

**Aus der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie
der Universität Würzburg**

Direktor: Professor Dr. med. M. Flentje

**Perioperativer Verlauf der Plasmaspiegel von Osteopontin und TGF beta 1
bei HNO-Tumoren**

Inaugural – Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Philipp Johannes Kaiser

aus Remseck a. N.

Würzburg, Mai 2017

Referenten:

Referent: Prof. Dr. med. M. Flentje

Koreferent: Priv.-Doz. Dr. med. S. Hackenberg

Dekan: Prof. Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 26.03.2018

Der Promovend ist Arzt.

Meinen Eltern in Dankbarkeit

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1 Epidemiologie.....	1
1.2 Risikofaktoren	2
1.3 Virale Erreger.....	2
1.4 Leukoplakie / Erythroplakie	3
1.5 Zweitmalignome.....	4
1.6 Therapie und Prognose	4
1.7 Osteopontin	6
1.8 TGF beta 1	10
2. Fragestellung	14
3. Material und Methoden.....	15
3.1 Patientenkollektiv	15
3.2 Probengewinnung	17
3.3 ELISA für Osteopontin	18
3.4 ELISA für TGF beta 1	19
3.5 Statistik.....	20
4. Ergebnis.....	23
4.1 Unterschiede zum Zeitpunkt T0	23
4.2 Perioperativer Verlauf von Osteopontin.....	24
4.3 Osteopontin von primär bestrahlten Patienten (prim RTX).....	26
4.4 Perioperativer Verlauf von TGF beta 1.....	26
4.5 OPN von prim OP in Abhängigkeit zu klinischen Parametern	27
4.6 TGF beta 1 von prim OP in Abhängigkeit zu klinischen Parametern.....	32
4.7 Korrelation OPN und TGF beta 1 bei prim OP	38
4.8 Korrelation OPN/TGF beta 1 bei prim RTX.....	39
4.9 OPN bzw. TGF beta 1 und Überleben.....	40
4.10 Zusammenfassung der Ergebnisse	46
5. Diskussion.....	47
5.1 Anstieg von OPN operativ induziert oder durch Wundheilungsprozesse.....	48
5.2 Zusammenhang von OPN und TGF beta 1 bei der Wundheilung	49
5.3 OPN fällt zu T3 nicht unter Ausgangsniveau	51
5.4 Vorgängerstudie: OPN vor adjuvanter Radiatio nicht unter Niveau von Patienten vor primärer Radiatio	52

5.5 OPN und TGF beta 1 und Überleben.....	52
5.6 OPN und TGF beta 1 zum Zeitpunkt T0.....	56
5.7 Verhältnis von OPN und TGF beta 1 zu klinischen Parametern	56
6. Zusammenfassung und Schlussfolgerung	61
7. Literaturverzeichnis.....	63
8. Abbildungsverzeichnis.....	71
9. Tabellenverzeichnis.....	72

Abkürzungsverzeichnis

ANOVA	-	Analysis of Variance (Varianzanalyse)
BSP	-	Bone Sialoprotein
EORTC	-	European Organization for Research and Treatment of Cancer
°C	-	Grad Celsius
CAF	-	cancer-associated fibroblasts
CO ₂	-	Kohlenstoffdioxid
COPD	-	Chronic obstructive pulmonary disease
CT	-	Computertomografie
CUP	-	Cancer of unknown primary
DC	-	Dendritische Zellen
DMP 1	-	Dentin Matrixprotein 1
DNA	-	Deoxyribonucleinsäure
DSPP	-	Dentin Sialophosphoprotein
EBV	-	Epstein-Barr Virus
EDTA	-	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	-	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EMT	-	Epidermal to Mesenchymal Transition
FDG-PET	-	Fluorodeoxyglucose Positron Emission Tomography
Gy	-	Gray (Einheit der Energiedosis)
HNO	-	Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde
HPV	-	Humanes Papillomavirus
IBL	-	Immuno-Biological Laboratories Co., Ltd.
IgA	-	Immunglobulin A
IgG	-	Immunglobulin G, bzw. Gammaglobulin
IgM	-	Immunglobulin M
KHK	-	Koronare Herzerkrankung

LAP	-	Latency Associated Protein
LTBP	-	Latent TGF beta Binding Protein
MEPE	-	Matrix Extracellular Phosphoglycoprotein
ml	-	Milliliter
MLEC	-	Mink lung epithelial cells
mm	-	Millimeter
mRNA	-	Messenger Ribonukleinsäure
MRT	-	Magnet Resonanz Tomografie
MSC	-	Mesenchymal stem cell
MZF 1	-	myeloid zinc finger 1
ng	-	Nanogramm
NK	-	Natural Killer Cells
nm	-	Nanometer
NSCLC	-	Non small cell lung cancer
OPN	-	Osteopontin
P	-	P-Wert
PAI-1	-	Plasminogen activator inhibitor-1
PAI-1/L	-	Plasminogen activator inhibitor-1-Luciferase-Komplex
p53	-	Tumor protein 53
pg	-	Picogramm
pM	-	Picomolar
prim OP	-	Patientengruppe primär operierter Patienten
prim RTX	-	Patientengruppe primär bestrahlter Patienten
RT	-	Radiotherapie
SA-HRP	-	Streptavidin-horseradish Peroxidase Konjugat
SCCHN	-	Squamous Cell Carcinomas of Head and Neck
SIBLING	-	small integrin-binding ligand, N-linked glycoprotein
TG2	-	Transglutaminase 2
TGF beta 1	-	Transforming Growth Factor beta1

TGFBR2	-	TGF beta Rezeptor 2
TMB	-	Tetra Methyl Benzidine
UICC	-	Union internationale contre le cancer
WHO	-	World Health Organization
µl	-	Mikroliter

1. Einleitung

1.1 Epidemiologie

Der Kopf- und Halsbereich kann aufgrund der komplexen anatomischen Gegebenheiten Entstehungsort einer Vielzahl von Tumoren sein. Zu nennen sind Tumore des Nasopharynx, der Parotis und der Schilddrüse, aber auch Melanome, Sarkome, Lymphome und Plattenepithelkarzinome des gesamten Larynx, Oro- und Hypopharynx, der Nasennebenhöhlen und der Mundhöhle. Diese letztgenannte Gruppe macht 90% aller Tumore des Gebiets aus und wird im angelsächsischen Raum mit dem Sammelbegriff Squamous Cell Carcinomas of Head and Neck (SCCHN) bezeichnet (Chang, Ganz et al. 2006). Diese Tumore sind Inhalt der vorliegenden Arbeit. Im Folgenden werden sie als HNO-Tumore bezeichnet.

Die weltweite Inzidenz beläuft sich auf 550.000 Diagnosen pro Jahr, 45.000 davon in den USA (Parkin, Pisani et al. 1999, Siegel, Miller et al. 2015, Toporcov, Znaor et al. 2015). Dort machen HNO-Tumore 3% der gesamten Inzidenz an Krebsleiden aus, weltweit belegen sie auf der Liste der tödlich verlaufenden malignen Erkrankungen Rang acht (Shibuya, Mathers et al. 2002). Am häufigsten betroffen sind Männer über 60 aus sozial schwächeren Schichten (Chang, Ganz et al. 2006, Siegel, Miller et al. 2015), auch wenn eine zunehmende Tendenz bei alten Menschen und jungen Frauen zu beobachten ist (Plinkert 2013). Aufgrund der Anstrengungen der letzten Jahre im Kampf gegen Krebs konnte in den USA die Fünfjahresüberlebensrate für Patienten mit HNO-Tumor von 53% (1970er) auf 66% (2000er) gesteigert werden (Siegel, Miller et al. 2015). In Deutschland liegt die Rate für den Zeitraum 2009-2010 bei etwa 53% (Robert-Koch-Institut 2009/2010). Die ungünstige Prognose wird durch das erhöhte Risiko der Patienten für weitere Erkrankungen wie Koronare Herzerkrankung (KHK), Erkrankungen der Atemwege und Zweitmalignome beeinflusst. Das ist wiederum durch die speziellen Risikofaktoren erklärbar (Chang, Ganz et al. 2006, Robert-Koch-Institut 2009/2010).

1.2 Risikofaktoren

Die Risikofaktoren bei HNO-Tumoren sind sehr gut untersucht. An erster Stelle steht der Konsum von Tabak. Hierbei korreliert das relative Risiko, einen HNO-Tumor zu entwickeln, positiv mit der Menge und der Dauer des Tabakkonsums (Winn, Blot et al. 1981, Znaor, Brennan et al. 2003, Rodriguez, Altieri et al. 2004). Aber auch der alleinige Konsum von Alkohol steigert das Risiko. Die Kombination beider Noxen steigert das relative Risiko um den Faktor 100 (Neville and Day 2002).

Auch Ernährungsgewohnheiten haben einen Einfluss auf die Entwicklung von Krebs im beschriebenen Gebiet, sind doch die Schleimhäute dem direkten Kontakt der aufgenommenen Nahrung ausgesetzt. Der häufige Konsum von Eiern und rotem Fleisch bringt ein etwa zweifaches Risiko; Schweinefleisch, allgemein verarbeitetes Fleisch sowie Hackfleisch und Wurst ein etwa dreifach erhöhtes Risiko. Milch, Fisch, Obst und Gemüse reduzieren das Risiko um 50% bis 80% (Levi, Pasche et al. 1998).

1.3 Virale Erreger

Wenngleich ein starker Zusammenhang zwischen dem Konsum von Tabak und Alkohol und dem Entstehen von HNO-Tumoren belegt ist, so weisen doch 25% der Patienten keine Exposition zu den oben genannten Noxen auf (Chang, Ganz et al. 2006). Schon seit längerem ist der Zusammenhang zwischen einer Infektion mit den so genannten „High Risk“-Typen des Humanen Papillomavirus (HPV) (Typ 16; 18; 31; 45) und einer Vielzahl von Krebsarten, insbesondere des Cervixkarzinoms, bekannt (Ault 2006, Parkin 2006). Bei 15-25% der SCCHN lässt sich HPV-DNA, hauptsächlich Typ 16 und in geringem Umfang Typ 18, nachweisen (Kreimer, Clifford et al. 2005). Verglichen mit gesunder Mundschleimhaut ist die Wahrscheinlichkeit HPV-DNA zu detektieren beim Vorliegen einer benignen Leukoplakie um das Zwei- bis Dreifache erhöht. Bei

einem bestehenden Karzinom in der Mundhöhle beträgt der Faktor 4,7 (Miller and Johnstone 2001).

Auch das Epstein-Barr Virus (EBV) ist nachweislich assoziiert mit der Entstehung von Karzinomen im Nasopharynx (Lo, Chung et al. 2012). Da jedoch Nasopharynxkarzinome mit Blick auf ihre Pathologie, Epidemiologie und Behandlungsoptionen eine Sonderrolle unter den HNO-Tumoren einnehmen (Chang, Ganz et al. 2006), werden sie im englischsprachigen Raum nicht zur Gruppe der SCCHN gezählt und sind außerdem in den in dieser Arbeit untersuchten Patienten nicht repräsentiert.

1.4 Leukoplakie / Erythroplakie

Ein weiterer Risikofaktor für die Entwicklung eines Plattenepithelkarzinoms, vorwiegend in der Mundhöhle, ist das Vorhandensein einer Präkanzerose, die als Leukoplakie bezeichnet wird und bei der es sich im Wesentlichen um eine Keratinisierungsstörung handelt (Lodi, Sardella et al. 2006). Optisch ähnelt sie einer oralen Kandidose, die laut einigen Quellen auch als ein Risikofaktor für Krebs gilt (Chang, Ganz et al. 2006). Wie bei Karzinomen tritt die Leukoplakie gehäuft bei Rauchern auf und birgt ein Risiko von bis zu 20%, in den folgenden 30 Jahren maligne zu entarten (Lodi, Sardella et al. 2006). Wird das Rauchen aufgegeben, so besteht die Chance einer Rückbildung (Scully and Porter 2000).

Daneben existiert noch die Erythroplakie. Hierbei handelt es sich um Läsionen der Mundschleimhaut, die sich als samtig rötliche Beläge präsentieren und keiner anderen Pathologie zugeordnet werden können (Kramer, Lucas et al. 1978). Auch hier gelten Alkohol und Tabak als Risikofaktoren (Hashibe, Mathew et al. 2000). In einer Studie konnte bei Vorliegen einer Erythroplakie bioptisch in 91% der Fälle ein invasives Karzinom, ein Carcinoma in situ oder eine Dysplasie festgestellt werden (Shafer and Waldron 1975). SCCHN entwickeln sich meist schrittweise ausgehend von Normalgewebe über Hyperkeratosen, Hyperplasien, Dysplasien und Carcinoma in situ zu invasiven Karzinomen. (Califano, van der Riet et al. 1996, Reith and Sudbø 2002, Foy, Bertolus et al. 2013).

1.5 Zweitmalignome

Trotz erfolgreicher Therapie eines HNO-Tumors besteht die für das Überleben des Patienten große Gefahr in der möglichen Entwicklung eines Zweitmalignoms. Gemäß Studien bewegt sich dieses Risiko zwischen 9,1% (Jones, Morar et al. 1995) und 23% (Cooper, Pajak et al. 1989) innerhalb der folgenden 20 Jahre. Am häufigsten betroffen ist erneut der Kopf- und Halsbereich mit 50% aller Zweitmalignome, gefolgt von der Lunge mit 34%. In 86% der Fälle handelt es sich wieder um Plattenepithelkarzinome (Jones, Morar et al. 1995). Dies ist erklärbar durch das Konzept der Feldkanzerisierung (Slaughter, Southwick et al. 1953). Demnach besteht ein erhöhtes Risiko für die parallele oder zeitversetzte Bildung von Malignomen in Geweben, die durch das gleiche Umweltgift, in diesem Fall vorwiegend Tabak, belastet wurden (Chang, Ganz et al. 2006). Darüber hinaus konnte in einigen Fällen nachgewiesen werden, dass Zellen eines Hypopharynx- und Ösophaguskarzinoms sowie eines Tonsillar- und Ösophaguskarzinoms identische genetische Alterationen aufwiesen (Califano, Leong et al. 1999).

1.6 Therapie und Prognose

Generell können HNO-Tumore operativ oder durch eine primäre Radiochemotherapie behandelt werden.

Kleine Tumore des Larynx und der Mundhöhle können, sofern sie in frühem Stadium erkannt werden, einfach reseziert werden (Bethesda 2013). Frühzeitig erkannte Hypopharynxkarzinome, sowie Oropharynxkarzinome bei HPV positiven Patienten lassen sich durch primäre Radiochemotherapie behandeln (Thurnher 2011, Cerezo, Lopez et al. 2013).

Bei fortgeschrittenen Tumoren wird im Rahmen der Operation bei Lymphknotenbefall eine Neck Dissection durchgeführt. Postoperativ schließt sich meist eine adjuvante Radiochemotherapie an. Sollte der Tumor sich als nicht

operabel erweisen, so kann eine neoadjuvante Chemotherapie Operabilität ermöglichen (de Cassia Braga Ribeiro, Kowalski et al. 2003, Thurnher 2011, Bethesda 2013, Plinkert 2013).

Bei den oben beschriebenen konventionellen Therapieschemata für Tumore von Larynx und Pharynx steht die Chirurgie im Mittelpunkt. Da dies bei größeren Tumoren jedoch häufig eine Laryngektomie beinhaltet, besteht natürlich ein Interesse an nichtchirurgischen, organerhaltenden Strategien. Eine Studie der Deutschen Gesellschaft für Larynx- und Organerhalt aus dem Jahr 2009 erzielte mit einer Induktionschemotherapie bestehend aus Paclitaxel und Cisplatin, gefolgt von Strahlentherapie bei Respondern gute Ergebnisse in Hinsicht auf Organerhalt. Nachfolgend arbeitete man an einer Studie, in der als Induktionschemotherapie Docataxel, Cisplatin und 5-Fluoruracil sowie bei einer Patientengruppe zusätzlich Cetuximab verabreicht wurde, gefolgt von Radiotherapie bei Respondern (Dietz, Rudat et al. 2009, A. Dietz 2010). Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die zusätzliche Gabe von Cetuximab die Überlebenszeit ohne Laryngektomie und die Gesamtüberlebenszeit verlängert (Dietz, Wichmann et al. 2016).

Das Karzinom des Hypopharynx weist unter den HNO-Tumoren mit einer Fünfjahresüberlebensrate von 35% die schlechteste Prognose auf, was sowohl mit der wenig charakteristischen Symptomatik, als auch mit der Tatsache, dass 70% der Karzinome bei Erstdiagnose bereits metastasiert sind, zusammen hängt (Lenarz and Boenninghaus 2012).

Beim Oropharynxkarzinom hängt die Prognose sehr vom Stadium des Tumors ab. Während in den Stadien I und II die Fünfjahresüberlebensrate noch bei 76,6% und 64,4% liegt, beträgt sie für die Stadien III und IV nur noch 44,8% und 25,5%. Auffällig ist, dass sich ein Patientenalter von über 70 Jahren positiv auf die Prognose auszuwirken scheint (de Cassia Braga Ribeiro, Kowalski et al. 2003). Beim Larynxkarzinom hängt die Prognose stark von der Lokalisation ab. Die Fünfjahresüberlebensrate reicht von 90% bei oberflächlichen Tumoren der Stimmlippen bis 65% im supraglottischen Raum (Lenarz and Boenninghaus 2012).

Auch innerhalb der Mundhöhle hat die Lokalisation des Tumors großen Einfluss auf die Prognose, wie ein Vergleich der Fünfjahresüberlebensraten zeigt. Sie beträgt beim Befall der Lippen 95%, beim Zungengrundkarzinom nur noch 40% (de Cassia Braga Ribeiro, Kowalski et al. 2003, Lenarz and Boenninghaus 2012).

