DVG11>3.0.CO;2-X
- De Oliveira, T., Abiatari, I., Raulefs, S., Sauliunaite, D., Erkan, M., Kong, B., Friess, H., Michalski, C. W., & Kleeff, J. (2012). Syndecan-2 promotes perineural invasion and cooperates with K-ras to induce an invasive pancreatic cancer cell phenotype. *Mol Cancer*, 11, 19. doi:10.1186/1476-4598-11-19
- Deharvengt, S., Marmarelis, M., & Korc, M. (2012). Concomitant targeting of EGF receptor, TGF-beta and SRC points to a novel therapeutic approach in pancreatic cancer. *PLoS One*, 7(6), e39684. doi:10.1371/journal.pone.0039684
- Demir, I. E., Ceyhan, G. O., Liebl, F., D'Haese, J. G., Maak, M., & Friess, H. (2010). Neural invasion in pancreatic cancer: the past, present and future. *Cancers (Basel)*, 2(3), 1513-1527. doi:10.3390/cancers2031513
- Demir, I. E., Friess, H., & Ceyhan, G. O. (2012). Nerve-cancer interactions in the stromal biology of pancreatic cancer. *Front Physiol*, 3, 97. doi:10.3389/fphys.2012.00097
- Diamantopoulou, Z., Kitsou, P., Menashi, S., Courty, J., & Katsoris, P. (2012). Loss of receptor protein tyrosine phosphatase beta/zeta (RPTPbeta/zeta) promotes prostate cancer metastasis. *J Biol Chem*, 287(48), 40339-40349. doi:10.1074/jbc.M112.405852
- Ding, K., Lopez-Burks, M., Sanchez-Duran, J. A., Korc, M., & Lander, A. D. (2005). Growth factor-induced shedding of syndecan-1 confers glypican-1 dependence on mitogenic responses of cancer cells. *J Cell Biol*, 171(4), 729-738. doi:10.1083/jcb.200508010
- Dolle, L., El Yazidi-Belkoura, I., Adriaenssens, E., Nurcombe, V., & Hondermarck, H. (2003). Nerve growth factor overexpression and autocrine loop in breast cancer cells. *Oncogene*, 22(36), 5592-5601. doi:10.1038/sj.onc.1206805



- Duxbury, M. S., Ito, H., Zinner, M. J., Ashley, S. W., & Whang, E. E. (2004). Inhibition of SRC tyrosine kinase impairs inherent and acquired gemcitabine resistance in human pancreatic adenocarcinoma cells. *Clin Cancer Res*, *10*(7), 2307-2318.
- Ellenrieder, V., Alber, B., Lacher, U., Hendler, S. F., Menke, A., Boeck, W., Wagner, M., Wilda, M., Friess, H., Buchler, M., Adler, G., & Gress, T. M. (2000). Role of MT-MMPs and MMP-2 in pancreatic cancer progression. *Int J Cancer*, *85*(1), 14-20.
- Funahashi, H., Okada, Y., Sawai, H., Takahashi, H., Matsuo, Y., Takeyama, H., & Manabe, T. (2005). The role of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) and integrins for invasion and metastasis in human pancreatic cancer cells. *J Surg Oncol*, *91*(1), 77-83. doi:10.1002/jso.20277
- Garces, A., Livet, J., Grillet, N., Henderson, C. E., & Delapeyriere, O. (2001). Responsiveness to neurturin of subpopulations of embryonic rat spinal motoneuron does not correlate with expression of GFR alpha 1 or GFR alpha 2. *Dev Dyn*, *220*(3), 189-197. doi:10.1002/1097-0177(20010301)220:3<189::AID-DVDY1106>3.0.CO;2-I
- Goutebroze, L., Carnaud, M., Denisenko, N., Boutterin, M. C., & Girault, J. A. (2003). Syndecan-3 and syndecan-4 are enriched in Schwann cell perinodal processes. *BMC Neurosci*, *4*, 29. doi:10.1186/1471-2202-4-29
- Hienola, A., Tumova, S., Kuleskiy, E., & Rauvala, H. (2006). N-syndecan deficiency impairs neural migration in brain. *J Cell Biol*, *174*(4), 569-580. doi:10.1083/jcb.200602043
- Higuchi, H., Yamashita, T., Yoshikawa, H., & Tohyama, M. (2003). PKA phosphorylates the p75 receptor and regulates its localization to lipid rafts. *EMBO J*, *22*(8), 1790-1800. doi:10.1093/emboj/cdg177
- Hirose, T., Tani, T., Shimada, T., Ishizawa, K., Shimada, S., & Sano, T. (2003). Immunohistochemical demonstration of EMA/Glut1-positive perineurial cells and CD34-positive fibroblastic cells in peripheral nerve sheath tumors. *Mod Pathol*, *16*(4), 293-298. doi:10.1097/01.MP.0000062654.83617.B7
- Huang, M., Anand, S., Murphy, E. A., Desgrosellier, J. S., Stupack, D. G., Shattil, S. J., Schlaepfer, D. D., & Cheresch, D. A. (2012). EGFR-dependent pancreatic carcinoma cell metastasis through Rap1 activation. *Oncogene*, *31*(22), 2783-2793. doi:10.1038/onc.2011.450
- ibidi GmbH: Trapp, G., Horn, E. (2010, June 28). Chemotaxis and Migration Tool Version 2.0. Retrieved from [http://ibidi.com/software/chemotaxis\\_and\\_migration\\_tool/?xe14f4=05b054d00102eba0db845119bc79de3d](http://ibidi.com/software/chemotaxis_and_migration_tool/?xe14f4=05b054d00102eba0db845119bc79de3d)
- Inatani, M., Haruta, M., Honjo, M., Oohira, A., Kido, N., Takahashi, M., Honda, Y., & Tanihara, H. (2001). Upregulated expression of N-syndecan, a transmembrane heparan sulfate proteoglycan, in differentiated neural stem cells. *Brain Res*, *920*(1-2), 217-221.
- Iozzo, R. V., & Sanderson, R. D. (2011). Proteoglycans in cancer biology, tumour microenvironment and angiogenesis. *J Cell Mol Med*, *15*(5), 1013-1031. doi:10.1111/j.1582-4934.2010.01236.x
- Ito, H., Duxbury, M., Zinner, M. J., Ashley, S. W., & Whang, E. E. (2004). Glucose transporter-1 gene expression is associated with pancreatic cancer invasiveness and MMP-2 activity. *Surgery*, *136*(3), 548-556. doi:10.1016/j.surg.2004.05.032
- Ito, H., Gardner-Thorpe, J., Zinner, M. J., Ashley, S. W., & Whang, E. E. (2003). Inhibition of tyrosine kinase Src suppresses pancreatic cancer invasiveness. *Surgery*, *134*(2), 221-226. doi:10.1067/msy.2003.224
- Ito, Y., Okada, Y., Sato, M., Sawai, H., Funahashi, H., Murase, T., Hayakawa, T., & Manabe, T. (2005). Expression of glial cell line-derived neurotrophic factor family members and their receptors in pancreatic cancers. *Surgery*, *138*(4), 788-794. doi:10.1016/j.surg.2005.07.007