1.7 Osteopontin

Im Zentrum dieser Arbeit steht das Protein Osteopontin (OPN). Es handelt sich um einen Vertreter der SIBLING-Glycoproteinfamilie (Bellahcene, Castronovo et al. 2008). Der Name ist ein Akronym und steht für small integrin-binding ligand, N-linked glycoprotein. Neben OPN zählen noch bone sialoprotein (BSP), dentin matrix protein 1 (DMP 1), dentin sialophosphoprotein (DSPP) sowie matrix extracellular phosphoglycoprotein (MEPE) zu dieser Proteinfamilie. Diese sind Teil der extrazellulären Matrix von Knochen und Dentin, wo ihnen eine Rolle in der Mineralisierung zugesprochen wird (Chaplet, de Leval et al. 2003, Qin, Baba et al. 2004). Die SIBLING-Proteine sind beim Menschen auf Chromosom 4q21-23 lokalisiert (Rittling and Denhardt 1999). Das Molekulargewicht von OPN kann durch posttranslationale Modifikation Werte von 41kDa bis 75kDa annehmen (Rangaswami, Bulbule et al. 2006, Anborgh, Mutrie et al. 2011). Das Ausmaß der posttranslationalen Modifikation, der OPN ausgesetzt ist, hängt stark vom jeweiligen Gewebe ab. Phosphorylierung scheint eine bedeutende Rolle in einigen physiologischen Prozessen, aber auch der Migration von Krebszellen zu spielen. Auch Crosslinking von OPN Monomeren scheint Einfluss auf die Aggressivität von Tumorzellen zu nehmen (Wang and Denhardt 2008, Anborgh, Mutrie et al. 2011).

Erstmals entdeckt wurde OPN in Osteoblasten, daher auch der Name Osteopontin. Sowohl Osteoblasten, als auch Osteozyten und Osteoklasten exprimieren OPN (Merry, Dodds et al. 1993), also Zellen des Knochengewebes, des Knochenaufbaus und des Knochenabbaus (Choi, Kim et al. 2008). In Studien konnte nachgewiesen werden, dass OPN bei der Remodellierung von Knochengewebe eine Rolle spielt (Merry, Dodds et al. 1993). Spezieller deuten weitere Studien darauf hin, dass OPN wichtig für das Andocken von Osteoklasten

an Knochengewebe ist (Reinholt, Hulthenby et al. 1990). Ferner führen Hypocalciämie und Hypophosphatämie und der damit einhergehende Anstieg von Calcitriol zu einem Anstieg der OPN Expression (Yucha and Guthrie 2003). Obwohl OPN ein extrazelluläres Protein ist, so wurde doch auch eine intrazelluläre Variante entdeckt. Eine Studie deutet darauf hin, dass diese bedeutsam ist für die Migration von embryonalen Fibroblasten, Makrophagen, sowie metastasierten Zellen (Zohar, Suzuki et al. 2000). Eine weitere Studie konzentriert sich speziell auf eine angenommene modulierende Tätigkeit bezüglich Chemotaxis bei Makrophagen und kommt zu ähnlichen Ergebnissen (Zhu, Suzuki et al. 2004). Ebenso wird eine Bedeutung des intrazellulären Proteins bei Migration, Fusion und resorptiven Tätigkeit von Osteoklasten angenommen (Suzuki, Zhu et al. 2002).

Auch scheint OPN in der Pathogenese einer ganzen Reihe von Autoimmunerkrankungen eine Rolle zu spielen. Zu nennen wären hier die Multiple Sklerose, der systemische Lupus Erythematoses und die Rheumatoide Arthritis, aber auch die COPD und Asthma bronchiale. So wundert es nicht, dass in vielen Zellen des Immunsystems der Nachweis einer OPN-Produktion erbracht werden konnte, darunter in Makrophagen, neutrophile Granulozyten, dendritische Zellen, sowie in T- und B Lymphozyten exprimiert wird. Dies wiederum legt nahe, dass OPN in der Generierung der Immunantwort bedeutsam ist (Wang and Denhardt 2008).

Die Wirkungsweise von OPN geschieht vornehmlich über verschiedene Integrinrezeptoren wie $\alpha\beta1$, $\alpha\beta3$, $\alpha\beta5$, $\alpha4\beta1$, $\alpha8\beta1$, $\alpha9\beta1$ sowie über den Rezeptor CD44, die allesamt auf der Zelloberfläche exprimiert werden. Zentral im OPN Molekül gelegen befindet sich eine Bindungsstelle für Thrombin, welches Osteopontin in zwei Hälften schneiden kann und hierdurch weitere Bindungsstellen für Membranrezeptoren freilegen kann. Zum einen handelt es sich um eine Arginin-Glycin-Aspartat-Sequenz (RGD) für die Integrinrezeptoren $\alpha\beta3$ und $\alpha\beta5$, zum anderen um eine Serin-Valin-Valin-Tyrosin-Glycin-Leucin-Arginin-Sequenz (SVVYGLR) für die Integrinrezeptoren $\alpha9\beta1$ und $\alpha4\beta1$, welche an der Zelle die Zelladhäsion fördern. Das C-terminale Ende wiederum bindet an

die Rezeptoren CD44v3 und CD44v6 und fördert Proliferation, Zellinvasion und somit Tumorgenese (Bellahcene, Castronovo et al. 2008).

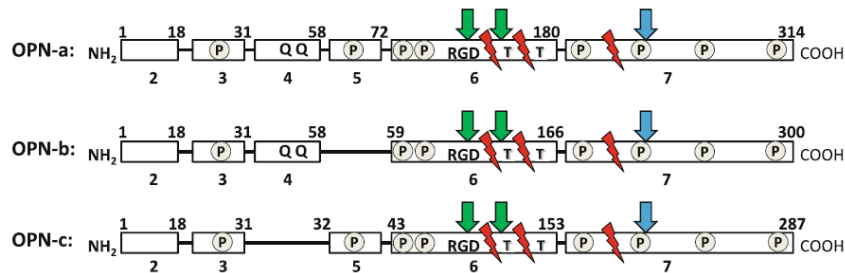


Fig. 1 Schematic of three OPN splice variants, OPN-a, OPN-b and OPN-c, highlighting important functional domains and the differences between isoforms. Full length OPN pre-mRNA is 7 exons in length, with 6 translated exons. Integrin binding (*green arrow*) occurs at RGD and cryptic SVVYGLR sequences, while CD44 variant receptor binding (*blue arrow*) occurs near the C-terminus. Thrombin cleavage (T) and MMP cleavage (red zig zag) sites are present in all three isoforms. Serine/threonine phosphorylated residues occur in clusters

(circled P) throughout and are modified based on origin and function of OPN. Transglutaminase cross-linking occurs at glutamine residues (Q Q). OPN-b lacks exon 5 and is therefore missing certain phosphorylated sites, while OPN-c lacks exon 4 and is unable to undergo transglutaminase cross-linking. Clinical and functional differences do exist between OPN isoforms, however, these differences appear to be cancer cell type specific

Abbildung 1: Die drei Splicevarianten von OPN. Grafik und Erläuterung (Anborgh, Mutrie et al. 2011).

Durch das Schneiden des Proteins an oben erwähnter Thrombinbindungsstelle und das hieraus folgende Freilegen zusätzlicher Epitope für die Integrinrezeptoren $\alpha\beta 1$, $\alpha 9\beta 1$ und $\alpha 9\beta 4$, welche z.B. von Leukozyten ausgebildet werden, können diese Rezeptoren über verschiedene Signalwege in ihren Zellen eine Immunantwort auslösen. Darüber hinaus fördert OPN die Produktion und Freisetzung von Immunglobulinen in B-Lymphozyten (Wang and Denhardt 2008, Anborgh, Mutrie et al. 2011) und steht im Verdacht, die Mastzelldegranulation zu fördern (Nagasaka, Matsue et al. 2008).

In der Folge konnte nachgewiesen werden, dass OPN auch abseits des Knochengewebes in einer Vielzahl von Geweben exprimiert und in Körperflüssigkeiten wie Blut, Speichel, Urin, Samenflüssigkeit, Muttermilch und Gallenflüssigkeit sezerniert wird. Von Herz über Lunge, Nieren, Knochen, Gehirn, Leber sowie den gesamten Gastrointestinaltrakt und das Fettgewebe kann beobachtet werden, dass OPN als Reaktion auf Verletzung und Entzündung oder Ischämie verstärkt exprimiert wird (Anborgh, Mutrie et al. 2011).

Dies gilt auch für die meisten Tumore (Bellahcene, Castronovo et al. 2008, Wang and Denhardt 2008). Damit auch, relevant für die vorliegende Arbeit, für Tumore

des HNO-Bereiches. So konnte nachgewiesen werden, dass Patienten mit HNO-Tumoren erhöhte OPN Plasmaspiegel aufweisen, was negativ mit der Prognose korrelierte (Overgaard, Eriksen et al. 2005, Petrik, Lavori et al. 2006, Polat, Said et al. 2010, Lim, Rischin et al. 2012). Auch in anderen Tumorentitäten konnte gezeigt werden, dass OPN vermehrt exprimiert wird, und die Prognose der betroffenen Patienten reduziert war (Polat, Said et al. 2009, Weber, Lett et al. 2010, Anborgh, Mutrie et al. 2011). Umgekehrt konnte gezeigt werden, dass ein Ausschalten von OPN in vitro die Aggressivität der Tumorzellen herabsetzte (Shevde, Samant et al. 2006, Anborgh, Mutrie et al. 2011). Dies macht OPN einerseits zu einem prognostisch wertvollen Tumormarker, andererseits auch zu einem potentiellen therapeutischen Target.

Es gibt eine Reihe von Splicevarianten von OPN, welche in verschiedenen Krebsarten exprimiert und mit OPN a bis c bezeichnet werden. Sie unterscheiden sich dadurch, dass einige der sieben Exons nicht translatiert werden. Während das OPN voller Länge (OPN-a) in Anwesenheit von physiologischen Konzentrationen von Calcium Zelladhäsion fördert und so der Disseminierung von Tumorzellen entgegenwirkt, fehlt gerade OPN c diese Eigenschaft, wodurch die Streuung maligner Zellen wiederum begünstigt wird (He, Mirza et al. 2006). Allerdings scheint die Bedeutung der unterschiedlichen Splicevarianten abhängig von der jeweiligen Tumorart zu sein. Das Verhältnis der Expression der verschiedenen Splicevarianten bei Brustkrebs zwischen Tumor- und Normalgewebe variiert (Anborgh, Mutrie et al. 2011).

Ebenfalls relevant ist die Bedeutung von OPN für die Apoptose. So verfügt OPN über antiapoptotische Eigenschaften, was unkontrollierter Proliferation und Metastasierung von malignen Zellen zuträglich ist. Gerade Makrophagen und T-Lymphozyten sowie toxischen Einflüssen ausgesetzte Fibroblasten und Endothelzellen scheinen hier besonders betroffen (Wang and Denhardt 2008).

OPN ist zudem ein viel diskutierter Faktor im Bereich der Wundheilung. Es ist als Zytokin chemotaktisch für Fibroblasten wirksam und bedeutend für deren Differenzierung (Lenga, Koh et al. 2008). Da in der vorliegenden Arbeit der perioperative Verlauf der OPN Plasmaspiegel untersucht wird, soll auch der

Einfluss der einsetzenden Wundheilung auf die OPN-Expression ausgewertet werden. Da zusätzlich bekannt ist, dass auch die Expression von TGF beta 1 eine Rolle in der Wundheilung spielt, soll es als weiterer Parameter in dieser Auswertung erfasst werden (Weber, Li et al. 2012).

In einer eigenen Vorläuferstudie wurde bei Patienten mit HNO-Tumoren OPN im Verlauf einer definitiven (n=42) bzw. adjuvanten (n=89) Strahlentherapie ermittelt. Hier bestätigte sich zum einen der prognostische Wert von OPN in beiden Therapiegruppen. Zum anderen zeigte sich, dass sich die OPN-Werte direkt vor Einleiten der Strahlentherapie in beiden Gruppen nicht signifikant voneinander unterschieden. Durch die erfolgte Tumorresektion wurden eigentlich deutlich niedrigere OPN-Spiegel im Blut in der adjuvanten Therapiegruppe erwartet (Polat, Said et al. 2009, Polat, Said et al. 2010). Hier soll die nun vorliegende Arbeit Aufklärung schaffen.

1.8 TGF beta 1

TGF beta ist ein 112 Aminosäuren umfassendes und ein Molekulargewicht von 25 kDa aufweisendes Polypeptid. Codiert ist das Protein auf Chromosom 19. Es existiert in fünf Isoformen, wovon drei im Menschen vorkommen. Ähnlich wie OPN ist es kein spezifischer Tumormarker, sondern wird in allen Zellen exprimiert (Kajdaniuk, Marek et al. 2013), jedoch vorwiegend von Thrombozyten, Makrophagen, Lymphozyten, Fibroblasten, Epithelzellen und Dendritischen Zellen (Krzemien and Knapczyk 2005, Kajdaniuk, Marek et al. 2013).

TGF beta 1 ist, in inaktiver Form, an Latency-Associated Protein (LAP) nichtkovalent gebunden und ist so in Thrombozyten oder an Zelloberflächen gespeichert. In der extrazellulären Matrix ist es an Latent TGF beta Binding Protein (LTBP) per Disulfidbrücke gebunden. Hier wird es durch eine Konformationsänderung von LTBP in aktiver Form freigesetzt. Die aktive Form ist jedoch nur schwer nachweisbar, da einerseits mögliche Epitope von LAP und LTBP verdeckt werden, und andererseits die Halbwertszeit, im Vergleich zu etwa

90 Minuten bei der inaktiven Form, nur einige Minuten währt (Blobe, Schiemann et al. 2000, Marek, Brodzicki et al. 2002, Kajdaniuk, Marek et al. 2013).

Physiologisch spielt TGF beta 1 eine Rolle bei der Regulation der Zellproliferation, Immunmodulation, Wundheilung, sowie der embryonalen Entwicklung von Blutzellen und Adipozyten, des Knorpelgewebes und der Blutgefäße. Es hemmt die Proliferation, indem es entweder inhibitorisch in die G1-Phase eingreift, oder apoptotisch wirksam wird. Gemeinsam mit Interferon und Tumornekrosefaktor alpha hemmt es proliferatorische Einflüsse von Wachstumsfaktoren (Blobe, Schiemann et al. 2000, Gacka and Adamiec 2002, Kajdaniuk, Marek et al. 2013).

Die Wirkung auf die Proliferation ist jedoch gewebeabhängig. So wirkt es sich auf die Proliferation von Zellen mesenchymaler Herkunft förderlich aus, während es bei Epithelzellen sein inhibitorisches Potential entfaltet. Auch unterschiedliche Konzentrationsgrade können eine gegensätzliche Wirkung haben. So wird das Wachstum von Zellen der glatten Muskulatur durch niedrige Konzentrationen gehemmt, während hohe Konzentrationen es fördert (Kajdaniuk, Marek et al. 2013).

Immunmodulatorisch wirkt sich TGF beta 1 auf T- und B-Lymphozyten aus. So haben B-Lymphozyten einen Rezeptor für TGF beta 1 an ihrer Oberfläche, bei dessen Aktivierung die Proliferation von B-Lymphozyten und deren Produktion an Immunglobulin G (IgG) und Immunglobulin M (IgM) inhibiert, die von Immunglobulin A (IgA) jedoch erhöht wird (Kehrl, Roberts et al. 1986, Kajdaniuk, Marek et al. 2013). Die Aktivität von Makrophagen und die Proliferation T-Lymphozyten wird durch TGF beta 1 reduziert, wenngleich man in entzündetem Gewebe vermehrt TGF beta 1 produzierende T-Lymphozyten findet (Kajdaniuk, Marek et al. 2013).

Durch seine weitreichenden immunmodulatorischen Effekte überrascht es nicht, dass TGF beta 1, beziehungsweise Mutationen im hierfür codierenden Gen, eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Autoimmunkrankheiten zugeschrieben wird. So konnte im Mausmodell gezeigt werden, dass die systemische Gabe von TGF beta 1 das Fortschreiten von Autoimmunkrankheiten verhindern, gegen

TGF beta 1 gerichtete Antikörper dies jedoch forcieren (Krzemien and Knapczyk 2005, Kajdaniuk, Marek et al. 2013).

Im Bereich der Wundheilung nimmt TGF beta 1 eine wichtige Stellung ein. So fördert es nicht nur die Synthese von Kollagen und OPN sowie anderen Bestandteilen der Extrazellulären Matrix, es schützt diese auch durch Inhibition der Synthese von Matrix Metalloproteasen (Wells 2000, Kuwahara, Kai et al. 2002, Kajdaniuk, Marek et al. 2013).

Ein wichtiger Prozess während der Wundheilung ist die Epitheliale zu Mesenchymale Transition (EMT). Hierbei durchlaufen die Epithelzellen einen Wandel zu Mesenchymzellen. Dies ist in zweierlei Hinsicht von Bedeutung. Zum einen kann sich die extrazelluläre Matrix durch aus Epithelzellen entstandenen Myofibroblasten regenerieren. Außerdem werden die die Zellen verbindenden Tight Junctions gelöst, was eine Migration ins Wundbett ermöglicht. Zusätzlich ist die Reepithelialisierung durch Keratinozyten von Bedeutung. Eine zentrale Rolle in diesem Vorgang spielt TGF beta 1. Über unterschiedliche Signalwege und Rezeptoren vermag es die Transkription von epithelialen Markern wie E-Cadherin zu unterdrücken und gleichzeitig die von mesenchymalen Markern wie Vimentin und N-Cadherin zu fördern. Darüber hinaus scheint es einen positiven Feedback-Mechanismus auf die Expression von TGF beta1 messenger RNA (mRNA) zu geben, wodurch es sich in seiner eigenen Wirkung potenzieren kann. Zusätzlich ist es chemotaktisch auf Fibroblasten wirksam (Weber, Li et al. 2012). Sind die Wundheilungsprozesse beendet, so muss die Wirkung von TGF beta 1 unterbrochen werden. Geschieht dies nicht, beispielsweise bei chronischen Entzündungen, so hält die Wirkung von TGF beta 1 an und führt zu Fibrosierung (Marek, Brodzicki et al. 2002, Kajdaniuk, Marek et al. 2013). Darüber hinaus fördert EMT die Tumorprogression durch Destabilisierung von Tight Junctions und somit Förderung von Invasivität (Hiroaki Ikushima June, 2010).

Unter Normalbedingungen sowie in der Frühphase von Malignität übt TGF beta 1 eine antimotische Wirkung auf Zellen aus. Im weiteren Verlauf maligner Entartung verlieren die Zellen ihre Sensibilität für die inhibitorische Wirkung von TGF beta 1 durch Mutation im TGF beta Rezeptor 2 (TGFB2), oder die

intrazellulären Smad 2-4 Proteine, die wiederum in einen die TGF beta 1 Expression hemmenden Signalweg eingebunden sind. Durch diese Mutationen werden höhere TGF beta 1 Konzentrationen benötigt, um antimitotische Wirksamkeit zu erzielen.