- Jaganathan, S., Yue, P., Paladino, D. C., Bogdanovic, J., Huo, Q., & Turkson, J. (2011). A functional nuclear epidermal growth factor receptor, SRC and Stat3 heteromeric complex in pancreatic cancer cells. *PLoS One*, *6*(5), e19605. doi:10.1371/journal.pone.0019605
- Jaganathan, S., Yue, P., & Turkson, J. (2010). Enhanced sensitivity of pancreatic cancer cells to concurrent inhibition of aberrant signal transducer and activator of transcription 3 and epidermal growth factor receptor or Src. *J Pharmacol Exp Ther*, *333*(2), 373-381. doi:10.1124/jpet.109.162669
- Karak, S. G., Quatrano, N., Buckley, J., & Ricci, A., Jr. (2010). Prevalence and significance of perineural invasion in invasive breast carcinoma. *Conn Med*, *74*(1), 17-21.
- Ketterer, K., Rao, S., Friess, H., Weiss, J., Buchler, M. W., & Korc, M. (2003). Reverse transcription-PCR analysis of laser-captured cells points to potential paracrine and autocrine actions of neurotrophins in pancreatic cancer. *Clin Cancer Res*, *9*(14), 5127-5136.
- Khalifa, M. A., Montgomery, E. A., Ismiil, N., & Azumi, N. (2000). What are the CD34+ cells in benign peripheral nerve sheath tumors? Double immunostaining study of CD34 and S-100 protein. *Am J Clin Pathol*, *114*(1), 123-126. doi:10.1309/C7N9-J2AU-5TB9-5FRL
- Kinnunen, A., Niemi, M., Kinnunen, T., Kaksonen, M., Nolo, R., & Rauvala, H. (1999). Heparan sulphate and HB-GAM (heparin-binding growth-associated molecule) in the development of the thalamocortical pathway of rat brain. *Eur J Neurosci*, *11*(2), 491-502.
- Kinnunen, T., Kaksonen, M., Saarinen, J., Kalkkinen, N., Peng, H. B., & Rauvala, H. (1998). Cortactin-Src kinase signaling pathway is involved in N-syndecan-dependent neurite outgrowth. *J Biol Chem*, *273*(17), 10702-10708.
- Koide, N., Yamada, T., Shibata, R., Mori, T., Fukuma, M., Yamazaki, K., Aiura, K., Shimazu, M., Hirohashi, S., Nimura, Y., & Sakamoto, M. (2006). Establishment of perineural invasion models and analysis of gene expression revealed an invariant chain (CD74) as a possible molecule involved in perineural invasion in pancreatic cancer. *Clin Cancer Res*, *12*(8), 2419-2426. doi:10.1158/1078-0432.CCR-05-1852
- Lambaerts, K., Wilcox-Adelman, S. A., & Zimmermann, P. (2009). The signaling mechanisms of syndecan heparan sulfate proteoglycans. *Curr Opin Cell Biol*, *21*(5), 662-669. doi:10.1016/j.ceb.2009.05.002
- Lebakken, C. S., & Rapraeger, A. C. (1996). Syndecan-1 mediates cell spreading in transfected human lymphoblastoid (Raji) cells. *J Cell Biol*, *132*(6), 1209-1221.
- Leveugle, B., Ding, W., Buee, L., & Fillit, H. M. (1995). Interleukin-1 and nerve growth factor induce hypersecretion and hypersulfation of neuroblastoma proteoglycans which bind beta-amyloid. *J Neuroimmunol*, *60*(1-2), 151-160.
- Li, J., Klein, C., Liang, C., Rauch, R., Kawamura, K., & Hsueh, A. J. (2009). Autocrine regulation of early embryonic development by the artemin-GFRA3 (GDNF family receptor-alpha 3) signaling system in mice. *FEBS Lett*, *583*(15), 2479-2485. doi:10.1016/j.febslet.2009.06.050
- Liang, Y., Marcusson, J. A., & Johansson, O. (1999). Light and electron microscopic immunohistochemical observations of p75 nerve growth factor receptor-immunoreactive dermal nerves in prurigo nodularis. *Arch Dermatol Res*, *291*(1), 14-21.
- Liebig, C., Ayala, G., Wilks, J. A., Berger, D. H., & Albo, D. (2009). Perineural invasion in cancer: a review of the literature. *Cancer*, *115*(15), 3379-3391. doi:10.1002/cncr.24396
- Liebl, F., Demir, I. E., Mayer, K., Schuster, T., D'Haese, J. G., Becker, K., Langer, R., Bergmann, F., Wang, K., Rosenberg, R., Novotny, A. R., Feith, M., Reim, D., Friess,

- H., & Ceyhan, G. O. (2014). The impact of neural invasion severity in gastrointestinal malignancies: a clinicopathological study. *Ann Surg*, 260(5), 900-908. doi:10.1097/SLA.0000000000000968
- Manon-Jensen, T., Itoh, Y., & Couchman, J. R. (2010). Proteoglycans in health and disease: the multiple roles of syndecan shedding. *FEBS J*, 277(19), 3876-3889. doi:10.1111/j.1742-4658.2010.07798.x
- Margolis, R. K., Salton, S. R., & Margolis, R. U. (1987). Effects of nerve growth factor-induced differentiation on the heparan sulfate of PC12 pheochromocytoma cells and comparison with developing brain. *Arch Biochem Biophys*, 257(1), 107-114.
- Miknyoczki, S. J., Wan, W., Chang, H., Dobrzanski, P., Ruggeri, B. A., Dionne, C. A., & Buchkovich, K. (2002). The neurotrophin-trk receptor axes are critical for the growth and progression of human prostatic carcinoma and pancreatic ductal adenocarcinoma xenografts in nude mice. *Clin Cancer Res*, 8(6), 1924-1931.
- Morton, J. P., Karim, S. A., Graham, K., Timpson, P., Jamieson, N., Athineos, D., Doyle, B., McKay, C., Heung, M. Y., Oien, K. A., Frame, M. C., Evans, T. R., Sansom, O. J., & Brunton, V. G. (2010). Dasatinib inhibits the development of metastases in a mouse model of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Gastroenterology*, 139(1), 292-303. doi:10.1053/j.gastro.2010.03.034
- Nagaraj, N. S., Smith, J. J., Revetta, F., Washington, M. K., & Merchant, N. B. (2010). Targeted inhibition of SRC kinase signaling attenuates pancreatic tumorigenesis. *Mol Cancer Ther*, 9(8), 2322-2332. doi:10.1158/1535-7163.MCT-09-1212
- Nagaraj, N. S., Washington, M. K., & Merchant, N. B. (2011). Combined blockade of Src kinase and epidermal growth factor receptor with gemcitabine overcomes STAT3-mediated resistance of inhibition of pancreatic tumor growth. *Clin Cancer Res*, 17(3), 483-493. doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-1670
- Nakajima, M., Irimura, T., & Nicolson, G. L. (1988). Heparanases and tumor metastasis. *J Cell Biochem*, 36(2), 157-167. doi:10.1002/jcb.240360207
- Nakajima, T., Watanabe, S., Sato, Y., Kameya, T., Hirota, T., & Shimosato, Y. (1982). An immunoperoxidase study of S-100 protein distribution in normal and neoplastic tissues. *Am J Surg Pathol*, 6(8), 715-727.
- Nielsen, J. S., & McNagny, K. M. (2008). Novel functions of the CD34 family. *J Cell Sci*, 121(Pt 22), 3683-3692. doi:10.1242/jcs.037507
- Okada, Y., Eibl, G., Duffy, J. P., Reber, H. A., & Hines, O. J. (2003). Glial cell-derived neurotrophic factor upregulates the expression and activation of matrix metalloproteinase-9 in human pancreatic cancer. *Surgery*, 134(2), 293-299. doi:10.1067/msy.2003.239
- Okada, Y., Eibl, G., Guha, S., Duffy, J. P., Reber, H. A., & Hines, O. J. (2004). Nerve growth factor stimulates MMP-2 expression and activity and increases invasion by human pancreatic cancer cells. *Clin Exp Metastasis*, 21(4), 285-292.
- Okada, Y., Takeyama, H., Sato, M., Morikawa, M., Sobue, K., Asai, K., Tada, T., Kato, T., & Manabe, T. (1999). Experimental implication of celiac ganglionotropic invasion of pancreatic-cancer cells bearing c-ret proto-oncogene with reference to glial-cell-line-derived neurotrophic factor (GDNF). *Int J Cancer*, 81(1), 67-73.
- Ostapoff, K. T., Awasthi, N., Kutluk Cenik, B., Hinz, S., Dredge, K., Schwarz, R. E., & Brekken, R. A. (2013). PG545, an Angiogenesis and Heparanase Inhibitor, Reduces Primary Tumor Growth and Metastasis in Experimental Pancreatic Cancer. *Mol Cancer Ther*, 12(7), 1190-1201. doi:10.1158/1535-7163.MCT-12-1123
- Ozaki, H., Hiraoka, T., Mizumoto, R., Matsuno, S., Matsumoto, Y., Nakayama, T., Tsunoda, T., Suzuki, T., Monden, M., Saitoh, Y., Yamauchi, H., & Ogata, Y. (1999). The prognostic significance of lymph node metastasis and intrapancreatic perineural invasion in pancreatic cancer after curative resection. *Surg Today*, 29(1), 16-22.

- Park, H., Kim, Y., Lim, Y., Han, I., & Oh, E. S. (2002). Syndecan-2 mediates adhesion and proliferation of colon carcinoma cells. *J Biol Chem*, 277(33), 29730-29736. doi:10.1074/jbc.M202435200
- Paveliev, M., Hienola, A., Jokitalo, E., Planken, A., Bernal, M. M., Rauvala, H., & Saarna, M. (2008). Sensory neurons from N-syndecan-deficient mice are defective in survival. *Neuroreport*, 19(14), 1397-1400. doi:10.1097/WNR.0b013e32830d1486
- Pike, L. J. (2003). Lipid rafts: bringing order to chaos. *J Lipid Res*, 44(4), 655-667. doi:10.1194/jlr.R200021-JLR200
- Pour, P. M., Egami, H., & Takiyama, Y. (1991). Patterns of growth and metastases of induced pancreatic cancer in relation to the prognosis and its clinical implications. *Gastroenterology*, 100(2), 529-536.
- Ramani, V. C., Purushothaman, A., Stewart, M. D., Thompson, C. A., Vlodavsky, I., Au, J. L., & Sanderson, R. D. (2013). The heparanase/syndecan-1 axis in cancer: mechanisms and therapies. *FEBS J*, 280(10), 2294-2306. doi:10.1111/febs.12168
- Ramani, V. C., & Sanderson, R. D. (2013). Chemotherapy stimulates syndecan-1 shedding: A potentially negative effect of treatment that may promote tumor relapse. *Matrix Biol*. doi:10.1016/j.matbio.2013.10.005
- Raulo, E., Chernousov, M. A., Carey, D. J., Nolo, R., & Rauvala, H. (1994). Isolation of a neuronal cell surface receptor of heparin binding growth-associated molecule (HB-GAM). Identification as N-syndecan (syndecan-3). *J Biol Chem*, 269(17), 12999-13004.
- Reali, C., Scintu, F., Pillai, R., Cabras, S., Argioli, F., Ristaldi, M. S., Sanna, M. A., Badiali, M., & Sogos, V. (2006). Differentiation of human adult CD34+ stem cells into cells with a neural phenotype: role of astrocytes. *Exp Neurol*, 197(2), 399-406. doi:10.1016/j.expneurol.2005.10.004
- Rosenbaum, T., Vidaltamayo, R., Sanchez-Soto, M. C., Zentella, A., & Hiriart, M. (1998). Pancreatic beta cells synthesize and secrete nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(13), 7784-7788.
- Roskams, T., Rosenbaum, J., De Vos, R., David, G., & Desmet, V. (1996). Heparan sulfate proteoglycan expression in chronic cholestatic human liver diseases. *Hepatology*, 24(3), 524-532. doi:10.1053/jhep.1996.v24.pm0008781318
- Ryncarz, R. E., & Anasetti, C. (1998). Expression of CD86 on human marrow CD34(+) cells identifies immunocompetent committed precursors of macrophages and dendritic cells. *Blood*, 91(10), 3892-3900.
- Saarna, M. (2000). GDNF - a stranger in the TGF-beta superfamily? *Eur J Biochem*, 267(24), 6968-6971.
- Sailer, M. H., Gerber, A., Tostado, C., Hutter, G., Cordier, D., Mariani, L., & Ritz, M. F. (2013). Non-invasive neural stem cells become invasive in vitro by combinatorial FGF2 and BMP4 signaling. *J Cell Sci*. doi:10.1242/jcs.125757
- Sariola, H., & Saarna, M. (2003). Novel functions and signalling pathways for GDNF. *J Cell Sci*, 116(Pt 19), 3855-3862. doi:10.1242/jcs.00786
- Siegel, R., Naishadham, D., & Jemal, A. (2013). Cancer statistics, 2013. *CA Cancer J Clin*, 63(1), 11-30. doi:10.3322/caac.21166
- Silvian, L., Jin, P., Carmillo, P., Boriack-Sjodin, P. A., Pelletier, C., Rushe, M., Gong, B., Sah, D., Pepinsky, B., & Rossomando, A. (2006). Artemin crystal structure reveals insights into heparan sulfate binding. *Biochemistry*, 45(22), 6801-6812. doi:10.1021/bi060035x
- Steinkamp, M., Gundel, H., Schulte, N., Spaniol, U., Pflueger, C., Zizer, E., & von Boyen, G. B. (2012). GDNF protects enteric glia from apoptosis: evidence for an autocrine loop. *BMC Gastroenterol*, 12, 6. doi:10.1186/1471-230X-12-6

- Sutherland, D. R., & Keating, A. (1992). The CD34 antigen: structure, biology, and potential clinical applications. *J Hematother*, *1*(2), 115-129.
- Tansey, M. G., Baloh, R. H., Milbrandt, J., & Johnson, E. M., Jr. (2000). GFRalpha-mediated localization of RET to lipid rafts is required for effective downstream signaling, differentiation, and neuronal survival. *Neuron*, *25*(3), 611-623.
- Tardio, M. (2008). *The role of Syndecan-3 in chronic pancreatitis and pancreatic cancer*. (Tesi di Specializzazione), Università Cattolica del Sacro Cuore.
- Teng, Y. H., Aquino, R. S., & Park, P. W. (2012). Molecular functions of syndecan-1 in disease. *Matrix Biol*, *31*(1), 3-16. doi:10.1016/j.matbio.2011.10.001
- Tkachenko, E., Rhodes, J. M., & Simons, M. (2005). Syndecans: new kids on the signaling block. *Circ Res*, *96*(5), 488-500. doi:10.1161/01.RES.0000159708.71142.c8
- Tsui-Pierchala, B. A., Milbrandt, J., & Johnson, E. M., Jr. (2002). NGF utilizes c-Ret via a novel GFL-independent, inter-RTK signaling mechanism to maintain the trophic status of mature sympathetic neurons. *Neuron*, *33*(2), 261-273.
- Urano, T., Liu, J., Zhang, P., Fan, Y., Egile, C., Li, R., Mueller, S. C., & Zhan, X. (2001). Activation of Arp2/3 complex-mediated actin polymerization by cortactin. *Nat Cell Biol*, *3*(3), 259-266. doi:10.1038/35060051
- Veit, C., Genze, F., Menke, A., Hoeffert, S., Gress, T. M., Gierschik, P., & Giehl, K. (2004). Activation of phosphatidylinositol 3-kinase and extracellular signal-regulated kinase is required for glial cell line-derived neurotrophic factor-induced migration and invasion of pancreatic carcinoma cells. *Cancer Res*, *64*(15), 5291-5300. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-1112
- Villena, J., Berndt, C., Granes, F., Reina, M., & Vilaro, S. (2003). Syndecan-2 expression enhances adhesion and proliferation of stably transfected Swiss 3T3 cells. *Cell Biol Int*, *27*(12), 1005-1010.
- Vuoriluoto, K., Hognas, G., Meller, P., Lehti, K., & Ivaska, J. (2011). Syndecan-1 and -4 differentially regulate oncogenic K-ras dependent cell invasion into collagen through alpha2beta1 integrin and MT1-MMP. *Matrix Biol*, *30*(3), 207-217. doi:10.1016/j.matbio.2011.03.003
- Wagner, M., Lopez, M. E., Cahn, M., & Kore, M. (1998). Suppression of fibroblast growth factor receptor signaling inhibits pancreatic cancer growth in vitro and in vivo. *Gastroenterology*, *114*(4), 798-807.
- Wang, K., Demir, I. E., D'Haese, J. G., Tieftrunk, E., Kujundzic, K., Schorn, S., Xing, B., Kehl, T., Friess, H., & Ceyhan, G. O. (2014). The neurotrophic factor neurturin contributes toward an aggressive cancer cell phenotype, neuropathic pain and neuronal plasticity in pancreatic cancer. *Carcinogenesis*, *35*(1), 103-113. doi:10.1093/carcin/bgt312
- Weaver, A. M., Karginov, A. V., Kinley, A. W., Weed, S. A., Li, Y., Parsons, J. T., & Cooper, J. A. (2001). Cortactin promotes and stabilizes Arp2/3-induced actin filament network formation. *Curr Biol*, *11*(5), 370-374.
- Weiss, S. W., & Nickoloff, B. J. (1993). CD-34 is expressed by a distinctive cell population in peripheral nerve, nerve sheath tumors, and related lesions. *Am J Surg Pathol*, *17*(10), 1039-1045.
- Wu, Z. S., Pandey, V., Wu, W. Y., Ye, S., Zhu, T., & Lobie, P. E. (2013). Prognostic significance of the expression of GFRalpha1, GFRalpha3 and Syndecan-3, proteins binding ARTEMIS, in mammary carcinoma. *BMC Cancer*, *13*, 34. doi:10.1186/1471-2407-13-34
- Yao, J., Li, W. Y., Li, S. G., Feng, X. S., & Gao, S. G. (2014). Midkine promotes perineural invasion in human pancreatic cancer. *World J Gastroenterol*, *20*(11), 3018-3024. doi:10.3748/wjg.v20.i11.3018