TGF beta 1 wurde auf seine Eignung als prognostischer Marker bei verschiedenen Tumoren untersucht. Beispielsweise bei Papillären Schilddrüsenkarzinomen korreliert TGF beta 1 mit dem Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen und Tumorstadium. Beim Prostatakarzinom wurde eine negative Korrelation zwischen der Konzentration von TGF beta 1 und der Prognose gefunden (Wikstrom, Damber et al. 2001, Kajdaniuk, Marek et al. 2013, Zhang, Wang et al. 2014). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass der Wechsel von TGF beta 1 vom Tumorsuppressor zum Tumorprogressor in Abhängigkeit zur Mutation von p53 erfolgt. TGF beta 1 unterdrückt Tumorprogression in Kooperation mit dem Wildtyp von p53. Nach dessen Mutation fördert es Aggressivität und Invasivität von Tumorzellen (Hiroaki Ikushima June, 2010).

Ebenfalls onkologisch bedeutsam ist eine weitere Eigenschaft von TGF beta 1 im Zusammenspiel mit OPN. In vitro konnten Weber et al. zeigen, dass OPN bei mesenchymalen Stammzellen (MSC) an den $\alpha\beta 3$ Rezeptor und den CD44 Rezeptor bindet. Hierdurch wird unter Anwesenheit des Transkriptionsfaktors Myeloid Zinc Finger 1 (MZF1) vermehrt TGF beta 1 exprimiert wodurch weitere Signalwege in Gang gesetzt werden, die die Umwandlung von mesenchymalen Stammzellen zu cancer-associated fibroblasts (CAF) fördern. Die Invasivität und Aggressivität von Brustkrebszellen nimmt somit weiter zu. Ein vielversprechender therapeutischer Ansatz scheint hier die Blockade des $\alpha\beta 3$ Rezeptors zu sein (Weber, Kothari et al. 2014).

2. Fragestellung

Es ist bekannt, dass der OPN Plasmaspiegel von Patienten mit HNO-Tumoren mit der Prognose nach Radiotherapie negativ korreliert (Overgaard, Eriksen et al. 2005, Petrik, Lavori et al. 2006, Lim, Rischin et al. 2012). Der zeitliche Verlauf der OPN Plasmaspiegel unter der Strahlentherapie wurde in der Vorgängerstudie „Osteopontin Plasma Levels in Head and Neck Cancer Patients During Radiotherapy“ von Polat, Said et al. (2010) erstmals untersucht, um beispielsweise die Wertigkeit von OPN als prädiktiven Marker für das Therapieansprechen zu beurteilen. In dieser Studie hatte sich gezeigt, dass die OPN Werte drei bis vier Wochen postoperativ ähnlich hoch waren wie in der definitiven Strahlentherapiegruppe, deren Patienten noch unbehandelt vor ihrer initialen Bestrahlung standen (Polat, Said et al. 2010). Wie in Kapitel 1.8 beschrieben, fördert OPN über den $\alpha\beta3$ Rezeptor und den CD44 Rezeptor die Expression von TGF beta 1, was ein Wundheilmittel ist (Weber, Li et al. 2012, Weber, Kothari et al. 2014).

In dieser Arbeit soll der postoperative Verlauf der Plasmaspiegel von OPN und von TGF beta 1 bestimmt werden, um zu untersuchen, ob der oben beschriebene Einfluss von OPN über TGF beta 1 auf die Wundheilung mitverantwortlich für die bis zu vier Wochen erhöhten Plasmaspiegel von OPN ist.

3. Material und Methoden

3.1 Patientenkollektiv

Kriterium für die Rekrutierung von Patienten für die vorliegende Studie war, neben der mündlichen und schriftlichen Zustimmung der Patienten, die Indikation einer kurativen Operation des Tumors (primäre OP Gruppe, prim OP). Weitere Einschlusskriterien waren: Alter > 18 Jahre, histologisch nachgewiesenes Plattenepithelkarzinom im Pharynx, Larynx oder der Mundhöhle. Für die Bestimmung von OPN wurden Blutproben von 41 Patienten im Zeitraum von 08/2011 bis 09/2013 entnommen. Die genauen Patientencharakteristika wie Alter, Geschlecht, Tumorstadium nach UICC (7. Auflage), Lokalisationen und Gesamtdosis einer ggf. nachfolgenden Strahlentherapie sind in Tabelle 1 dargestellt. TGF beta 1 wurde im Blut von 26 Patienten dieser Gruppe bestimmt. Die Studie wurde von der lokalen Ethikkommission des Universitätsklinikums Würzburg positiv begutachtet (AZ 221/11).

Um der Frage nachzugehen, inwiefern OPN und TGF beta 1 einen Einfluss auf die Überlebenszeit hat, empfiehlt sich ein Patientenkollektiv, bei dem die Blutprobenentnahme einige Jahre länger zurückliegt als 2012. Also dem Zeitpunkt der ersten Blutentnahme des oben beschriebenen Patientenkollektivs. Für diesen speziellen Aspekt der Arbeit wurde auf Blutproben von Patienten (primäre Radiotherapie-Gruppe, prim RTX) zurückgegriffen, die in der Vorgängerstudie von 07/2007 bis 06/2009 vor primärer Radiatio entnommen und seitdem bei -80°C gelagert wurden und bei denen der weitere Krankheitsverlauf bekannt war (Polat, Said et al. 2010). Untersucht wurden die archivierten Blutproben von 42 Patienten. Tabelle 1 listet Alter, Geschlecht, Tumorstadium nach UICC, Lokalisationen und Gesamtdosis der Strahlentherapie auf.

Sowohl OPN, als auch TGF beta 1 wurden in einer Kontrollgruppe gesunder Probanden (n=16) per ELISA bestimmt. Die Proben wurden einzeln und gepoolt im dreifachen Ansatz ausgewertet. TGF beta 1 wurde sowohl in einem Probenpool als auch für jeden Probanden einzeln bestimmt.

Patientencharakteristika				
Gruppe	Peri-operativ (prim OP)	Primäre Radio- therapie (prim RTX)	Kontroll- Gruppe	p-Wert (statistischer Test)
Anzahl	41	42	16	
Zeitraum	08/11 – 09/13	07/07 – 06/09	09/07	
<u>Geschlecht</u>				p=0,548 (Fisher's exact test)
Männlich	33	37	8	
weiblich	7	5	8	
<u>Alter (Mittelwert)</u>	62,36	61,0	41,6*	Patienten- gruppen: p=0,57 (t-test)
Männlich	61,8	60,0	38,2	
Weiblich	65,1	68,7	45,0	
<u>T-Stadium</u>				p<0,001 (Fisher's exact test)
I	9	0		
II	15	1		
III	12	6		
IV	4	34		
<u>N-Stadium</u>				p<0,001 (Fisher's exact test)
0	14	7		
1	6	0		
2	20	29		
3	0	4		
<u>M-Stadium</u>				p=0,36 (Fisher's exact test)
0	39	38		
1	1	4		
<u>Tumorstadium (UICC)</u>				p<0,001 (Fisher's exact Test)
I/II	4	1		

III	14	1		
IV	22	40		
<u>Lokalisation</u>				p=0,77 (Fisher's exact test)
Oropharynx	17	18		
Larynx	10	11		
Hypopharynx	7	7		
Mundhöhle	5	3		
Cup	1	3		
<u>Gesamtdosis</u>	Adjuvante RT (n=34)			p=0,7 (t-test)
<u>[Gy]</u>				
Median	66 Gy	69,9		
<u>Chemotherapie</u>				p<0,001 (Fisher's exact test)
Nein	19	4		
Ja	21	38		

Tabelle 1: Auflistung und Charakterisierung operativ therapierter und primär bestrahlter Patienten, sowie Tests auf statistische Unterschiede der Häufigkeitsverteilung. * Kontrollgruppe signifikant jünger, p<0,001.

3.2 Probengewinnung

Pro Patient der Gruppe prim OP wurde nach vorausgehender Aufklärung durch den Studienarzt jeweils ein Tag vor (T0) und ein Tag nach (T1) der Operation, dann eine Woche (T2) und drei Wochen (T3) nach der Operation Blut (jeweils 7,5 ml in einer EDTA-Monovette) abgenommen. Die archivierten Plasmaproben der Gruppe prim RTX Vorgängerstudie wurden damals vor primärer Bestrahlung (T0), in der dritten Bestrahlungswoche (T1), zum Ende der Bestrahlung (T2) und vier Wochen nach Bestrahlung (T3) entnommen. Die Blutproben wurden durch Venenpunktion in einem EDTA-Plasmaröhrchen gewonnen. Im Anschluss wurden die Proben zentrifugiert, das Plasma abpipettiert und zur weiteren Verwendung bei -80°C eingefroren.

Abbildung 2 zeigt einen Überblick über die Zeitpunkte der Blutentnahmen der aktuellen und der Vorläuferstudie.

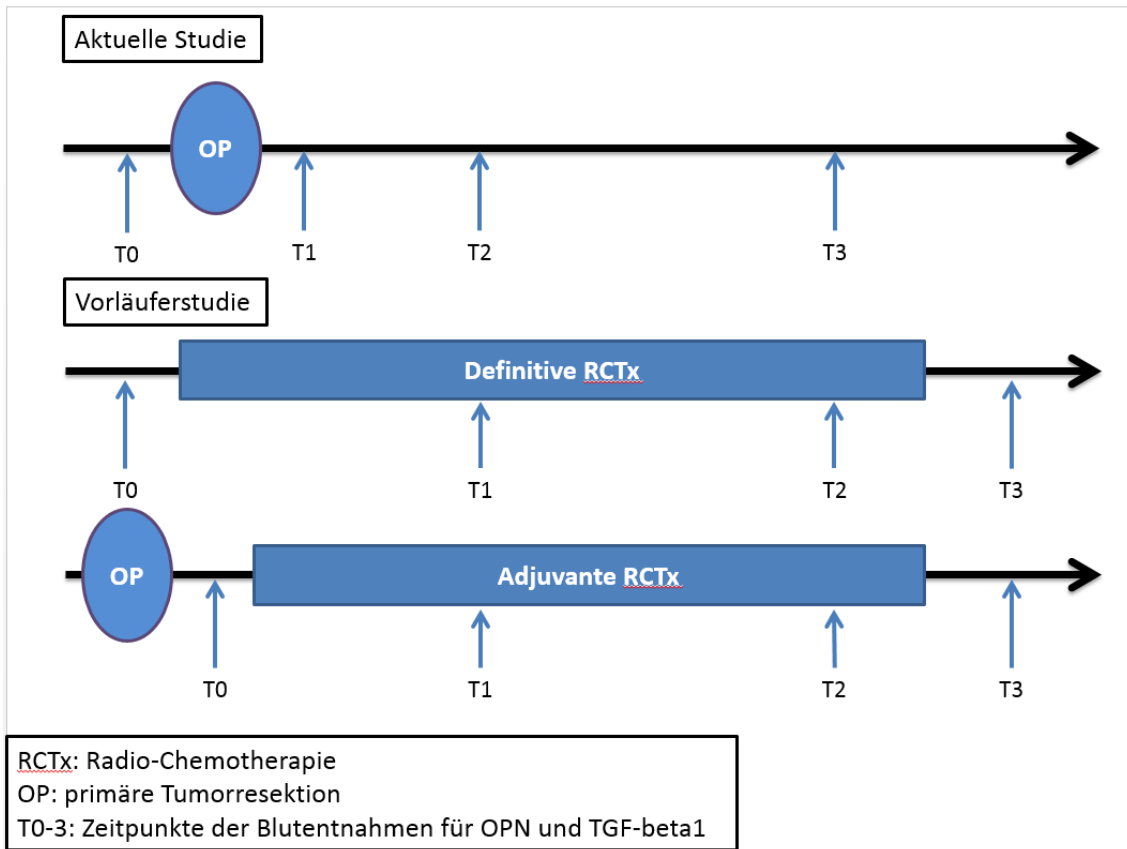


Abbildung 2: Zeitpunkte der Blutentnahme für OPN und TGF beta 1 T0 bis T3 bei der aktuellen und der vorangegangenen Studie.

3.3 ELISA für Osteopontin

Für die Messung von OPN wurde der ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) „Human Osteopontin Assay Kit“ des japanischen Herstellers IBL verwendet. Die Funktionsweise des nach der so genannten Sandwich-Technik arbeitenden Tests lautet wie folgt: Die zu bestimmenden Proben werden in vom Hersteller angegebenen Volumen, in diesem Fall 100µl, auf einer 96 Well Platte aufgetragen, deren Boden mit einem Antikörper beschichtet ist. Dieser IgG Antikörper, gewonnen aus dem Serum des Kaninchens, bindet am N-terminalen Ende von OPN. Nach einer einstündigen Inkubationszeit bei 37°C werden die Proben gewaschen, um ungebundenes Substrat zu entfernen und ein zweiter Antikörper wird zugegeben. Dieser ist mit dem so genannten Reporterenzym Peroxidase versehen. Der zweite Antikörper, ebenfalls IgG, aber gewonnen aus dem Serum von Mäusen, bindet an ein anderes Epitop und das OPN wird

zwischen beiden Antikörpern in einem Antigen-Antikörper-Komplex, ähnlich einem Sandwich, fixiert. Nach 30 Minuten Inkubationszeit bei 4°C wird erneut gewaschen, um überschüssige Antikörper zu entfernen. Hiernach wird eine chromogene Substanz hinzugefügt, die mit dem Reporterenzym eine messbare Farbreaktion eingeht. In diesem Fall kommt TMB (Tetra Methyl Benzidine) zum Einsatz. Nach erneuten 30 Minuten Inkubationszeit bei Raumtemperatur im Dunkeln wird die Reaktion durch die Zugabe von Schwefelsäure unterbrochen. Die Enzymaktivität kann nun photometrisch gemessen werden und ist proportional zur vorhandenen Konzentration von OPN.

Zur Messung der Enzymaktivität wird ein ELISA Reader mit Wellenlänge von 450nm verwendet. Die durch das Lesegerät bestimmten Werte für Enzymaktivität müssen selbstverständlich in eine Proteinkonzentration umgerechnet werden. Hierfür wird parallel zum Versuch eine Standardkurve erstellt. Dies bedeutet, dass die Enzymaktivität bei einer Reihe von Proben mit bekannter Konzentration von OPN gemessen wird, wodurch man eine Eichgerade erhält. Zu beachten ist noch, dass ebenfalls eine Probe ohne OPN ausgemessen wird, welche als „Test Sample Blank“ bezeichnet wird. Auch hierfür misst das Lesegerät eine, wenn auch sehr geringe, Enzymreaktion. Dieser Wert muss bei der Auswertung von allen anderen Werten subtrahiert werden, da er ein Maß für falsch positiv gemessene Enzymreaktion ist bzw. dem Hintergrundsignal entspricht. Außerdem ist die vom Hersteller angegebene Messspanne des ELISA von 5ng/ml bis 320 ng/ml zu beachten, in dem eine zuverlässige und lineare Messung garantiert wird. Nach einigen Vorversuchen wurde ein Verdünnungsgrad der Proben von 1:8 für optimal befunden.

3.4 ELISA für TGF beta 1

Für die Messung von TGF beta 1 wurde der ebenfalls nach Sandwich-Technik arbeitende ELISA „ELISA Pro Kit for Human Latent TGF beta 1“ des Herstellers MABTECH verwendet. Die Funktionsweise ist also identisch mit dem Test für OPN. Folglich soll hier hauptsächlich auf die vorhandenen Unterschiede

eingegangen werden. Vor Verwendung werden die Proben für 10 min mit 10000 x g zentrifugiert. Anschließend werden die Proben auf die mit einem Antikörper beschichtete 96 Well Platte aufgetragen und inkubieren 2 Stunden bei Zimmertemperatur. Hiernach werden die Proben gewaschen und der zweite Antikörper wird hinzugefügt. Leider macht der Hersteller keine genauen Angaben über die detektierten Epitope beider Antikörper. Im Unterschied zum ELISA für OPN ist der zweite Antikörper nicht direkt mit Peroxidase assoziiert, sondern mit Biotin versehen. Es ist also ein zusätzlicher Schritt von Nöten. Nach einer weiteren Stunde Inkubation bei Zimmertemperatur wird erneut gewaschen und ein Streptavidin-horseradish Peroxidase Konjugat (SA-HRP) zugefügt. Der Streptavidin-Anteil von SA-HRP und Biotin gehen eine starke chemische Bindung ein (DeChancie and Houk 2007). Hiernach wird erneut eine Stunde bei Zimmertemperatur inkubiert und danach gewaschen. Der restliche Ablauf ist identisch, als chromogene Substanz wird Tetra Methyl Benzidine verwendet und inkubiert 15 Minuten im Dunkeln. Danach wird die Reaktion mit Schwefelsäure unterbrochen und die Enzymaktivität mit demselben Standard ELISA Lesegerät ebenfalls bei 450 nm gemessen.

Einer der wesentlichen Unterschiede zum OPN ELISA ist, dass der Test nicht direkt TGF beta 1 detektiert, sondern das Latency Associated Protein (LAP), welches Teil des TGF beta 1 Homodimers ist. Dem muss bei der späteren Auswertung Rechnung getragen werden. Doch einfacherweise entspricht 1pM LAP genau 1pM TGF beta 1 mit einer Konzentration von 80pg/ml. Als Verdünnungsgrad wird 1:20 gewählt, was in voran gegangenen Versuchen ermittelt wurde. Die Erstellung einer Eichgeraden sowie die Subtraktion eines „Test Sample Blank“ folgen demselben Prinzip wie beim OPN ELISA.

3.5 Statistik

Die beiden Patientengruppen und die Kontrollgruppe wurden unter Verwendung der Software SPSS (IBM SPSS, Inc., Version 23) auf signifikante Unterschiede hin überprüft.

Unterschiede bei den jeweiligen Patientencharakteristika wurden zum Teil mit dem t-Test für unabhängige Stichproben und mit dem Fisher's exact Test ermittelt. Die Varianzanalyse (Analysis of Variance; ANOVA) kam zum Einsatz, um Unterschiede in der Konzentration von OPN und TGF beta 1 im zeitlichen Verlauf (T0 bis T3) zu vergleichen. Hier wurde ein entsprechendes Verfahren für Messwiederholungen eingesetzt (allgemeines lineares Modell, mod. F-Test). Mittels ANOVA wurde ein Zusammenhang klinischer Parameter mit OPN und TGF beta 1 untersucht. Zur Bestimmung einer möglichen Korrelation zwischen OPN und TGF beta 1 wurde der Korrelationskoeffizient (R) nach Pearsons Produkt-Moment-Korrelation ermittelt. Die Überlebenszeit-Analyse wurde nach der Kaplan-Meier Methode durchgeführt. Sie wurde nur für die Gruppe primär bestrahlter Patienten durchgeführt, da hier ein ausreichender Nachbeobachtungszeitraum vorlag. Unterschiede im Überleben (Gesamtüberleben, rezidivfreies Überleben), getrennt nach OPN und TGF beta 1 wurden mittels Log-rank-Test ermittelt. Eine Zusammenfassung der verwendeten statistischen Tests ist Tabelle 2 zu entnehmen.