- Yezhelyev, M. V., Koehl, G., Guba, M., Brabletz, T., Jauch, K. W., Ryan, A., Barge, A., Green, T., Fennell, M., & Bruns, C. J. (2004). Inhibition of SRC tyrosine kinase as treatment for human pancreatic cancer growing orthotopically in nude mice. *Clin Cancer Res*, *10*(23), 8028-8036. doi:10.1158/1078-0432.CCR-04-0621
- Zhu, Z., Friess, H., diMola, F. F., Zimmermann, A., Graber, H. U., Korc, M., & Buchler, M. W. (1999). Nerve growth factor expression correlates with perineural invasion and pain in human pancreatic cancer. *J Clin Oncol*, *17*(8), 2419-2428.
- Zhu, Z. W., Friess, H., Wang, L., Bogardus, T., Korc, M., Kleeff, J., & Buchler, M. W. (2001). Nerve growth factor exerts differential effects on the growth of human pancreatic cancer cells. *Clin Cancer Res*, *7*(1), 105-112.
- Zimmermann, A., Sutter, A., & Stephani, U. (1994). Evidence for an NGF-induced autocrine neurotrophic potential of glial cells in nervous system development. *Glia*, *12*(1), 81-85. doi:10.1002/glia.440120110

## 8 Anhang

### Anhang I: angewandte Materialien

Produkt	Hersteller
anti-Syndecan-3 Kaninchen polyklonaler Antikörper	Abcam (Cambridge, UK)
anti-Glukose Transporter Glut1 Maus monoklonaler Antikörper	Abcam (Cambridge, UK)
anti-CD34 [QBEND10] Maus monoklonaler Antikörper	Abcam (Cambridge, UK)
IgG HRP Kaninchen Antikörper	Amersham Biosciences (Amersham, UK)
ECL <i>immunoblotting</i> Erkennungsreagenzien	Amersham Biosciences (Amersham, UK)
Leitstrang cDNA Syntheseset für RT-PCR	Applied Biosystems (Darmstadt, Deutschland)
Tween 20	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Roticlear	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
anti-Src Kaninchen monoklonaler Antikörper	CellSignaling (Danvers, USA)
anti-Phospho Src [Tyr416] Kaninchen polyklonaler Antikörper	CellSignaling (Danvers, USA)
anti-Nonphospho Src [Tyr416] Maus monoklonaler Antikörper	CellSignaling (Danvers, USA)
Kaninchen polyklonale und Maus monoklonale IgG	Dako (Glostrup, Dänemark)
RPMI-1640 Medium	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
Trypsin-EDTA	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
Penicillin-Streptomycin	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
ExGen 500 in-vitro Transfektionsreagenz	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
anti-Vimentin Maus monoklonaler Antikörper	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
Alexa <sup>®</sup> Fluor Ziege anti-Kaninchen 488nm Antikörper	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
Alexa <sup>®</sup> Fluor Ziege anti-Maus 594nm Antikörper	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
Neurobasalmedium	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
Opti-MEM Medium	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
anti-beta-III-Tubulin [TU-20] Maus monoklonaler Antikörper	Millipore (Darmstadt, Deutschland)
anti-S100 Maus monoklonaler Antikörper	Millipore (Darmstadt, Deutschland)
Plasmid-Transfektion Set	New England Biolabs (Ipswich, USA)
fetales Kälberserum	PAN Biotech (Aidenbach, Deutschland)
AllStars <i>negative control</i> siRNA	Qiagen (Hilden, Deutschland)

HiPerfect Transfektionsreagenz	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Mini-Prep	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Proteinase-Inhibitor	Roche (Mannheim, Deutschland)
Phosphatase-Inhibitor	Roche (Mannheim, Deutschland)
anti-Syndecan-3 Kaninchen polyklonaler Antikörper	Santa Cruz Biotechnologies (Heidelberg, Deutschland)
anti-GAPDH Maus monoklonaler Antikörper	Santa Cruz Biotechnologies (Heidelberg, Deutschland)
IgG HRP Maus Antikörper	Santa Cruz Biotechnologies (Heidelberg, Deutschland)
qRT-Primer	Search LC (Heidelberg, Deutschland)
Syndecan-3 spezifische siRNA	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
anti-NGFR p75 Maus monoklonaler Antikörper	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
DAPI Färbereagenz	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Poly-D-Lysin	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Heparinase III	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Chondroitinase	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Harnstoff	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)

## Anhang II: Medien und Puffer mit ihrer Zusammensetzung

<b>Medium</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Zellkulturmedium	RPMI-1640 Medium, 10% fetales Kälberserum, 100U/ml Penicillin, 100mg/ml Streptomycin
Migrations-Medium	Neurobasal Medium, 100 U/ml Penicillin, 100mg/ml Streptomycin, 2% B27, 0,5mmol/l L-Glutamin
SDS-Polyacrylamid-Trenngel	10ml: Aqua destillata 4,9ml, 4x Lower Tris Buffer 2,5ml, AA/Bis 2,5ml, TEMED 10 $\mu$ l, 10% APS 112 $\mu$ l
<b>Puffer</b>	<b>Zusammensetzung</b>
20% LSB-Puffer	6x LSB für 200ml: 35ml Tris HCl, 10,28g SDS, 36,2ml Glycerol, 12mg Bromphenolblau, 10ml $\beta$ -2-Mercapto, pH 6,8
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	10x PBS: Natriumchlorid 137mM, Kaliumchlorid 2,7mM, Dinatriumhydrogenphosphat 10,14mM, Kaliumhydrogenphosphat 1,8mM
Anode1-Puffer	Tris 36,3g, Methanol 200ml, ad 1 L H <sub>2</sub> O, pH 10,4
Anode2-Puffer	Tris 3,03g, Methanol 200ml, ad 1 L H <sub>2</sub> O, pH 10,4
Kathode-Puffer	Tris 3,03g, $\epsilon$ -Amino-Caprone Säure 5,24g, Methanol 200ml, ad 1L H <sub>2</sub> O, pH 9,4