Fisher's exact Test

- Unterschiede in der Verteilung der Patientencharakteristika:
 - Geschlecht
 - TNM-Stadium
 - UICC-Stadium
 - Verabreichte Chemotherapie
 - Tumorlokalisation

t-Test

- Unterschiede der Patientencharakteristika:
 - Alter
 - Applizierte Strahlendosis

ANOVA

- Konzentrationsunterschiede von OPN und TGF beta 1 verglichen zu T0
- Konzentrationsverteilung von OPN und TGF beta 1 nach klinischen Parametern (T-Stadium, N-Stadium, UICC-Stadium, Grading, Geschlecht)

Modifizierter F-Test

- Konzentrationsunterschiede von OPN und TGF beta 1 im zeitlichen Verlauf

Pearson-R

- Korrelation von OPN und TGF beta 1 bei primär operierter Gruppe
- Korrelation von OPN und TGF beta 1 bei primär bestrahlter Gruppe

Log-rank-Test

- Medianes Gesamtüberleben in Abhängigkeit von OPN und TGF beta 1 bei primär bestrahlter Gruppe
- Medianes rezidivfreies Überleben in Abhängigkeit von OPN und TGF beta 1 bei primär bestrahlter Gruppe

Tabelle 2: Überblick der verwendeten statistischen Testverfahren.

4. Ergebnis

4.1 Unterschiede zum Zeitpunkt T0

Abbildung 3 zeigt die gemessenen OPN Plasmaspiegel von prim OP, prim RTX und der Kontrollgruppe zum Zeitpunkt T0. Die in dieser Arbeit verwendeten Box Plots stellen mit den beiden Teilen der mittleren Säule die zweite und dritte Quartile der Messwerte dar. Die Linie dazwischen markiert den Median. Die untere Antenne stellt die erste Quartile und die obere Antenne die vierte Quartile der Messwerte dar.

Beide Patientengruppen (Mittelwerte: 630,8 ng/ml und 811,5 ng/ml) weisen im t-Test signifikant höhere Ausgangswerte der OPN Plasmaspiegel auf als die Kontrollgruppe (Mittelwert: 478,9 ng/ml). Der p-Wert (p) lag zwischen der primären RTX Gruppe und den Kontrollen bei $p=0,005$ und bei der primären OP Gruppe bei $p=0,028$. Ebenfalls im t-Test wird mit $p=0,025$ ein signifikanter Unterschied zwischen prim OP und der prim RTX Gruppe zum Zeitpunkt T0 angezeigt.

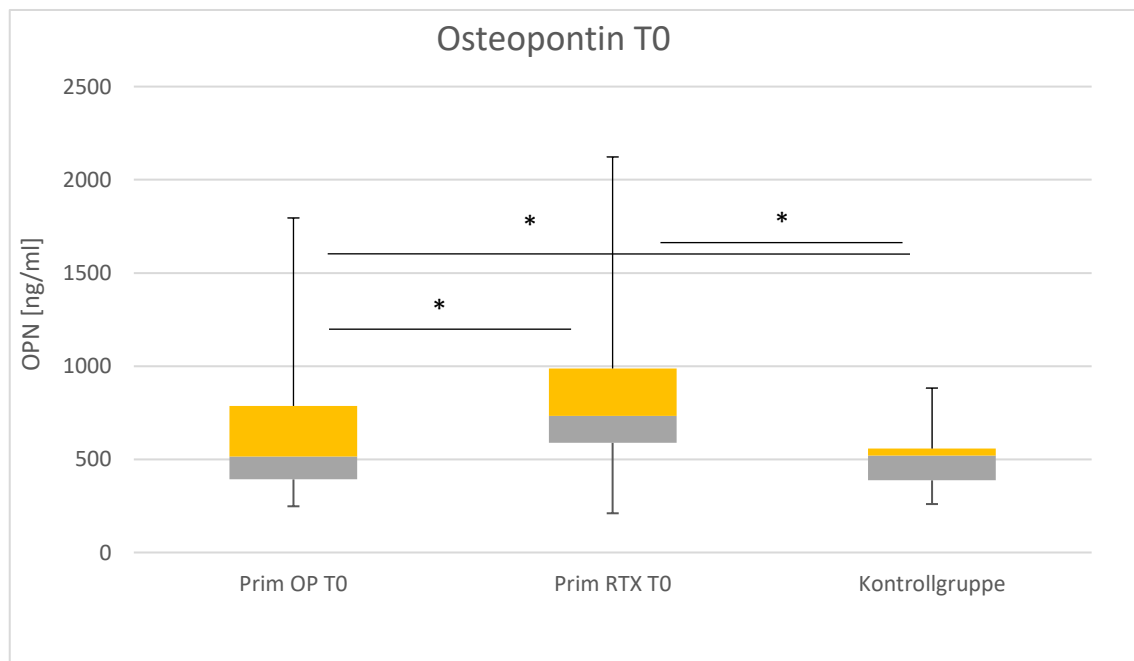


Abbildung 3: OPN Plasmaspiegel einen Tag vor der Operation/Bestrahlung (T0) von prim OP und prim RTX, sowie die Kontrollgruppe. * t-Test $p<0,05$.

Die folgende Abbildung 4 zeigt, dass die primär bestrahlten Patienten (Mittelwert: 25,5 ng/ml) zum Zeitpunkt T0 mit $p=0,002$ signifikant höhere Plasmaspiegel für TGF beta 1 aufweisen, als die Patienten der primär operierten Gruppe (Mittelwert: 15,2 ng/ml). Der Mittelwert der Kontrollgruppe liegt bei 18,2 ng/ml und unterscheidet sich bei der einfaktoriellen Varianzanalyse somit nicht von denen der beiden Patientengruppen.

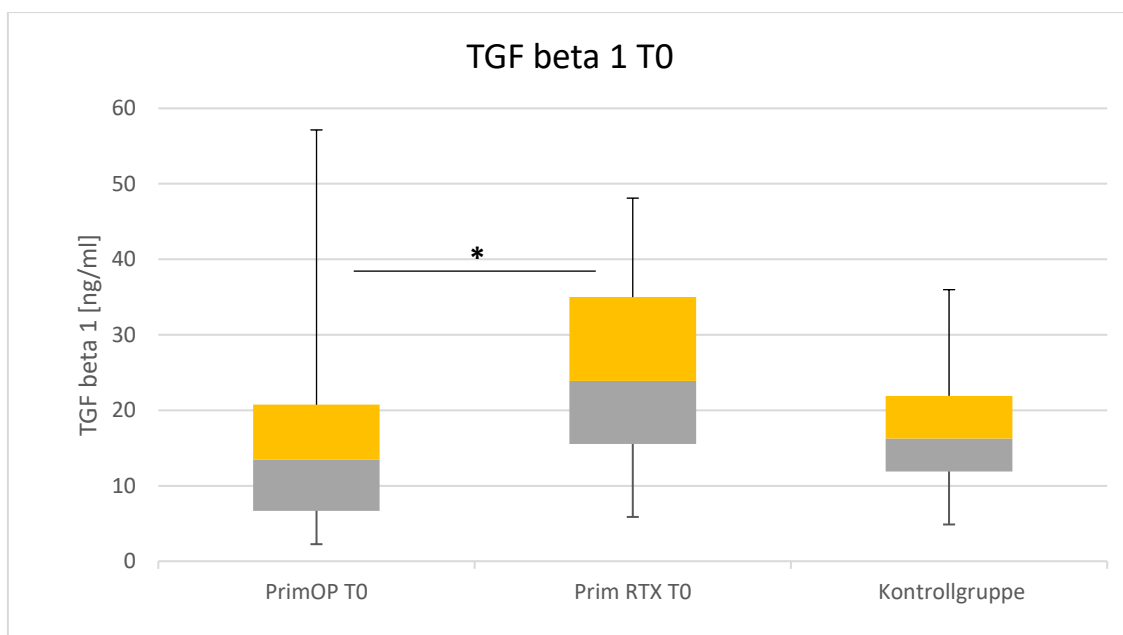


Abbildung 4: TGF beta 1 Plasmaspiegel einen Tag vor der Operation/Bestrahlung (T0) von prim OP und prim RTX, sowie die Kontrollgruppe. * $p<0,05$.

4.2 Perioperativer Verlauf von Osteopontin

Nachdem in der Vorgängerstudie (Polat, Said et al. 2010) überraschenderweise primär bestrahlte HNO-Tumorpatienten, verglichen mit postoperativen Patienten, keine signifikant höheren Ausgangswerte für OPN aufwiesen, was Abbildung 26 verdeutlicht, war die Ermittlung des perioperativen Verlaufs für OPN Ziel der vorliegenden Arbeit. Abbildung 5 stellt genau diesen in Form von Box Plots dar.

Diese stellen den OPN Plasmaspiegel der Gruppe prim OP zu den Zeitpunkten der Entnahme T0 = ein Tag vor der Operation, T1 = Ein Tag nach der Operation, T2 = Eine Woche nach der Operation und T3 = Drei Wochen nach der Operation dar.

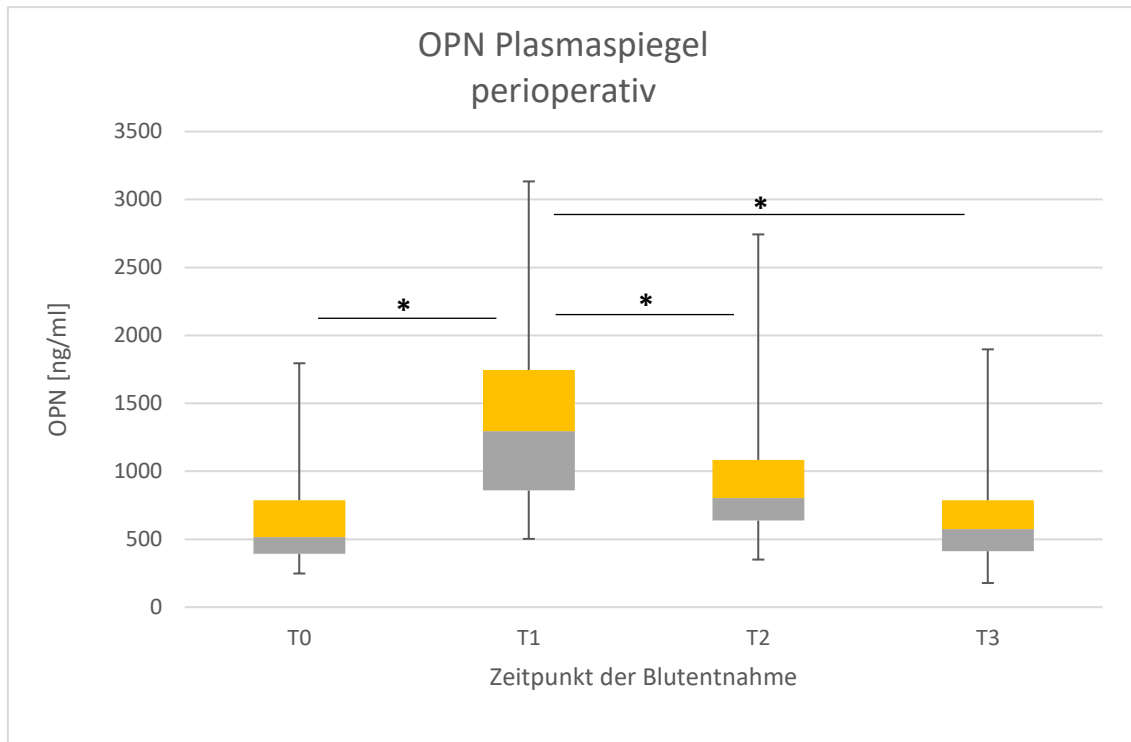


Abbildung 5: OPN Plasmaspiegel von prim OP einen Tag präoperativ (T0), einen Tag postoperativ (T1), eine Woche postoperativ (T2) und drei Wochen postoperativ (T3). * $p < 0,05$.

Ausgehend vom Zeitpunkt T0 steigt der OPN Plasmaspiegel (509 ng/ml) signifikant um mehr als das Doppelte innerhalb von 24 Stunden nach Operation zum Zeitpunkt T1 an (1267 ng/ml, $p < 0,01$). Zwischen T1 und T2 ist bereits ein deutlicher Rückgang zu verzeichnen. Zwischen T0 und T3 lässt sich keine signifikante Veränderung mehr feststellen. Der OPN Plasmaspiegel fällt also innerhalb von ca. 3 Wochen auf sein Ausgangsniveau zurück.

4.3 Osteopontin von primär bestrahlten Patienten (prim RTX)

Die folgende Abbildung 6 zeigt den OPN Plasmaspiegel von prim RTX. Unter der Strahlentherapie T0 bis T2 zeigt sich zunächst ein stabiler Verlauf. Ein Abfall zum Zeitpunkt T3 verglichen zu T0, T1 und T2 ist erkennbar, jedoch mit $p=0,065$ nicht signifikant.

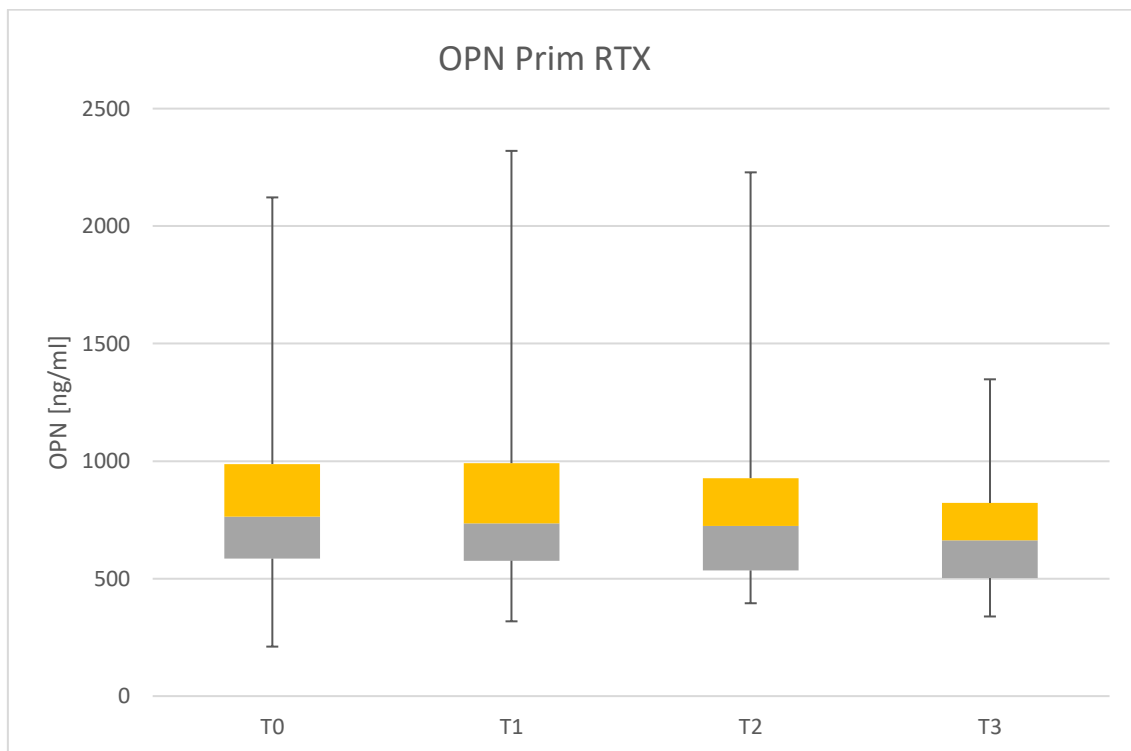


Abbildung 6: OPN Plasmaspiegel von prim RTX einen Tag vor Bestrahlungsbeginn (T0), in der dritten Bestrahlungswoche (T1), zum Ende der Bestrahlung (T2) und vier Wochen nach Bestrahlungsende (T3).

4.4 Perioperativer Verlauf von TGF beta 1

Wie in Kapitel 1.8 beschrieben wird angenommen, dass OPN die Expression von TGF beta 1 stimuliert, welches wiederum eine zentrale Rolle im Prozess der Wundheilung einnimmt. Der Vermutung nachgehend, die anhaltend hohen OPN-Werte drei Wochen nach Operation sind unter anderem durch Wundheilungsprozesse bedingt, wurde die Gruppe prim OP ebenfalls auf ihren Plasmaspiegel an TGF beta 1 einen Tag vor der Operation T0 sowie einen Tag

postoperativ T1, eine Woche postoperativ T2 und drei Wochen postoperativ T3 nach OP untersucht. Erwartet wurde, dass es im Verlauf zu einem Anstieg von TGF beta 1 kommen würde. Der anhaltend erhöhte OPN Plasmaspiegel könnte somit im Zusammenhang mit wundheilungsbedingten erhöhten TGF beta 1 Werten stehen.

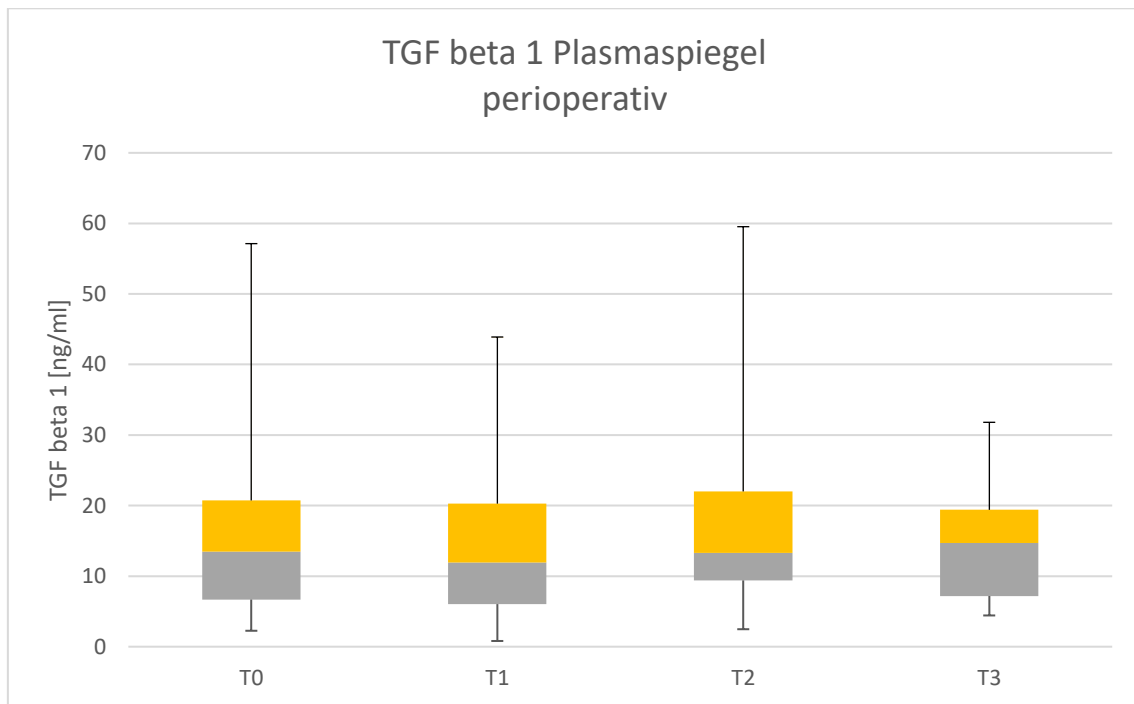


Abbildung 7: TGF beta 1 Plasmaspiegel von prim OP einen Tag präoperativ (T0), einen Tag postoperativ (T1), eine Woche postoperativ (T2) und drei Wochen postoperativ (T3).

Nach der Operation zu den Zeitpunkten T1 bis T3 zeigen die im Plasma gemessenen Werte für TGF beta 1 einen geringen Anstieg, der aber nicht signifikant ist. Die Median-Werte lagen zu den einzelnen Zeitpunkten T0 bis T3 bei 12,8 ng/ml, 11,5 ng/ml, 13,5 ng/ml und 14,8 ng/ml.

4.5 OPN von prim OP in Abhängigkeit zu klinischen Parametern

Das folgende Kapitel fast mögliche Korrelationen des OPN-Spiegels zu den Zeitpunkten T0, T1, T2 und T3 zu den gängigen klinischen Parametern, wie der TNM-Klassifikation, dem Tumorgrading, den UICC-Stadien und dem Geschlecht

zusammen. Teilt man die Gruppe der 41 operativ behandelten Patienten zum Beispiel nach dem T-Stadium auf, so bleiben nur kleine Vergleichsgruppen zurück. Im statistischen Vergleich zeigte der ANOVA Test keine signifikanten Unterschiede in der Verteilung der OPN-Plasmaspiegel bezüglich des T-Stadiums.

Die folgende Abbildung 8 zeigt die Gruppe prim OP zu den unterschiedlichen Zeitpunkten T0-T3 aufgeteilt nach T-Stadium. Es läge die Vermutung nahe, dass ein Tumor mit hohem T-Stadium mehr OPN produziert, nimmt doch die Tumormasse mit dem T-Stadium zu. Dies lässt sich jedoch nicht bestätigen. Auffallend ist die höhere Schwankung in den Box Plots für die Stadien T2 und T3 nach TNM Klassifikation. Diese lässt sich jedoch sehr einfach mit der größeren Anzahl an Patienten mit diesem Tumorstadium erklären, wie Tabelle 1 zeigt.

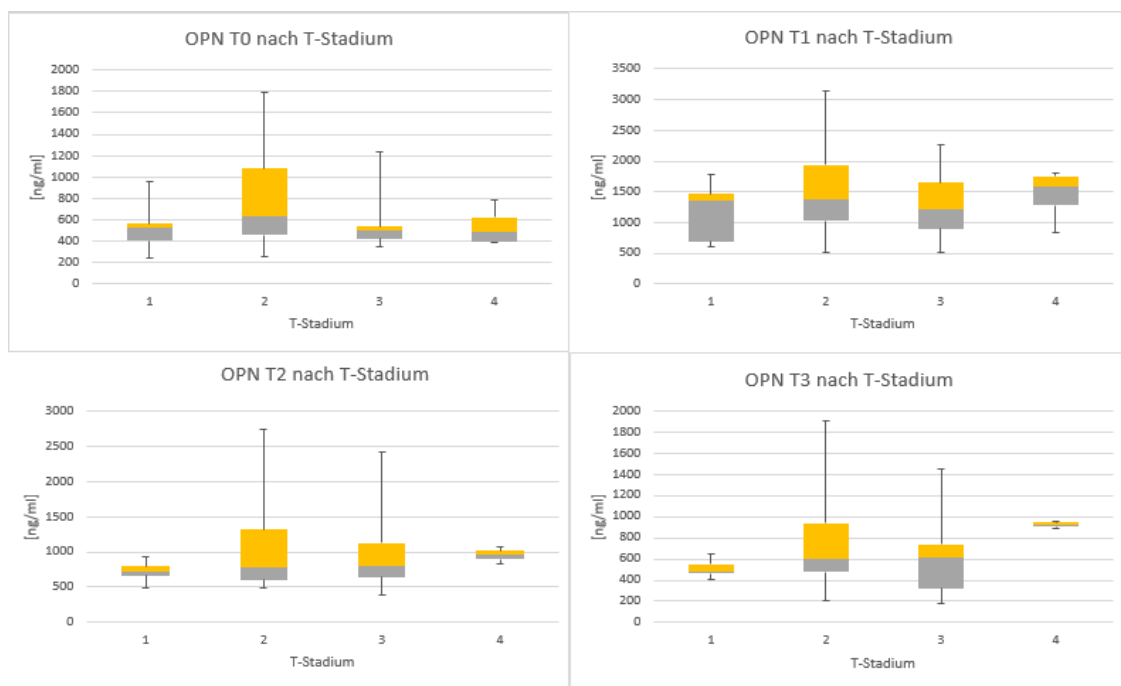


Abbildung 8: OPN Plasmaspiegel von prim OP nach T-Stadium einen Tag präoperativ (T0), einen Tag postoperativ (T1), eine Woche postoperativ (T2) und drei Wochen postoperativ.

Die folgende Abbildung 9 zeigt die Plasma OPN Werte von prim OP aufgetragen zu unterschiedlichen Zeitpunkten und N-Stadium nach TNM-Klassifikation. Ebenso wie bei der Untersuchung nach T-Stadien lässt sich hier kein statistisch signifikanter Trend erkennen.

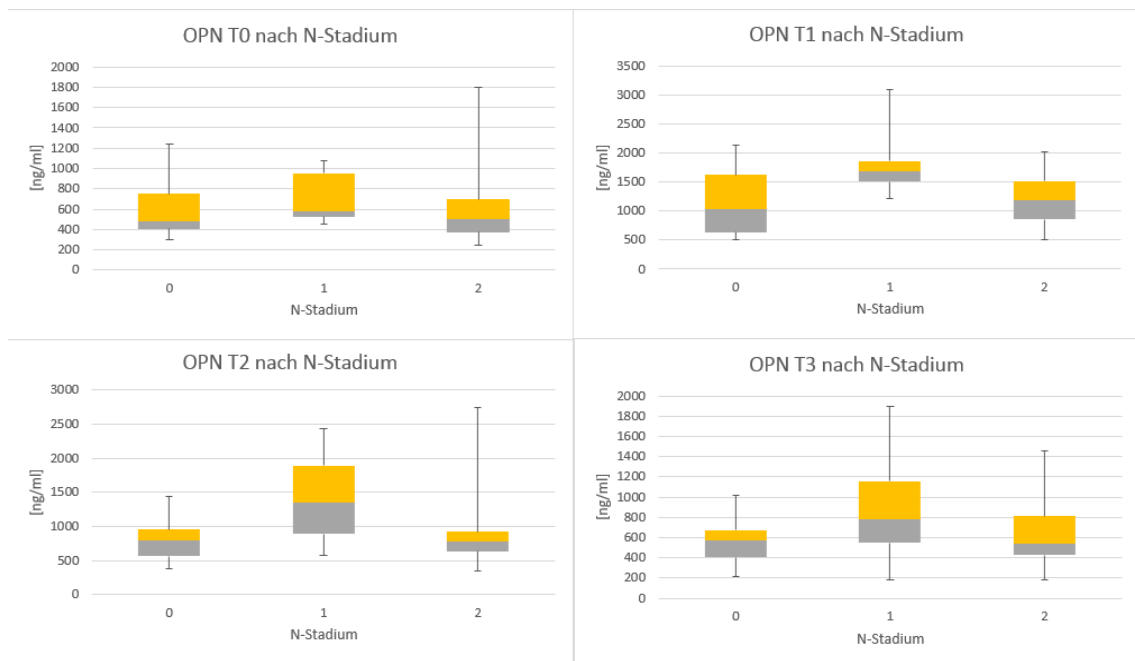


Abbildung 9: OPN Plasmaspiegel von prim OP nach N-Stadium einen Tag präoperativ (T0), einen Tag postoperativ (T1), eine Woche postoperativ (T2) und drei Wochen postoperativ (T3).

Die folgende Abbildung 10 zeigt die OPN-Plasmaspiegel von prim OP aufgeteilt nach UICC-Stadium. Es wurden hier Patienten mit den niedrigeren Stadien I und II sowie Patienten höherer Stadien III und IV zusammengefasst und miteinander verglichen. Auch hier lässt sich kein signifikanter Unterschied erkennen. Wie oben beschrieben, ist die höhere Schwankung in der Gruppe III und IV am ehesten der größeren Patientenzahl geschuldet.

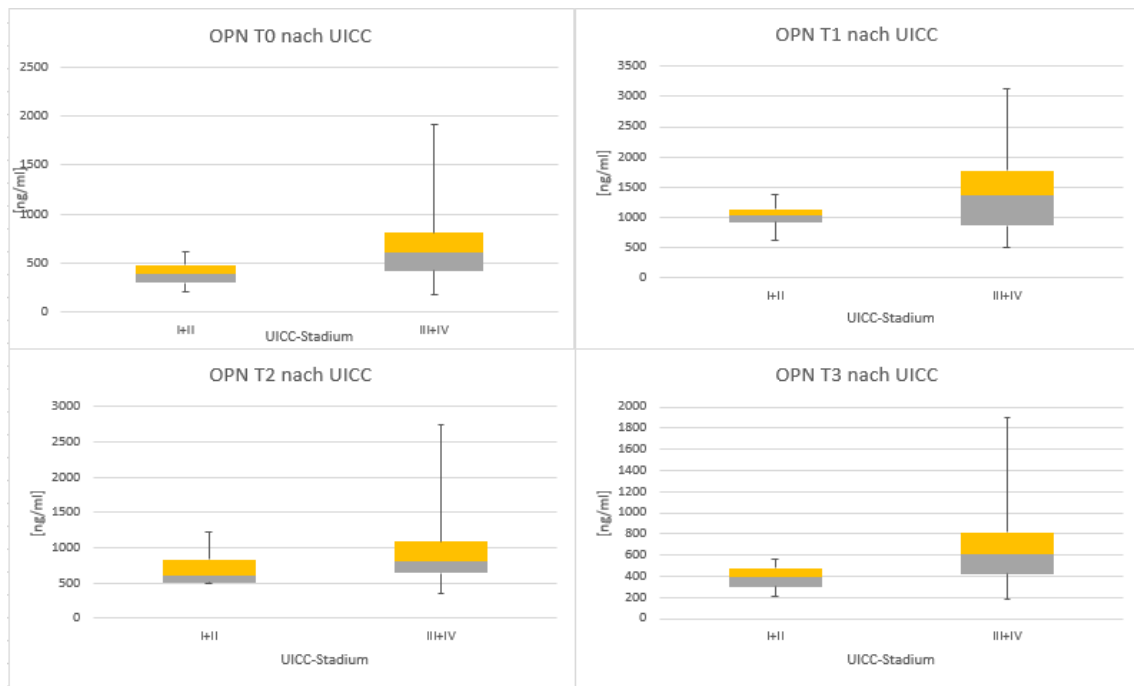


Abbildung 10: OPN Plasmaspiegel von prim OP nach UICC-Stadium einen Tag präoperativ (T0), einen Tag postoperativ (T1), eine Woche postoperativ (T2) und drei Wochen postoperativ (T3).

Die folgende Abbildung 11 zeigt die Plasmaspiegel von OPN von prim OP aufgeteilt nach Tumorgading. Auch hier lässt sich kein Unterschied erkennen.

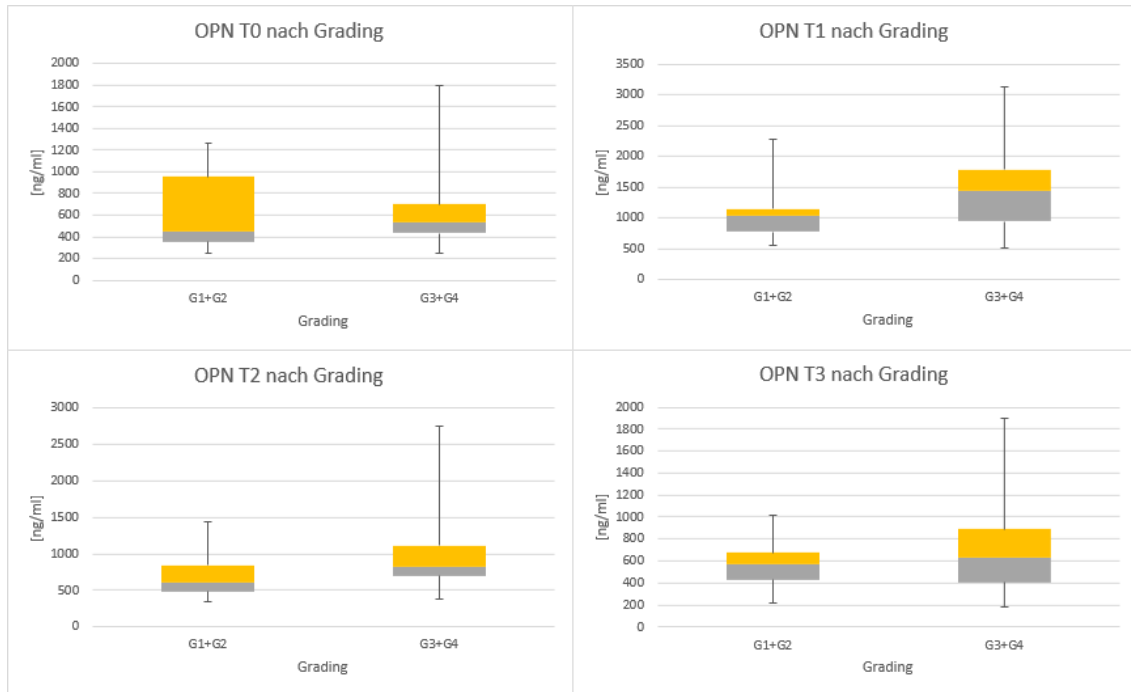


Abbildung 11: OPN Plasmaspiegel von prim OP nach Grading einen Tag präoperativ (T0), einen Tag postoperativ (T1), eine Woche postoperativ (T2) und drei Wochen postoperativ (T3).

Zuletzt wurden die Plasmaspiegel von OPN von prim OP noch nach Geschlecht aufgeteilt. Unterschiede in der OPN Verteilung liegen nicht vor, wie Abbildung 12 zeigt.

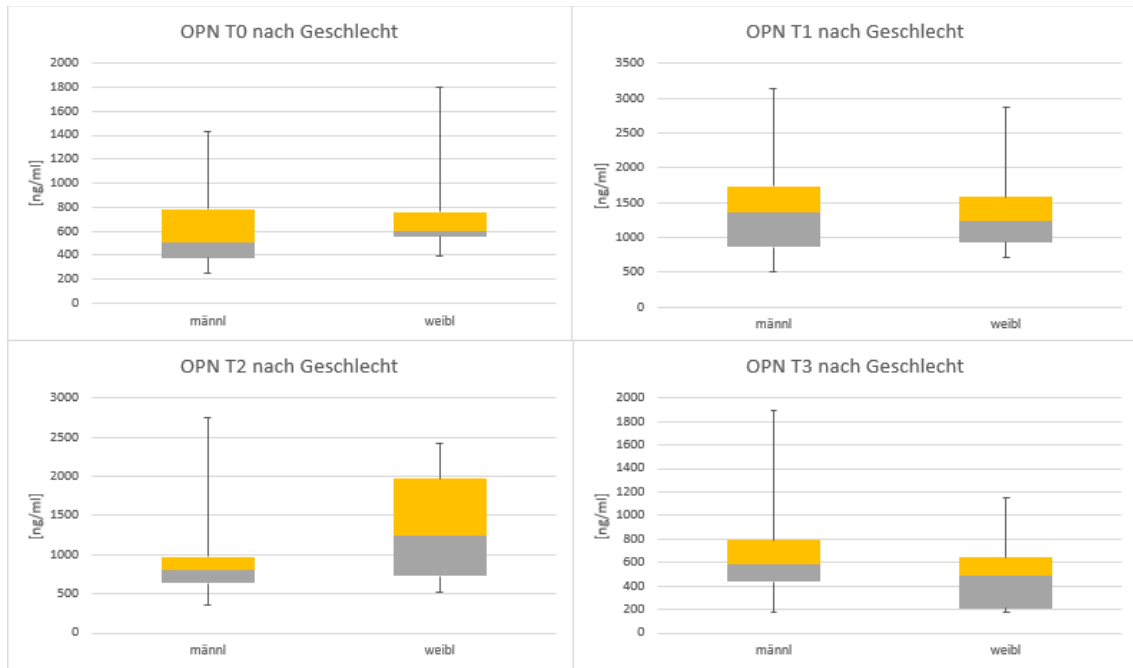


Abbildung 12: OPN Plasmaspiegel von prim OP nach Geschlecht einen Tag präoperativ (T0), einen Tag postoperativ (T1), eine Woche postoperativ (T2) und drei Wochen postoperativ (T3).

4.6 TGF beta 1 von prim OP in Abhängigkeit zu klinischen Parametern

So wie im vorangegangenen Kapitel 4.5 wurde auch für TGF beta 1 bei prim OP untersucht, ob sich ein Zusammenhang der Plasmaspiegel in Abhängigkeit von gängigen klinischen Parametern finden lässt. Auch hier wurde der ANOVA-Test eingesetzt. Auch hier muss berücksichtigt werden, dass es sich um nur kleine Fallzahlen handelt, was die statistische Aussagekraft einschränkt.

In der nachfolgenden Abbildung 13 wird der TGF beta 1 Spiegel im Plasma von prim OP zu den Zeitpunkten T0 bis T3 nach T-Stadium gemäß TNM-Klassifikation aufgetragen.