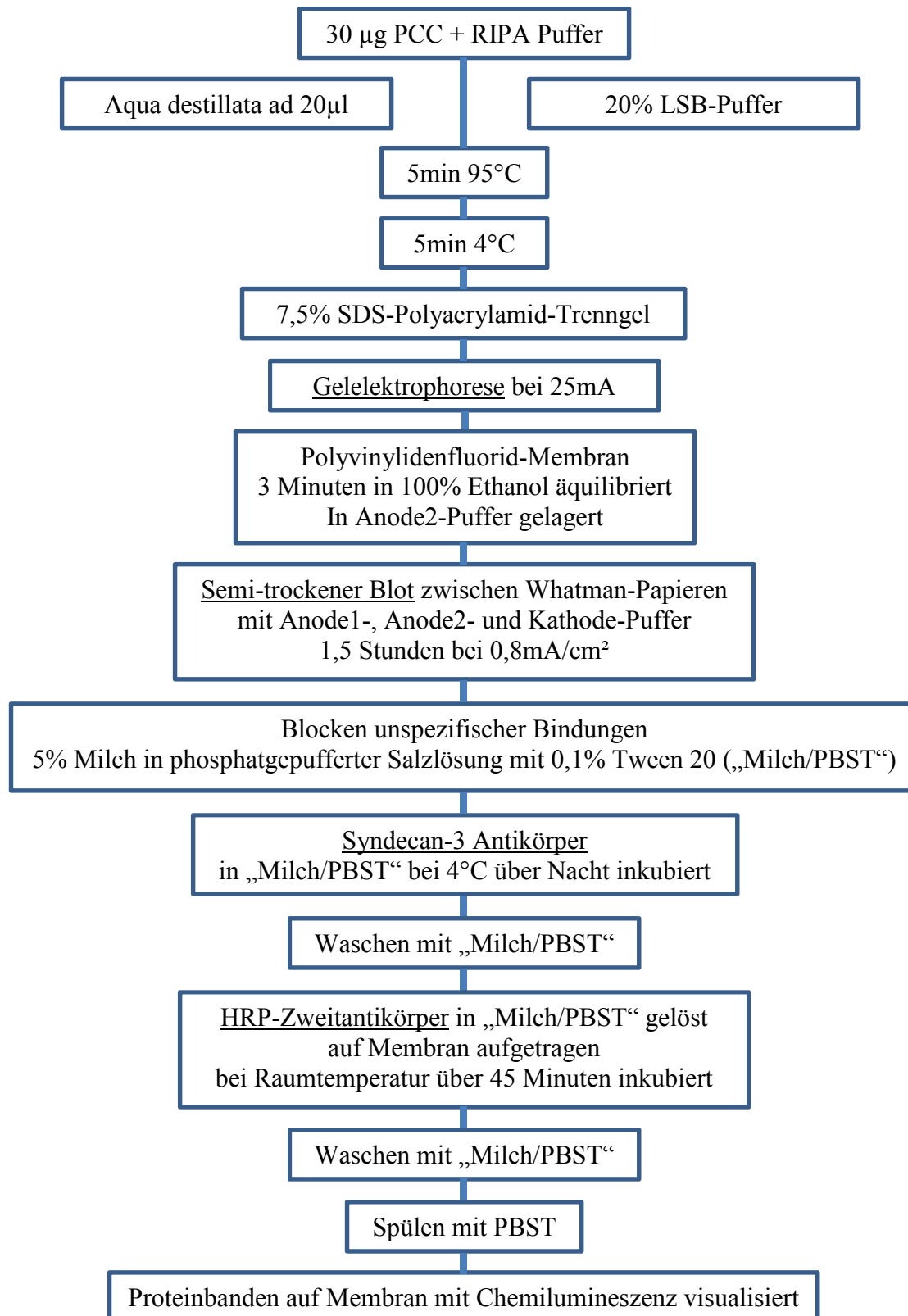


### Anhang III: Antikörper und ihre Verdünnungen

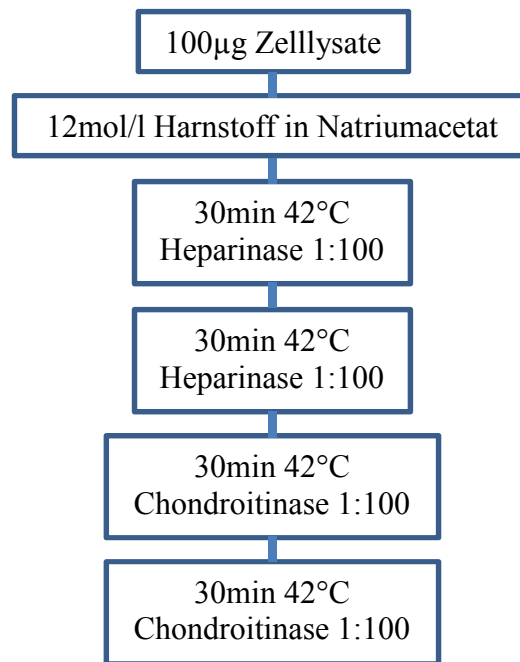
<b>Antikörper</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Einsatz</b>
anti-Syndecan-3 Kaninchen polyklonaler Antikörper (ab63932)	1:2000	<i>Immunoblot</i>
anti-Syndecan-3 Kaninchen polyklonaler Antikörper (sc15394)	1:2000	<i>Immunoblot</i>
anti-Src Kaninchen monoklonaler Antikörper	1:2000	<i>Immunoblot</i>
anti-Phospho Src [Tyr416] Kaninchen polyklonaler Antikörper	1:2000	<i>Immunoblot</i>
anti-Nonphospho Src [Tyr416] Maus monoklonaler Antikörper	1:2000	<i>Immunoblot</i>
IgG HRP Maus Antikörper	1:2000	<i>Immunoblot</i>
IgG HRP Kaninchen Antikörper	1:2000	<i>Immunoblot</i>
anti-beta-III-Tubulin [TU-20] Maus monoklonaler Antikörper	1:200	Immunzytochemie
anti-Glukose Transporter Glut1 Maus monoklonaler Antikörper	1:400	Immunzytochemie
anti-CD34 [QBEND10] Maus monoklonaler Antikörper	1:500	Immunzytochemie
anti-Syndecan-3 Kaninchen polyklonaler Antikörper	1:300	Immunzytochemie
anti-Vimentin Maus monoklonaler Antikörper	1:250	Immunzytochemie
anti-NGFR p75 Maus monoklonaler Antikörper	1:250	Immunzytochemie
anti-S100 Maus monoklonaler Antikörper	1:500	Immunzytochemie
Alexa <sup>®</sup> Fluor Ziege anti-Kaninchen 488nm Antikörper	1:400	Immunzytochemie
Alexa <sup>®</sup> Fluor Ziege anti-Maus 594nm Antikörper	1:400	Immunzytochemie
DAPI Färbereagenz	1:4000	Immunzytochemie
IgG HRP Maus Antikörper	1:400	Immunzytochemie
IgG HRP Kaninchen Antikörper	1:400	Immunzytochemie

## Anhang IV: angewandte Methoden

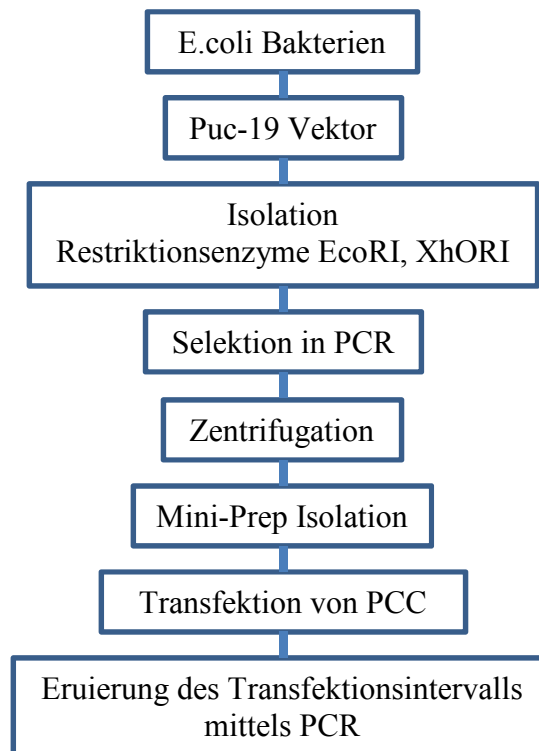
### Ad 3.2 Immunoblot



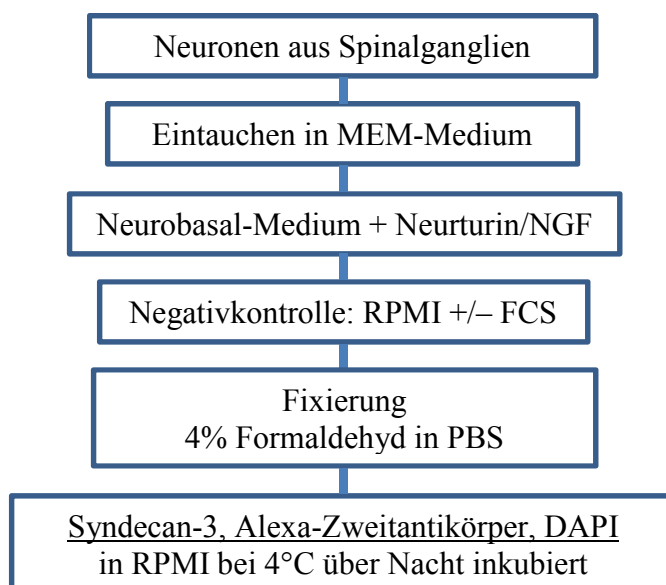
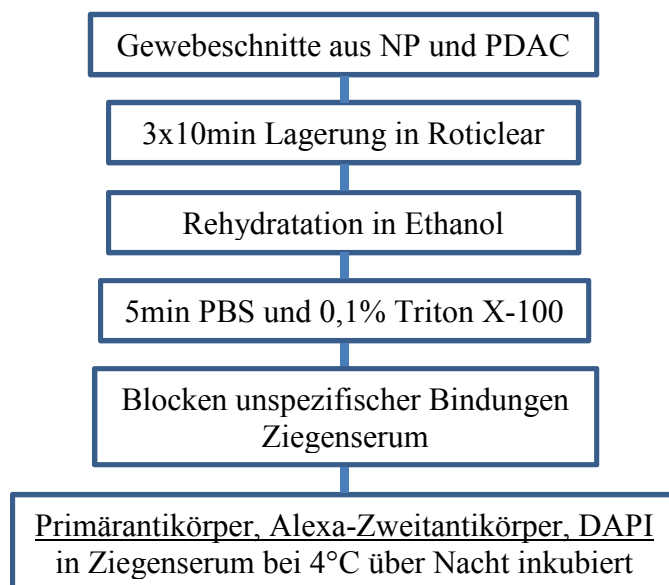
### Ad 3.3 Enzymatischer Verdau