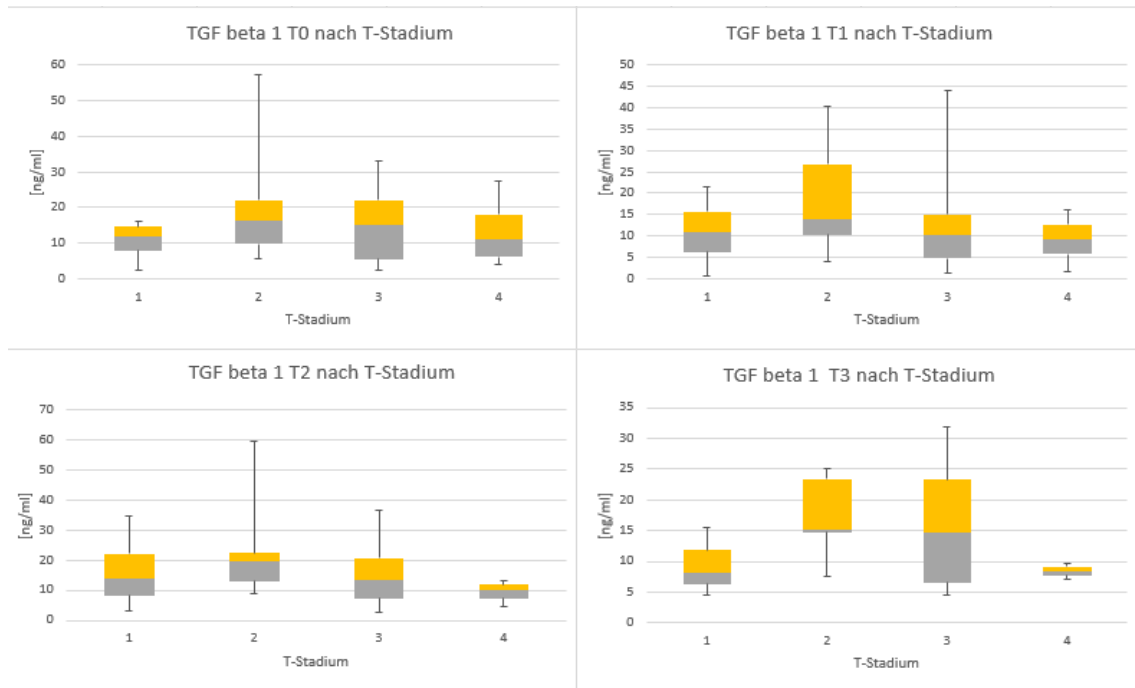


Abbildung 13: TGF beta 1 Plasmaspiegel von prim OP nach T-Stadium einen Tag präoperativ (T0), einen Tag postoperativ (T1), eine Woche postoperativ (T2) und drei Wochen postoperativ (T3).

Die folgende Abbildung 14 zeigt den TGF beta 1 Plasmaspiegel von prim OP zu den Zeitpunkten T0 bis T3 in Abhängigkeit zum N-Stadium. Es lässt sich kein statistisch signifikanter Unterschied in der Verteilung erkennen.

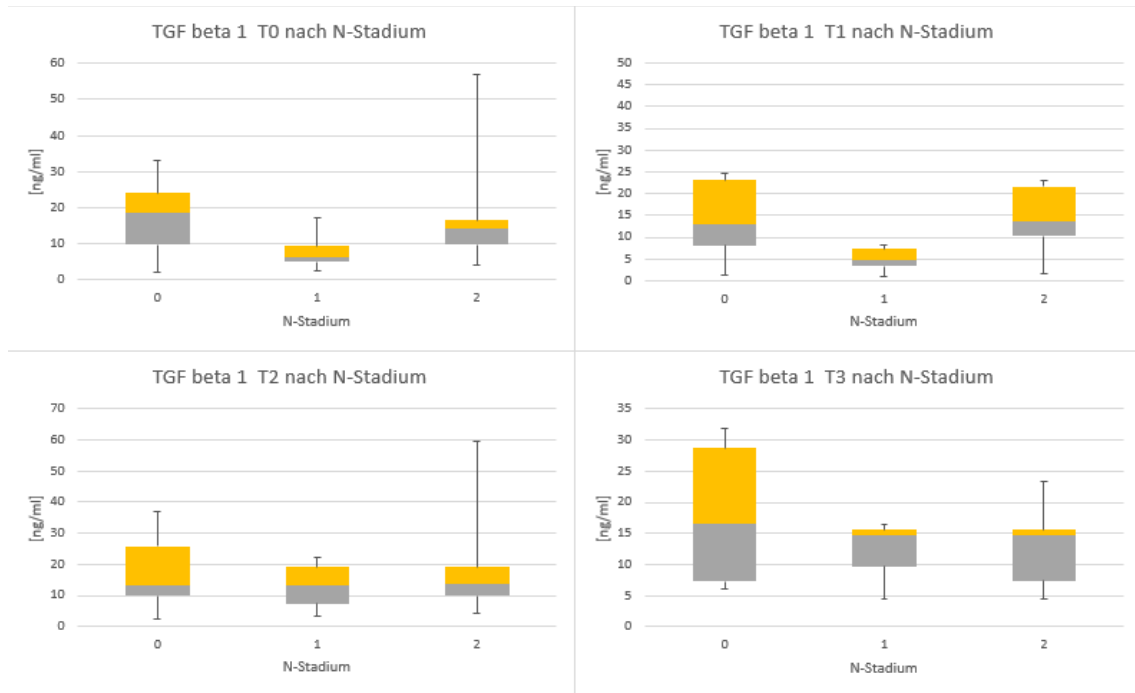


Abbildung 14: TGF beta 1 Plasmaspiegel von prim OP nach N-Stadium einen Tag präoperativ (T0), einen Tag postoperativ (T1), eine Woche postoperativ (T2) und drei Wochen postoperativ (T3).

In der folgenden Abbildung 15 wird TGF beta 1 von prim OP in Abhängigkeit zu den UICC-Stadien zu den Zeitpunkten T0 bis T3 aufgetragen. Dabei werden die Stadien I und II mit den Stadien III und IV verglichen. Auch hier lässt die geringe Zahl der Patienten in den geringeren Tumorstadien nur eine eingeschränkte Beurteilbarkeit zu. Eine signifikante spezifische Verteilung zeigt sich nicht.

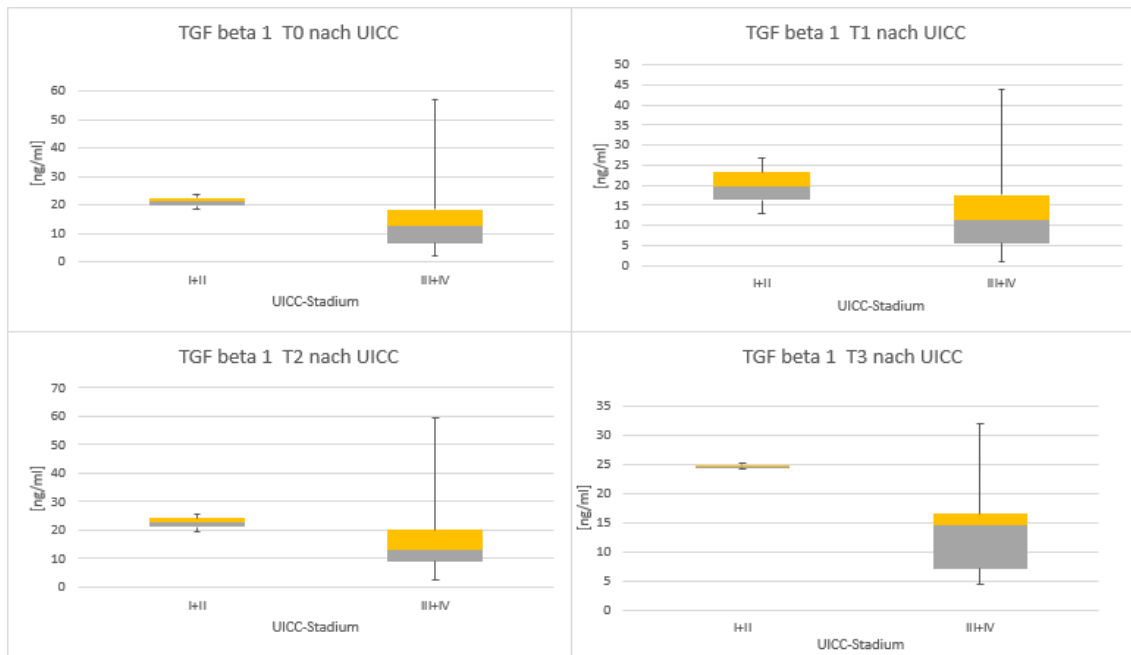


Abbildung 15: TGF beta 1 Plasmaspiegel von prim OP nach UICC-Stadium einen Tag präoperativ (T0), einen Tag postoperativ (T1), eine Woche postoperativ (T2) und drei Wochen postoperativ (T3).

Selbiges gilt für die folgende Abbildung 16. Sie zeigt den TGF beta 1 Plasmaspiegel von prim OP zu den Zeitpunkten T0 bis T3 in Abhängigkeit vom Tumorgrading.

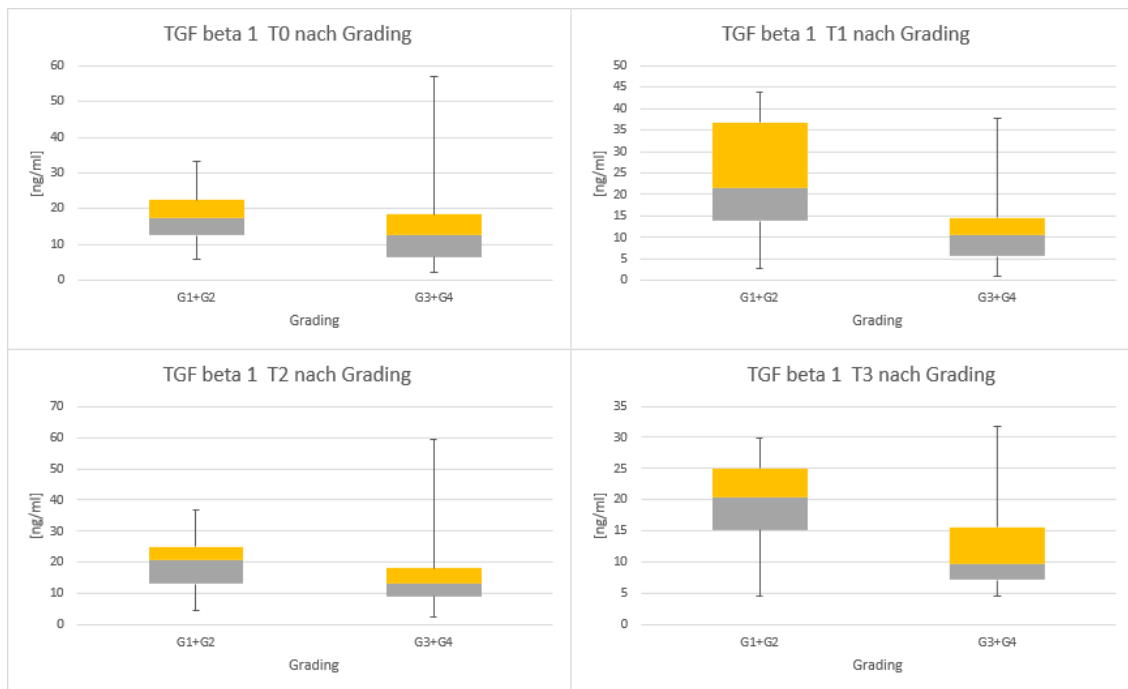


Abbildung 16: TGF beta 1 Plasmaspiegel von prim OP nach Grading einen Tag präoperativ (T0), einen Tag postoperativ (T1), eine Woche postoperativ (T2) und drei Wochen postoperativ (T3).

Wie auch bei OPN wurde auch TGF beta 1 von prim OP in Hinsicht auf geschlechterspezifische Unterschiede zu den Zeitpunkten T0 bis T3 untersucht. Eine besondere Verteilung lässt sich nicht feststellen, wie sich der unteren Abbildung 17 entnehmen lässt. Angemerkt sei hier jedoch, dass die Anzahl der weiblichen Patienten deutlich kleiner ist, wie Tabelle 1 zeigt.

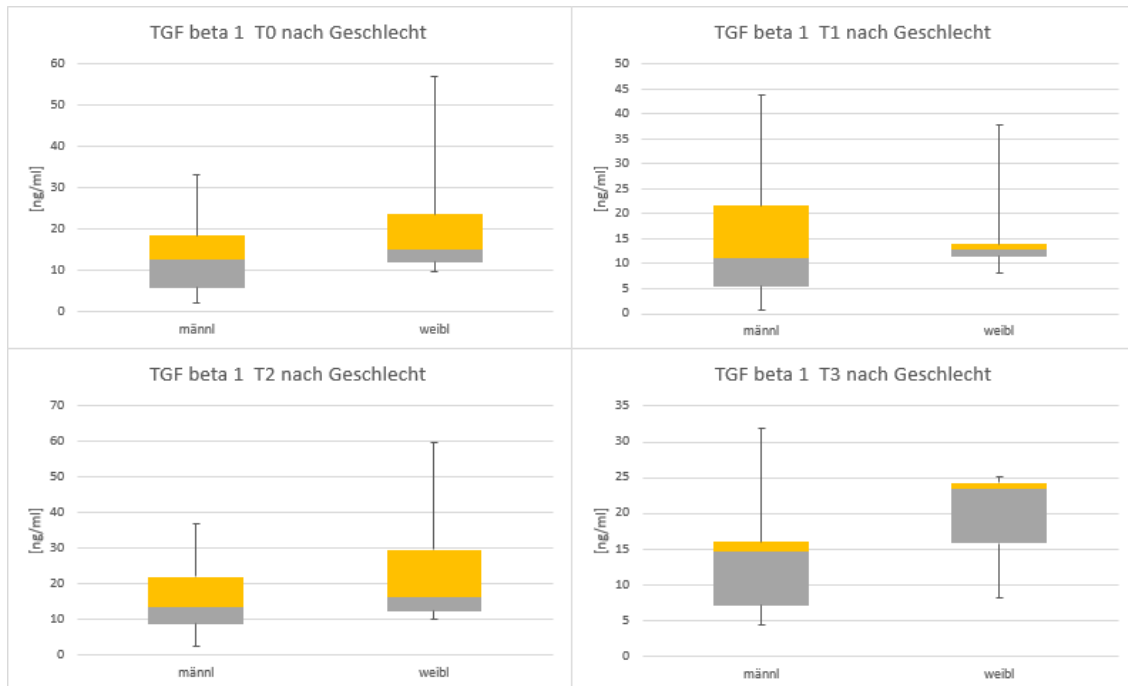


Abbildung 17: TGF beta 1 Plasmaspiegel von prim OP nach Geschlecht einen Tag präoperativ (T0), einen Tag postoperativ (T1), eine Woche postoperativ (T2) und drei Wochen postoperativ (T3).

4.7 Korrelation OPN und TGF beta 1 bei prim OP

Betrachtet man die Werte von beiden Markern OPN und TGF beta 1 zum Zeitpunkt T0 in der Gruppe prim OP, so lässt sich, auch wenn kein Anstieg in zeitlichem Verlauf zu OPN nachgewiesen werden kann, doch eine positive Korrelation feststellen. Diese ist in der folgenden Abbildung 18 dargestellt.

Patientenproben mit hohen Werten für OPN wiesen auch hohe Werte für TGF beta 1 auf. Der Korrelationskoeffizient nach Pearson lag bei $R=0,619$, der Zusammenhang war statistisch signifikant ($p=0,001$).

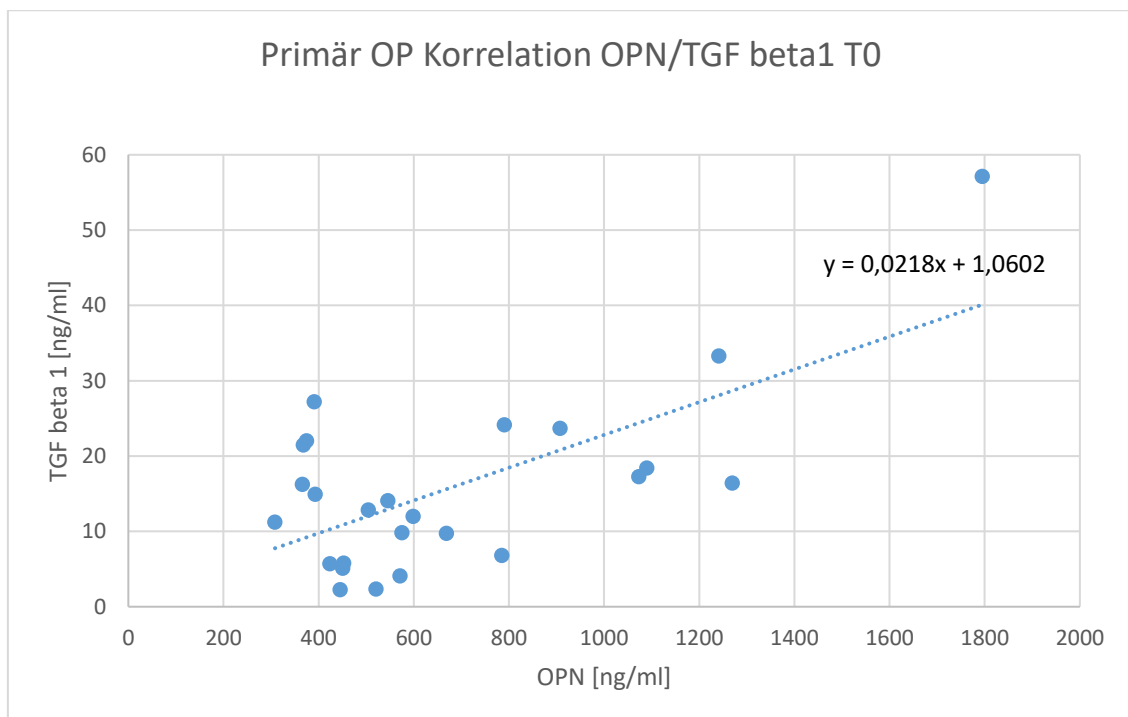


Abbildung 18: Korrelation zwischen Plasmaspiegeln von OPN und TGF beta 1 bei prim OP einen Tag präoperativ (T0). Pearson-R= 0,619; p=0,001.

Selbiges gilt für die Plasmaspiegel von OPN und TGF beta 1 bei prim OP zum Zeitpunkt T2, was sich der untenstehenden Abbildung 19 entnehmen lässt. Das Maß der Korrelation lässt sich bei statistischer Signifikanz mit $p=0,004$ mit einem Koeffizienten nach Pearson mit $R=0,546$ beziffern.

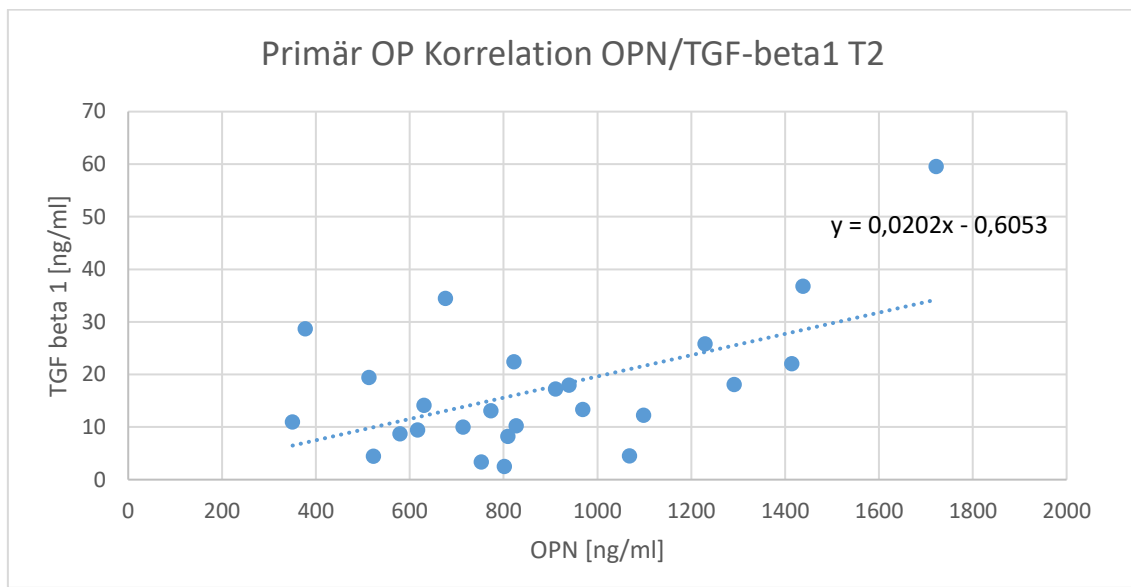


Abbildung 19: Korrelation zwischen Plasmaspiegeln von OPN und TGF beta 1 bei prim OP eine Woche postoperativ (T2). Pearson-R=0,546; $p=0,004$.

4.8 Korrelation OPN/TGF beta 1 bei prim RTX

Auch die Gruppe der primären Radiotherapie (prim RTX) wurde auf eine mögliche Korrelation zwischen Plasmaspiegeln von OPN und TGF beta 1 zum Zeitpunkt T0 untersucht. Die Ergebnisse sind der folgenden Abbildung 20 zu entnehmen. Sie zeigt, dass auch hier eine geringe aber noch statistisch signifikante Korrelation vorliegt. Der Korrelationskoeffizient nach Pearson beträgt $R=0,393$ bei $p=0,011$.

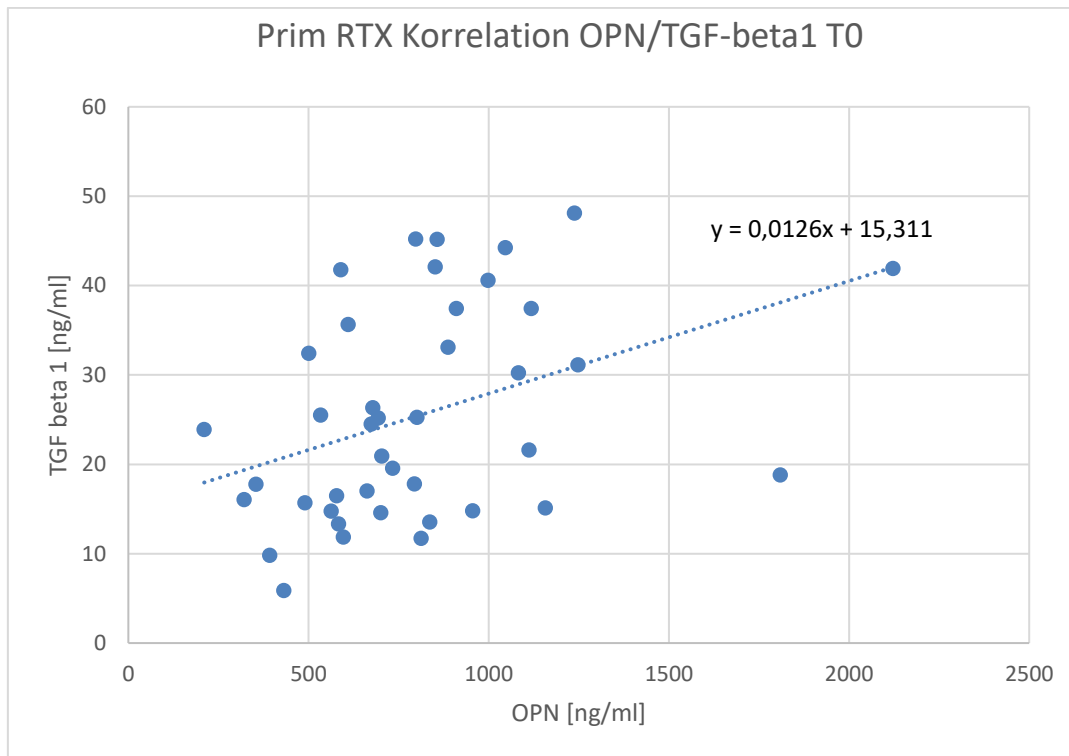


Abbildung 20: Korrelation zwischen Plasmaspiegeln von OPN und TGF beta 1 bei prim RTX einen Tag präoperativ (T0). Pearson-R=0,393; $p=0,11$; Nichtparametrische Rangkorrelation: 0,445; $p=0,004$.

4.9 OPN bzw. TGF beta 1 und Überleben

Wie in der Vorgängerstudie (Polat, Said et al. 2010) beschrieben, besteht für HNO-Tumoren eine negative Korrelation zwischen dem OPN Plasmaspiegel und der Überlebenszeit sowohl nach definitiver als auch nach adjuvanter Radiatio. In der nachfolgenden Kaplan-Meier-Kurve (Abbildung 21) wird dies verdeutlicht. Die operierten und adjuvant bestrahlten Patienten wurden, gemäß ihrem Spiegel an OPN im Plasma in Terzilen eingeteilt. Es zeigt sich ein Überlebensvorteil für Patienten, deren Spiegel im Bereich des ersten und zweiten Terzils liegt. Während nach 500 Tagen noch etwa 80% der Patienten des ersten und zweiten Terzils am Leben sind, liegt die Überlebensrate bei Patienten im dritten Terzil, also dem Drittel der Patienten mit dem höchsten gemessenen OPN Plasmaspiegel, bei nur noch 70%. Nach 1000 Tagen waren im Bereich der ersten beiden Terzilen noch etwas über 70% am Leben. Die dritte Terzile wies nur eine Überlebensrate von etwa 50% auf. Nach 1500 Tagen hatten im ersten und

zweiten Terzil etwa 65% der Patienten überlebt. Im dritten Terzil waren mit einer Überlebensrate von etwa 45% schon über die Hälfte der Patienten verstorben.

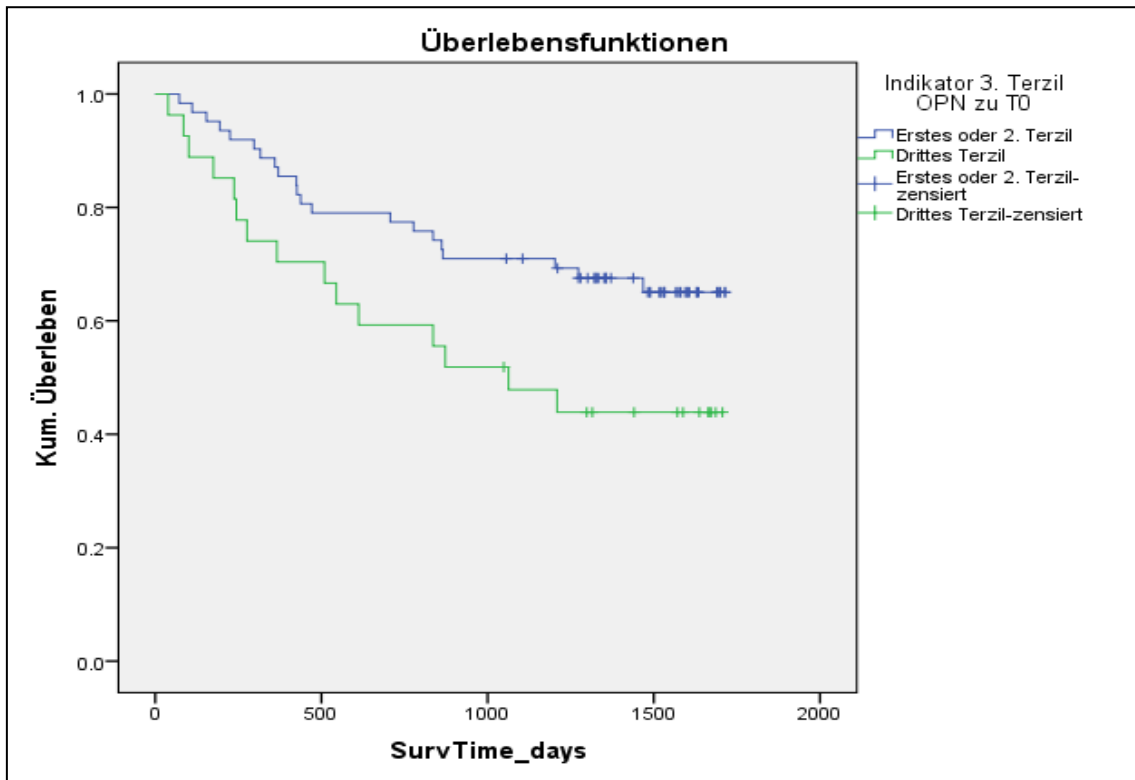


Abbildung 21: Kaplan-Meier Kurve bezüglich Gesamtüberleben nach adjuvanter Radiatio in Tagen in Abhängigkeit vom OPN Plasmaspiegel und getrennt nach Terzilen (Polat B, 2009).

Blickt man auf die Erkenntnis der Vorgängerstudie bezüglich hohen OPN-Plasmaspiegeln und der verringerten Überlebenswahrscheinlichkeit sowie die beschriebene positive Korrelation zwischen OPN und TGF beta 1, so drängt sich die Frage auf, ob es ebenso eine Korrelation zwischen TGF beta 1 und dem Überleben gibt. Da die ältesten für die vorliegende Arbeit gesammelten Proben von 08/2011 stammen und somit zum Zeitpunkt der Messung noch keine zwei Jahre alt waren, erschien es verfrüht, eine Aussage über das Überleben dieser Population treffen zu wollen. Also wurde auf Proben der Gruppe prim RTX aus der Vorgängerstudie von Patienten vor primärer Radiatio zum Zeitpunkt T0 bei HNO-Tumoren zurückgegriffen, welche aus 2007 und 2008 stammen, womit ein längerer Nachbeobachtungszeitraum gegeben war. Die folgende Abbildung 22

zeigt eine Kaplan-Meier-Kurve von prim RTX. Mit einem $p=0,027$ statistisch signifikant zeigt die Abbildung 22, dass ein OPN-Spiegel im Plasma über dem Median mit einer verkürzten Überlebenszeit assoziiert ist, was die Ergebnisse der Vorgängerstudie bestätigt. Das mediane Überleben betrug für Patienten mit OPN-Spiegel unter dem Median 19,6 vs. 11,5 Monate bei Patienten mit OPN-Spiegel über dem Median.

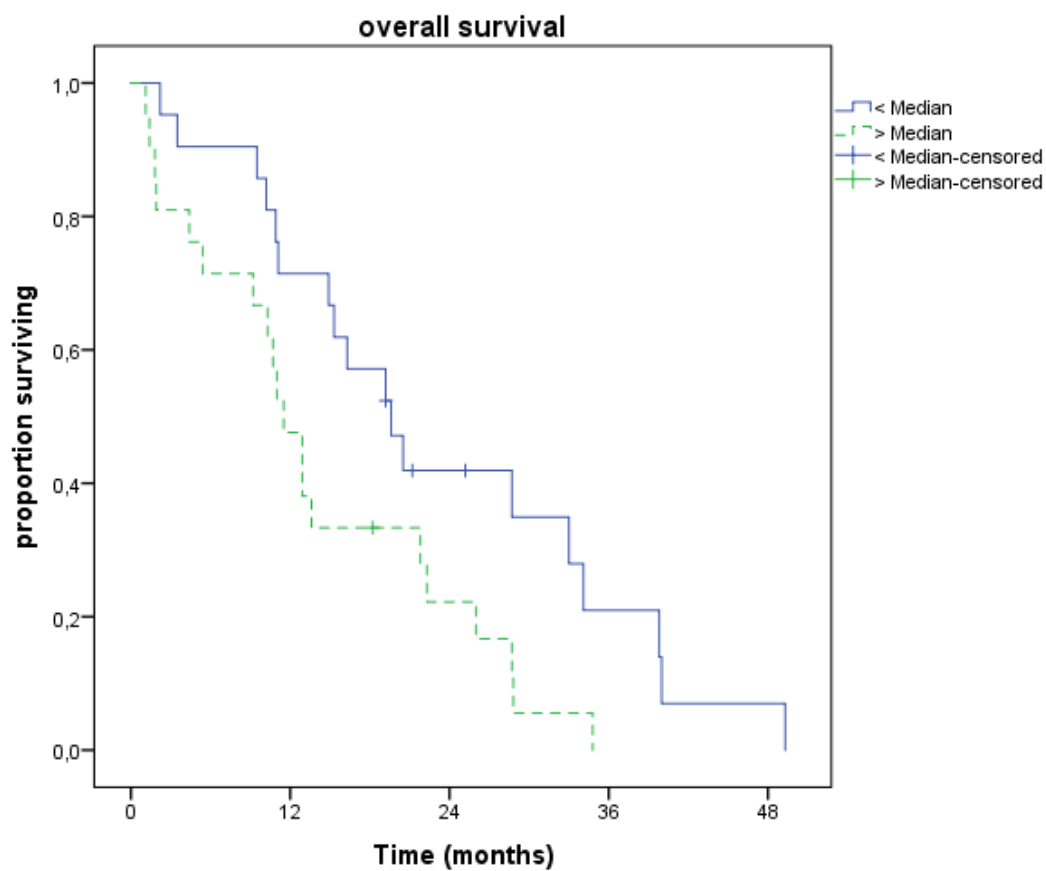


Abbildung 22: Überlebenszeit in Monaten von prim RTX bei OPN Plasmaspiegel zum Zeitpunkt T0.

Die nachfolgende Abbildung 23 stellt das rezidivfreie Überleben von prim RTX in Abhängigkeit vom Plasmaspiegel von OPN zum Zeitpunkt T0 dar. Es wird ersichtlich, dass Patienten, deren Plasmaspiegel von OPN unter dem Median liegt, länger rezidivfrei bleiben, als jene darüber. Mit einem $p=0,201$ ist der Unterschied jedoch nicht statistisch signifikant.

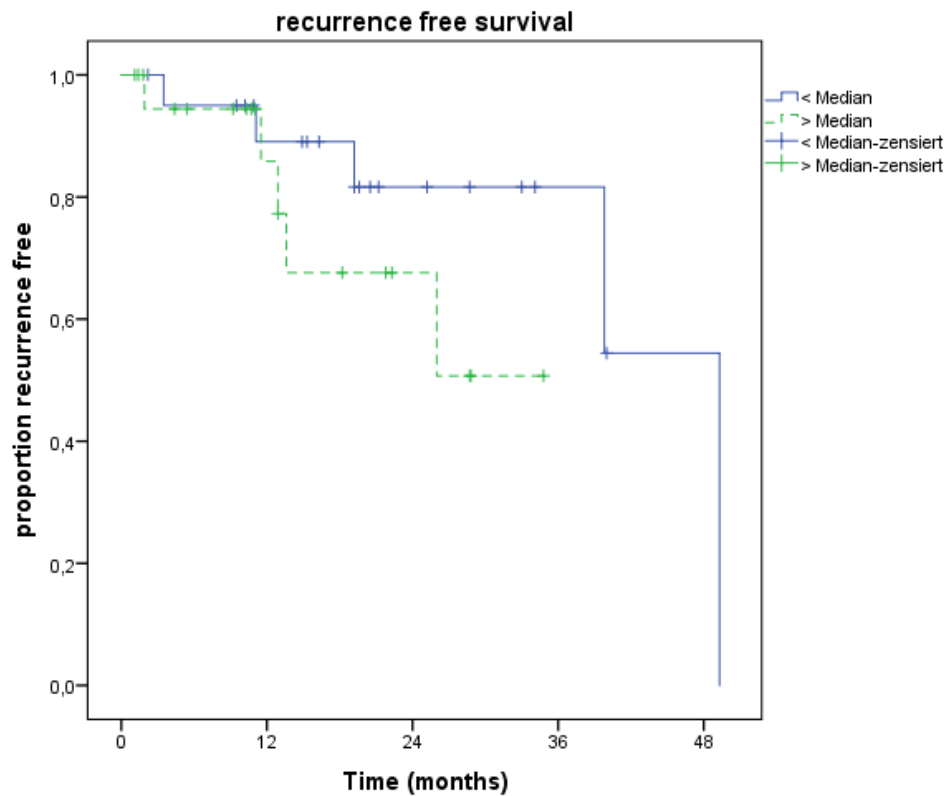


Abbildung 23: Rezidivfreies Überleben in Monaten von prim RTX in Abhängigkeit zu OPN zum Zeitpunkt T0.

Als nächstes stellt sich die Frage, ob TGF beta 1 ebenfalls mit der Überlebenszeit korreliert. Diesmal wurde prim RTX nach Terzilen im Plasmaspiegel von TGF beta 1 zum Zeitpunkt T0 eingeteilt. Auch hier haben die Patienten mit TGF beta 1 Werten im oberen Drittel eine deutlich schlechtere Überlebensdauer, als Patienten in den unteren beiden Terzilen. Abbildung 24 verdeutlicht dies. Der mediane Überlebensvorteil beträgt 20,5 gegenüber 10,7 Monaten. Dies ist mit $p=0,008$ statistisch signifikant.