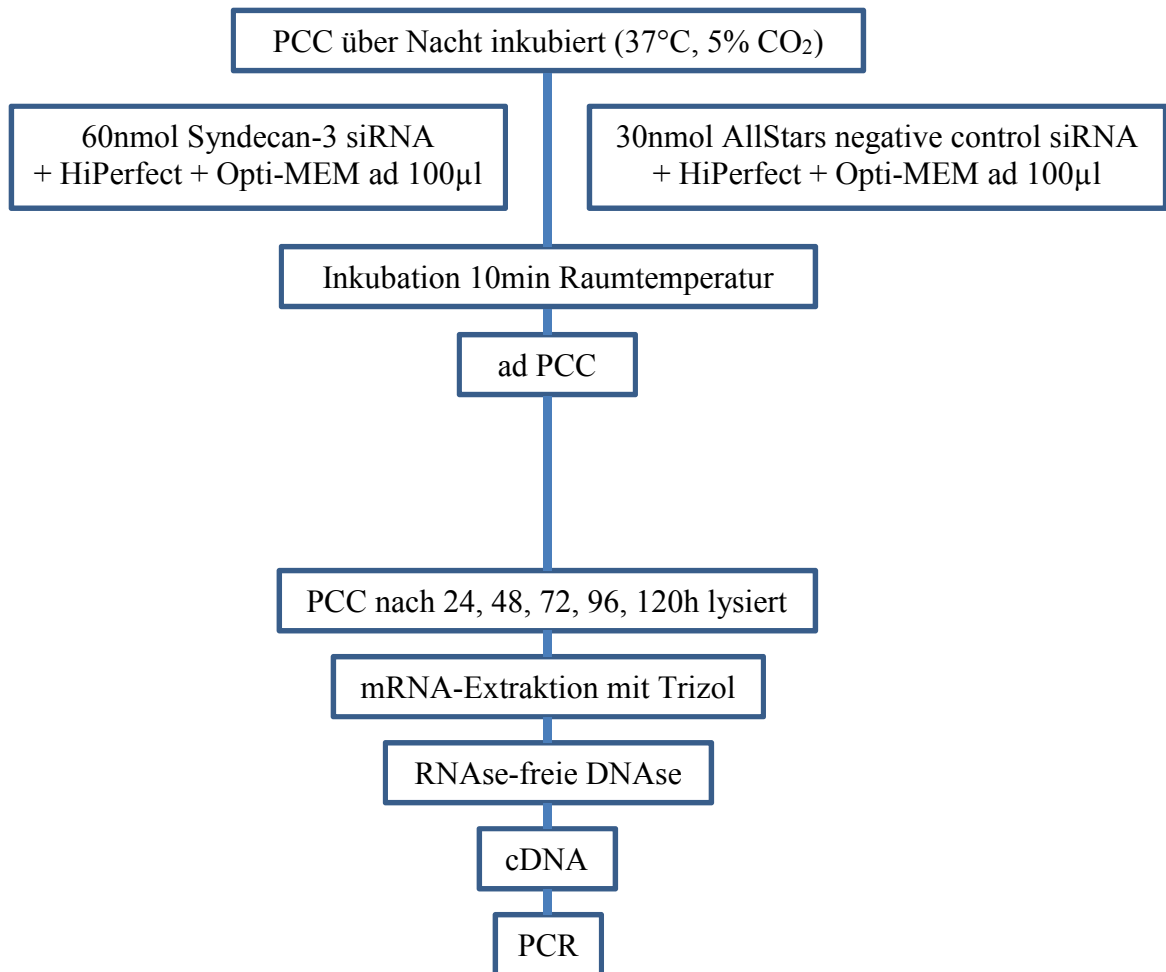
### Ad 3.4 Plasmidtransfektion



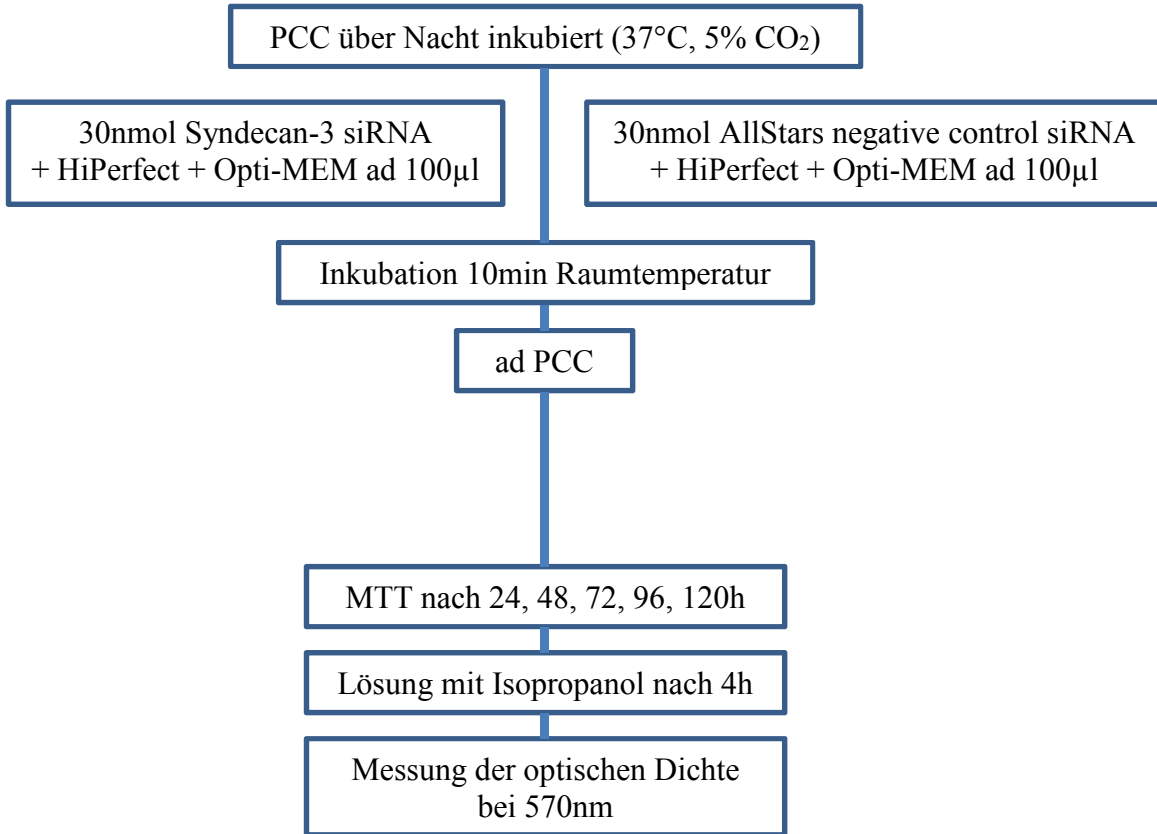
## Ad 3.5 Immunzytochemie



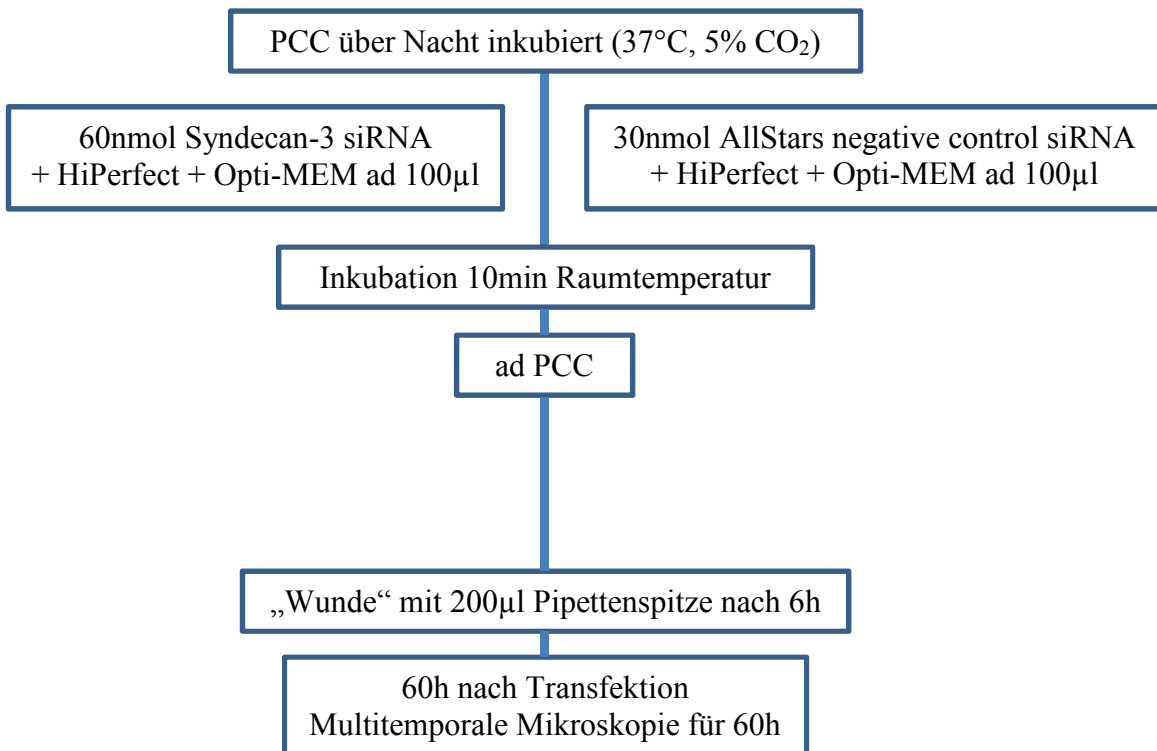
### Ad 3.6 siRNA-Transfektion



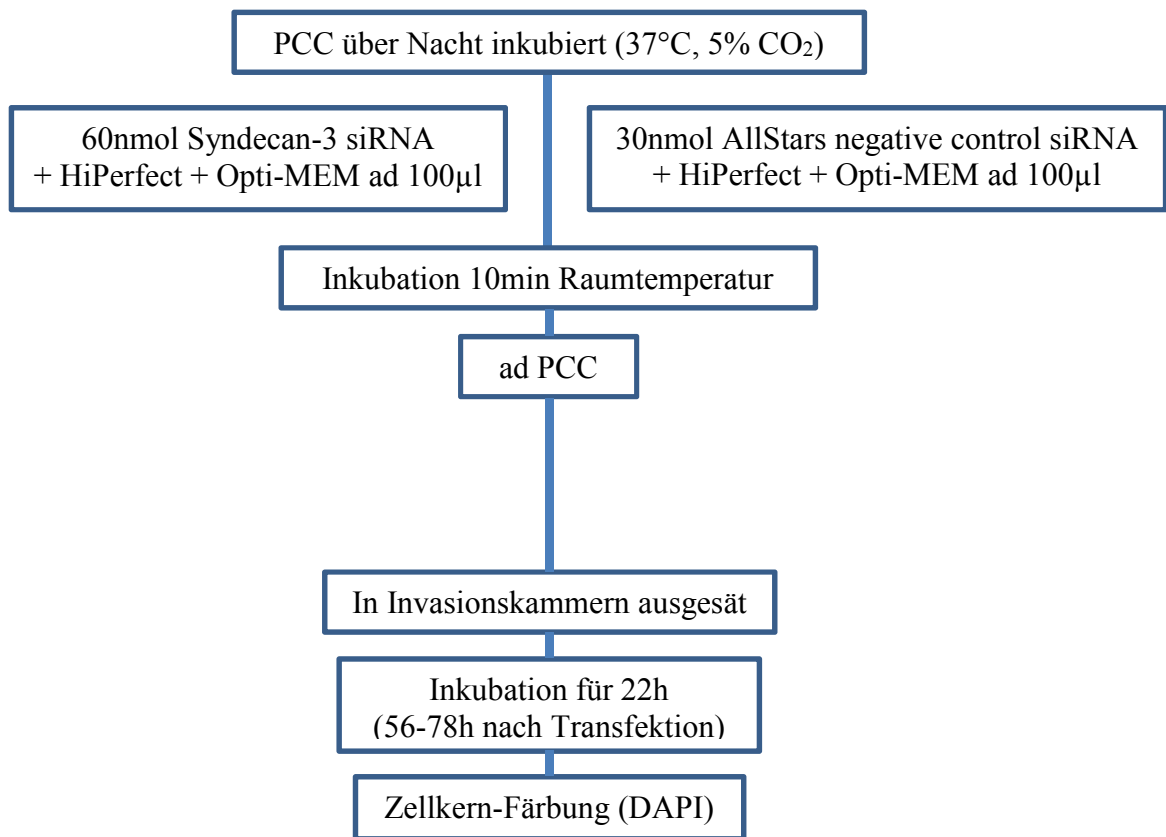
### Ad 3.7.1 MTT-Ansatz



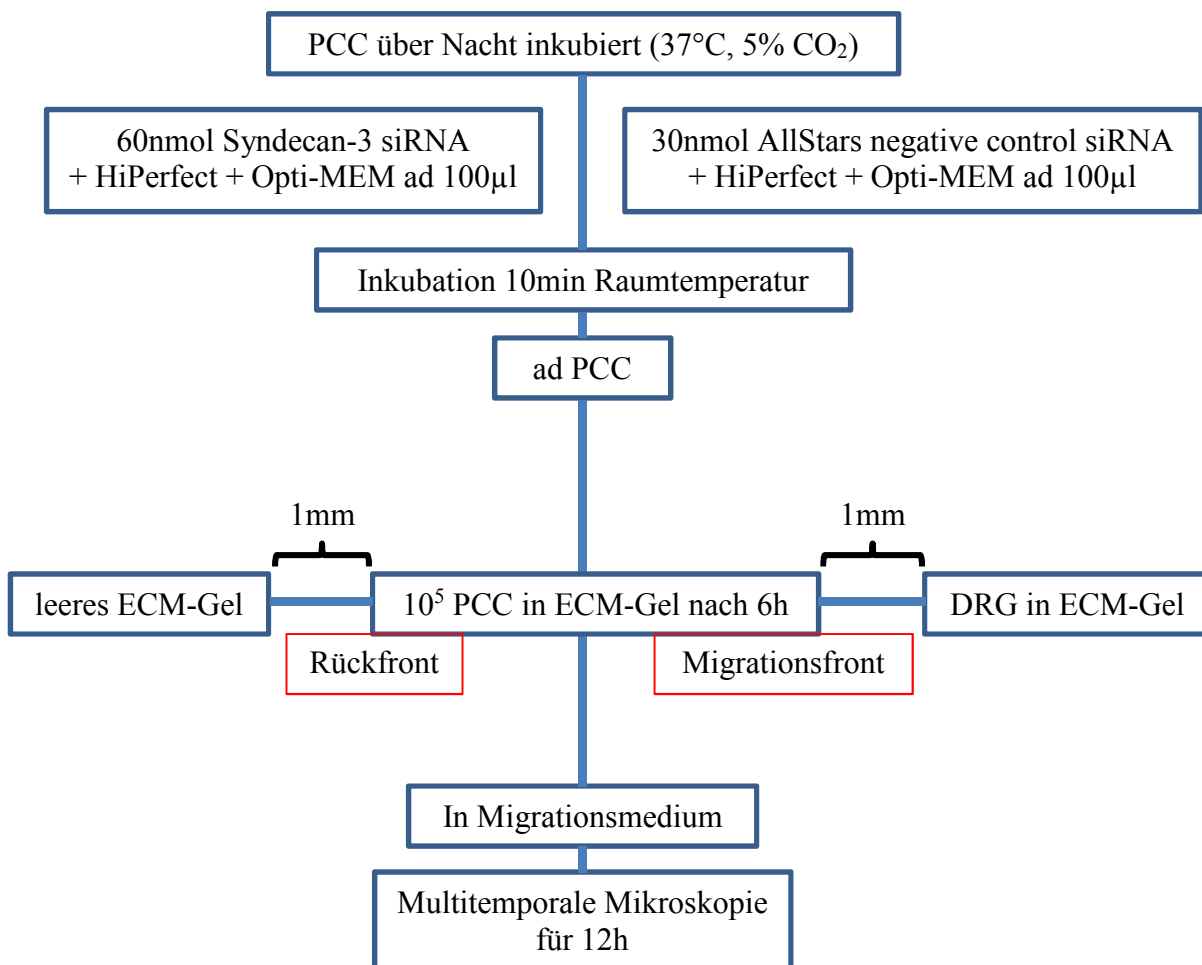
### Ad 3.7.2 Woundhealing-Ansatz



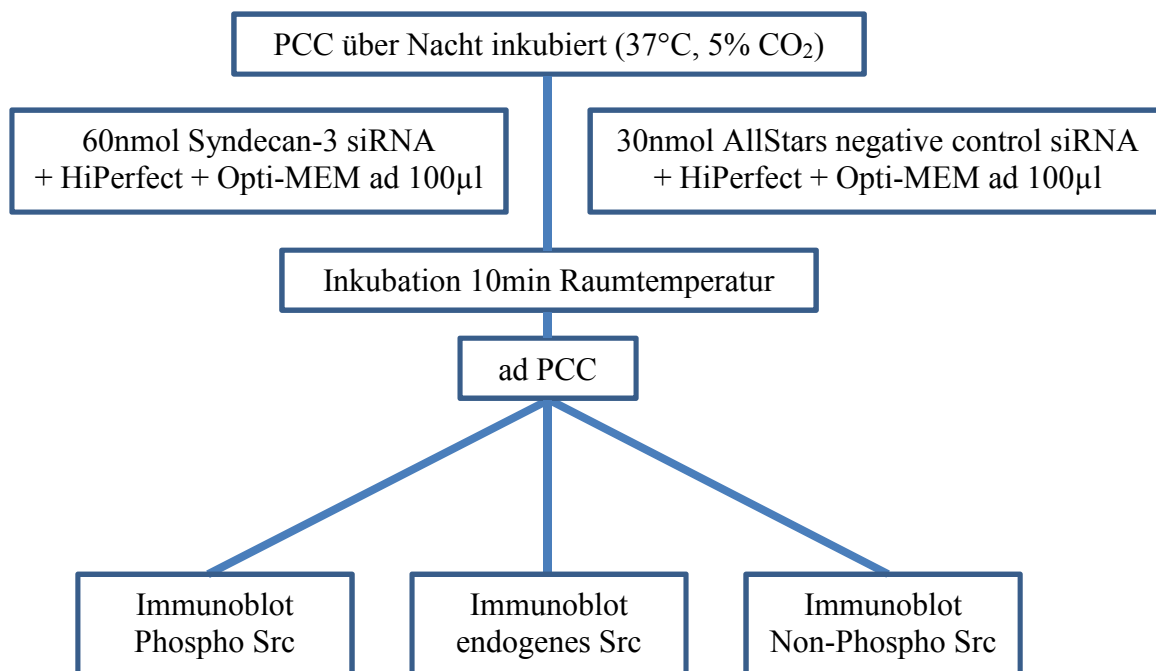
### Ad 3.7.3 Invasions-Ansatz



### Ad 3.7.4 3D Neurale-Migration-Ansatz



### Ad 3.8 Intrazelluläre Signalwege





## 9 **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: Die Bedeutung neuraler Faktoren für das Pankreaskarzinom

Abbildung 2: *Shedding* von Syndecanen

Abbildung 3: Syndecan-3 Expression im Gewebe des PDAC

Abbildung 4: 3D Neurale-Migration-Ansatz

Abbildung 5: Chemotaxis Parameter

Abbildung 6: Enzymatischer Verdau der Seitenäste von Syndecan-3

Abbildung 7: Syndecan-3 Expression in Pankreaskarzinomzellen

Abbildung 8: Überexpression von Syndecan-3 in Pankreaskarzinomzellen

Abbildung 9: Immunolokalisation von Syndecan-3 in intrapancreatischen Nerven

Abbildung 10: Wirkung neuraler Wachstumsfaktoren auf Syndecan-3 in Spinalganglien

Abbildung 11: Inhibition der Syndecan-3 Expression mittels siRNA in Pankreaskarzinomzellen

Abbildung 12: Syndecan-3 in der Proliferation von Pankreaskarzinomzellen

Abbildung 13: Syndecan-3 in der Lokomotion von Pankreaskarzinomzellen

Abbildung 14: Syndecan-3 in der Invasion von Pankreaskarzinomzellen

Abbildung 15: Messung der Nerv-gerichteten Migration

Abbildung 16: Syndecan-3 in der Nerv-gerichteten Migration von Panc-1 Pankreaskarzinomzellen

Abbildung 17: Syndecan-3 in der Gesamtmotilität von Panc-1 Pankreaskarzinomzellen

Abbildung 18: Syndecan-3 in der Nerv-gerichteten Migration von SU86.86 Pankreaskarzinomzellen

Abbildung 19: Syndecan-3 in der Gesamtmotilität von SU86.86 Pankreaskarzinomzellen

Abbildung 20: Signalweg von Syndecan-3 in der Migration von Pankreaskarzinomzellen

Abbildung 21: Einfluss von Syndecan-3 auf intrazelluläres Src in SU86.86 Pankreaskarzinomzellen

## 10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: *Immunoblot* der Syndecan-3 Expression in Pankreaskarzinomzellen.

Tabelle 2: Korrelationsanalyse der mRNA-Expression von Syndecan-3 und den Liganden GDNF, Neurturin, Artemin, Persephin sowie NGF im Pankreaskarzinom.

Tabelle 3: Korrelationsanalyse der mRNA-Expression von Syndecan-3 und den GFL-Rezeptoren GFR $\alpha$ -1, GFR $\alpha$ -2, GFR $\alpha$ -3, GFR $\alpha$ -4 sowie der Rezeptortyrosinkinase rearranged during transfection Ret im Pankreaskarzinom.

## 11 Publikationen

Diese Dissertation basiert auf folgenden Manuskripten, die zur Veröffentlichung bereit stehen:

**Albiński MK**, Kehl T, Demir IE, Tardio M, Hartmann D, Liebl Fr, Giese N, F Bergmann, Büchler MW, Friess H, Ceyhan GO. *Syndecan-3 enhances neural invasion in pancreatic cancer via modulation of Src signalling.*

**Albiński MK**, Kehl T, Tardio M, Demir IE, Giese N, Friess H, Ceyhan GO. *Syndecan-3 contributes to fibrosis and pain in chronic pancreatitis.*

## 12 Kongressbeiträge

Meeting of the European Pancreatic Club 2011 (Poster)

**MK Albiński**, T Kehl, IE Demir, H Friess, GO Ceyhan. *Syndecan-3 induces neuropathic and neuroplastic alterations in chronic pancreatitis and pancreatic cancer.*

Vereinigung der Bayerischen Chirurgen 2011 (Vortrag)

T Kehl, **MK Albiński**, IE Demir, H Friess, GO Ceyhan. *Syndecan-3 Expression führt zu neuropathischen und neuroplastischen Veränderungen im Pankreaskarzinom und in der chronischen Pankreatitis.*

United European Gastroenterology Week 2011 (Poster)

**MK Albiński**, T Kehl, IE Demir, D Hartmann, H Friess, GO Ceyhan. *Syndecan-3 induces neuropathic and neuroplastic alterations in chronic pancreatitis and pancreatic cancer.*

Jahreskongress des Deutschen Pankreas Clubs 2011 (Vortrag)

**MK Albiński**, T Kehl, IE Demir, H Friess, GO Ceyhan. *Syndecan-3 Expression führt zu neuropathischen und neuroplastischen Veränderungen im Pankreaskarzinom und in der chronischen Pankreatitis.*

## 13 Urheberrechte

Abb. 1 nach Demir (Demir et al., 2010):

*This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License (CC BY) which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.*

Abb. 2 nach Manon-Jensen (Manon-Jensen et al., 2010):

*License Number: 3750890813892*

*License date: Nov 16, 2015*

*Licensed Content Publisher: John Wiley and Sons*

*Licensed Content Publication: FEBS Journal*

*Licensed Content Title: Proteoglycans in health and disease: the multiple roles of syndecan shedding*

*Licensed Content Author: Tina Manon-Jensen, Yoshifumi Itoh, John R. Couchman*

Abb. 4 nach Ceyhan (Ceyhan et al., 2008):

*License number: 3750891375050*

*License date: Nov 16, 2015*

*Licensed content publisher: Elsevier*

*Licensed content publication: Biochemical and Biophysical Research Communications*

*Licensed content title: Neural invasion in pancreatic cancer: A mutual tropism between neurons and cancer cells*

*Licensed content author: Güralp O. Ceyhan, Ihsan Ekin Demir, Burak Altintas, Ulrich Rauch, Gerald Thiel, Michael W. Müller, Nathalia A. Giese, Helmut Friess, Karl-Herbert Schäfer*

## **14 Danksagung**

Diese Dissertation wurde im Pankreasforschungslabor der Chirurgischen Klinik der Technischen Universität München durchgeführt. Ich möchte mich bei Herrn Universitäts-Professor Dr. med. Helmut Friess für die Annahme als Doktorand und die Möglichkeit zur Forschung im Labor bedanken.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Priv.-Doz. Dr. med. Güralp O. Ceyhan, der mich für die experimentelle Forschung begeistert hat. Ich danke ihm für die wissenschaftliche Leitung des Projekts, seinen fachlichen Rat und die persönliche Unterstützung im Labor und darüber hinaus.

Danken möchte ich meinem Betreuer, Dr. rer. nat. Timo Kehl, der mich das wissenschaftliche Arbeiten im Labor gelehrt hat und mir in der Durchführung der Experimente stets zur Seite stand.

Ebenso möchte ich mich bei Dr. med. Ekin Demir und Dr. med. Dr. rer. nat. Daniel Hartmann für ihre fachliche Unterstützung im Labor und bei der Erstellung der Manuskripte bedanken.

Mein persönlicher Dank gilt meinem Mentor Dr. med. Tilmann Schober. Sein wertvoller Rat zu allen Fragen rund um Studium und Doktorarbeit waren mir stets eine große Stütze.

Abschließend möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mir den akademischen Weg aufgezeigt und mich beständig darin unterstützt haben.