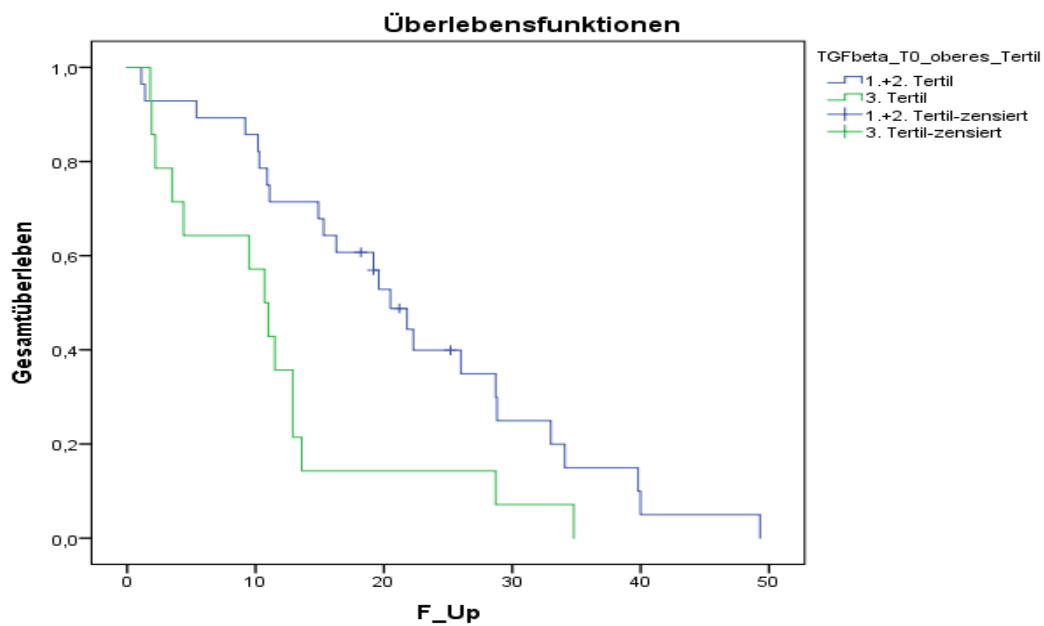


Abbildung 24: Überlebenszeit in Monaten von prim RTX bei TGF beta 1 Plasmaspiegel einen Tag vor Bestrahlung (T0); Schlechteres Überleben für Patienten im obersten Tertil, $p=0,008$.

Genau wie für OPN interessiert auch die Frage, ob TGF beta 1 mit dem rezidivfreien Überleben korreliert.

Abbildung 25 zeigt, dass die Patienten des obersten Terzils, ein deutlich schlechteres und mit $p=0,004$ statistisch signifikantes rezidivfreies Überleben haben.

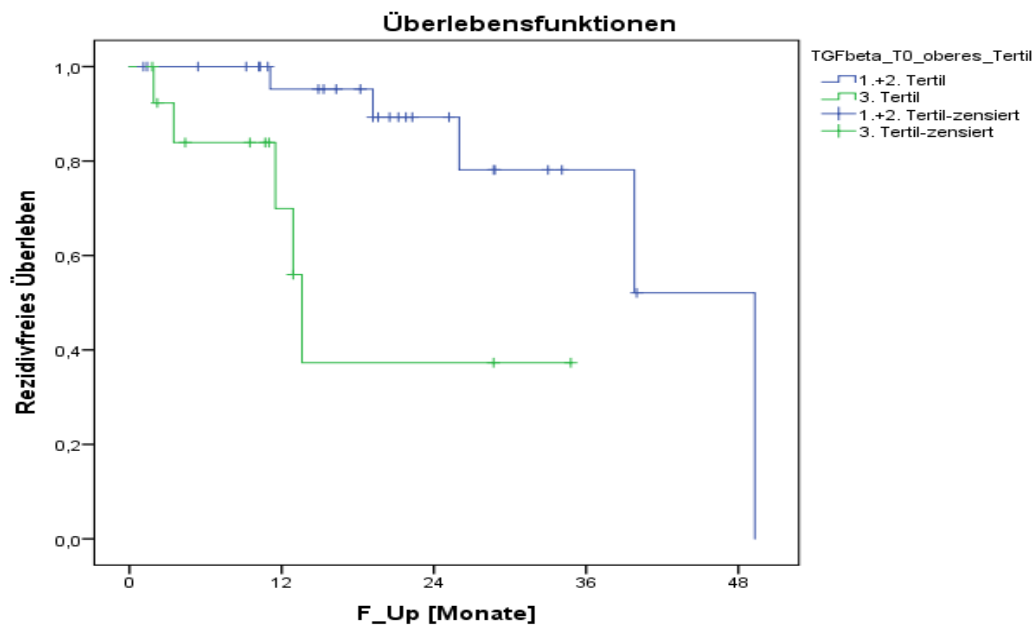


Abbildung 25: Rezidivfreies Überleben in Monaten prim RTX bei TGF beta 1 Plasmaspiegel einen Tag vor Bestrahlung (T0). Schlechteres rezidivfreies Überleben für Patienten im obersten Terzil, $p=0,004$.

4.10 Zusammenfassung der Ergebnisse

Verlauf OPN & TGF beta 1 bei prim OP						
		T0	T1	T2	T3	
OPN Median [ng/ml]		514,98	1295,70*	801,89	574,54	
TGF beta 1 Median [ng/ml]		12,8	11,5	13,5	14,8	
Plasmaspiegel OPN von prim RTX während Bestrahlung						
		T0	T1	T2	T3	
OPN Median [ng/ml]		763,6	734,7	724,3	662,2	
Unterschiede OPN & TGF beta 1 zwischen prim OP, prim RTX und Kontrollgruppe (T0)						
		Prim OP	Prim RTX	Kontrollgruppe		
OPN Median [ng/ml]		515,0	733,5*	520,2		
TGF beta 1 Median [ng/ml]		13,47	23,90*	16,26		
Korrelation OPN & TGF beta 1						
prim OP, T0		OPN & TGF beta 1 Pearson-R= 0,619 ; p=0,001				
prim RTX, T0		OPN & TGF beta1 Pearson-R= 0,393 ; p=0,011				
prim OP, T2		OPN & TGF beta1 Pearson-R= 0,546 , p=0,004				
Korrelation OPN & TGF beta 1 zu klinischen Parametern						
Alter p>0,05	Geschlecht p>0,05	Lokalisation p>0,05	UICC - Stadium p>0,05	T-Stadium p>0,05	N-Stadium p>0,05	M-Stadium: p>0,05
Überleben prim RTX, Zeitpunkt T0						
Medianes Gesamtüberleben: 14,9 Monate						
Gesamtüberleben nach OPN			Rezidivfreies Überleben nach OPN			
OPN < Median: 19,6 Monate		OPN > Median: 11,5 Monate		OPN < Median vs. OPN > Median Kein signifikanter Unterschied		
Log Rank; p=0,027			Log Rank; p=0,201			
Gesamtüberleben nach TGF beta 1			Rezidivfreies Überleben nach TGF beta 1			
TGF beta1: 1. + 2. Tertil 20,5 Monate		TGF beta 1: oberes Tertil 10,7 Monate		TGF beta 1 1. + 2. Tertil 49,3 Monate		TGF beta 1 oberes Tertil 13,6 Monate
Log Rank; p=0,008			Log Rank; p=0,004			

Tabelle 3: Zusammenfassung der Ergebnisse. * p<0,05.

5. Diskussion

Wie oben erwähnt, zeigt eine vorangegangene Studie überraschenderweise, dass es zwischen Patienten kurz vor ihrer primären Radiotherapie und bei Patienten kurz vor ihrer adjuvanten Bestrahlung, also vier Wochen postoperativ, keinen signifikanten Unterschied im Plasmaspiegel von OPN gibt. Dies gibt Abbildung 26 wieder.

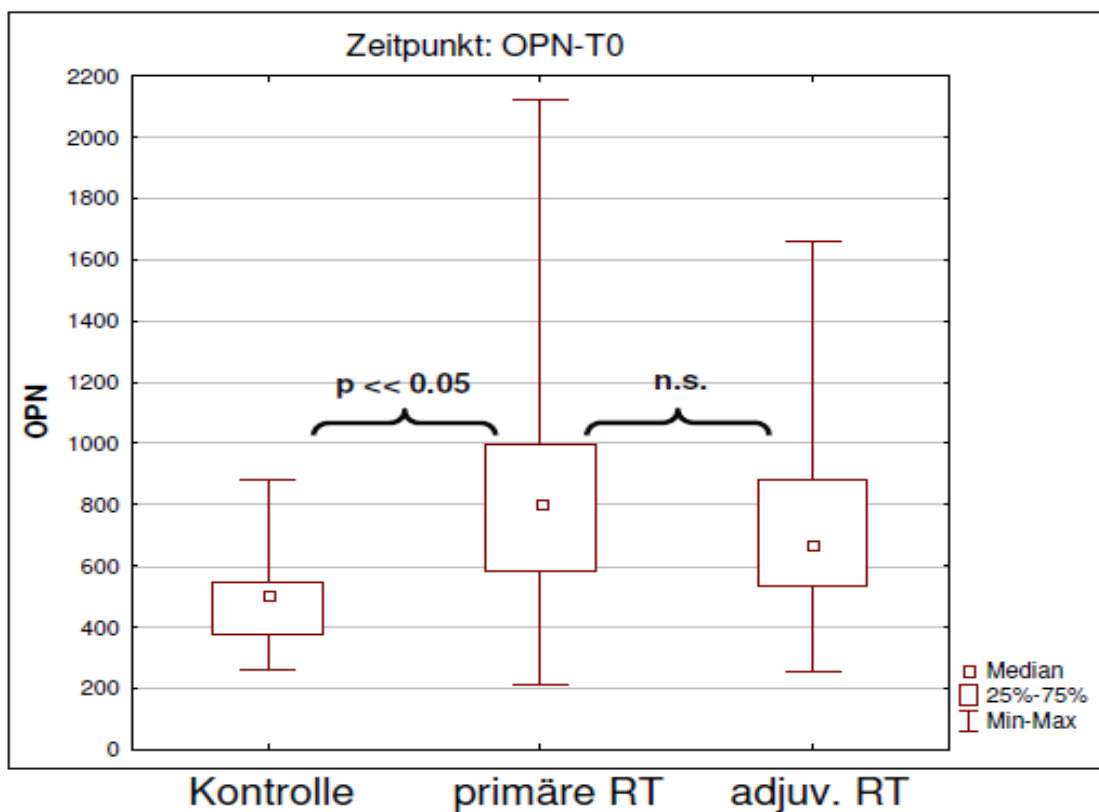


Abbildung 26: OPN Plasmaspiegel einen Tag vor Bestrahlung (T0) bei Patienten vor primärer Bestrahlung und postoperativen Patienten vor adjuvanter Bestrahlung sowie der Kontrollgruppe (Polat, Said et al. 2010).

Im Mittelpunkt dieser Arbeit steht demnach das Verhalten von OPN im Plasma im kurzfristigen postoperativen Verlauf. Dieses wird durch Abbildung 5 dargestellt. Ein Tag postoperativ, also zum Zeitpunkt T1 lässt sich ein signifikanter Anstieg des Plasmaspiegels für OPN bei der Gruppe primär operierter Patienten (prim OP) feststellen.

In den folgenden drei Wochen, also bis T3, geht dieser wieder zurück, bis er schließlich das Ausgangsniveau erreicht. Zwischen T0 und T3 lässt sich kein Unterschied feststellen. Dies verwundert, ist doch der Tumor mit seinen OPN produzierenden Zellen entfernt. Zwei Erklärungsmöglichkeiten sind hierfür vorstellbar:

- Im Zuge der Operation könnten Tumorzellen zerstört und OPN ausgeschwemmt werden.
- Im Rahmen der postoperativen Wundheilung wird OPN im Plasma nicht tumorbedingt durch anderes Gewebe anhaltend sezerniert.

5.1 Anstieg von OPN operativ induziert oder durch Wundheilungsprozesse

Der akute Anstieg kurz nach der Operation lässt vermuten, dass im Zuge des Eingriffs einmalig hohe Mengen an OPN aus dem Tumor ausgeschwemmt werden.

Betrachtet man Abbildung 6, welche den Plasmaspiegel von OPN während der Bestrahlung bei Patienten der Gruppe prim RTX zeigt, so fällt auf, dass dieser konstant bleibt. Dies legt den Schluss nahe, dass tatsächlich der operative Eingriff maßgeblichen Einfluss auf den postoperativen Anstieg des Plasmaspiegels von OPN nimmt.

Es bleibt jedoch die Frage, ob neben der operativ induzierten Ausschwemmung nicht auch Wundheilungsprozesse eine Rolle spielen. Eine einmalige operativ induzierte Ausschwemmung von OPN wäre schließlich allein nicht in der Lage, den Plasmaspiegel über einen Zeitraum von drei Wochen erhöht zu halten. Wahrscheinlicher ist vielmehr, dass zusätzlich Wundheilungsprozesse ursächlich für den wochenlang anhaltend erhöhten Plasmaspiegel von OPN sind. Ein mögliches Bindeglied zwischen OPN und Wundheilungsprozessen ist das als Wundheilmittel bekannte TGF beta 1 (Weber, Li et al. 2012).

5.2 Zusammenhang von OPN und TGF beta 1 bei der Wundheilung

Studien am Mausmodell zeigten, dass bei OPN-Knockoutmäusen die Wundheilung stark beeinträchtigt ist. Die Anzahl der Kollagenfasern war reduziert und die Matrix im Allgemeinen weniger organisiert. Zusätzlich konnte eine Reduzierung der mRNA für Kollagen 1 und dem Wundheilfaktor TGF beta 1, sowie Fibronectin nachgewiesen werden. Darüber hinaus zeigten die Fibroblasten der OPN-Knockoutmäuse keinerlei Reaktion auf Stimulation mit TGF beta 1. Allerdings muss erwähnt sein, dass eine andere Studie eine schnellere Reepithelialisierung und Wundheilung bei Knockoutmäusen zeigte (Mori, Shaw et al. 2008, Weber, Li et al. 2012). Andere Untersuchungen an der Cornea ergaben ein völliges Ausbleiben der Wundheilung, wieder andere zeigten keinen Unterschied, was auf Gewebeabhängigkeit schließen lässt (Miyazaki, Okada et al. 2008, Weber, Li et al. 2012).

Der Vermutung nachgehend, OPN reguliere die TGF beta 1 vermittelte EMT, ein für die Wundheilung nach Verbrennung, oder anderweitiger Verletzung, notwendiger Prozess, kultivierten Forscher Brustkrebszellen, welche große Mengen an OPN sezernierten, gemeinsam mit mesenchymalen Stammzellen (MSCs). Diese, durch OPN stimulierten Stammzellen produzierten vermehrt TGF beta 1, was wiederum zu vermehrter EMT bei den Tumorzellen führte. Bei Brustkrebszellen, welche kein OPN sezernierten, blieb sowohl die Sezernierung von TGF beta 1, als auch die EMT aus. Es ist also zu vermuten, dass OPN einen stimulierenden Einfluss auf TGF beta 1 ausübt und so die Wundheilung beeinflusst (Weber, Li et al. 2012).

Dieser Vermutung folgend stellte sich uns die Frage, ob sich ähnlich wie bei OPN auch für TGF beta 1 ein Anstieg zum Zeitpunkt T1 oder T2 feststellen lässt. Wie in Abbildung 7 ersichtlich, war dies in unserem Patientenkollektiv nicht der Fall. Der erwartete, wie in der Literatur beschrieben (Weber, Li et al. 2012, Weber, Kothari et al. 2014) von OPN induzierte Anstieg von TGF beta 1 konnte nicht nachgewiesen werden. Der These folgend, OPN induziere die Expression von

TGF beta 1, wäre ein Anstieg des Wundheilmfaktors in chronologischem Zusammenhang zum Anstieg von OPN zu erwarten gewesen.

Jedoch lässt sich eine generelle positive Korrelation zwischen OPN und TGF beta 1 im Plasma feststellen, wie sich in Abbildung 18, Abbildung 19 und Abbildung 20 erkennen lässt. Dies gilt sowohl für die Gruppe prim OP zum Zeitpunkt T0 und T2, also eine Woche nach der Operation, als auch für die Gruppe prim RTX zum Zeitpunkt T0. Auch wenn kein direkter chronologischer Zusammenhang im Anstieg erkennbar ist, so stützt diese positive Korrelation doch die These von Weber et al von 2012, dass vom Tumor ausgeschüttetes OPN die Expression von TGF beta 1 verstärkt, was zu vermehrter EMT in Epithelzellen führt (Weber, Li et al. 2012).

Es ist also davon auszugehen, dass beim Anstieg von OPN im Plasma zu T1 beide in Betracht gezogenen Mechanismen, also sowohl Wundheilung, als auch Ausschwemmung aus dem Tumorgewebe während der Operation, wirken.

Um den perioperativen Verlauf von TGF beta 1 zu erklären, hilft ein genauerer Blick auf den Prozess der Wundheilung. Diese gliedert sich in vier Phasen: 1. Koagulation und Hämostase, 2. Entzündungsphase, die sich wieder in Frühphase und Spätphase unterteilen lässt, 3. Proliferationsphase, in der die oben beschriebene EMT abläuft und 4. Remodeling. Die Frühphase der Entzündung läuft 24 bis 36 Stunden nach der Verletzung ab und ist gekennzeichnet durch neutrophile Granulozyten zur Phagozytose (Velnar, Bailey et al. 2009, Weber, Li et al. 2012). Diese sezernieren wie oben beschrieben OPN. Zeitlich passt dies etwa zu unserer Blutentnahme zum Zeitpunkt T1 von prim OP und zum hier gemessenen Anstieg des Plasmaspiegels von OPN. TGF beta 1 fördert zwar die Migration neutrophiler Granulozyten, aber nicht ihre Aktivierung (Flavell, Sanjabi et al. 2010). Die Spätphase der Entzündung findet etwa 48 bis 72 Stunden nach der Verletzung statt, also zwischen T1 und T2. Hier dominieren Makrophagen und später Lymphozyten und Fibroblasten. Diese produzieren, wie oben beschrieben, sowohl OPN als auch TGF beta 1, welches dann ja in der späteren Proliferationsphase für EMT bedeutsam wird. Wenn jedoch TGF beta 1 schwerpunktmäßig in der späten Entzündungsphase sezerniert wird, erklärt dies

den fehlenden Anstieg beim frühen Messpunkt T1. Möglicherweise liegt zwischen T1 und T2 doch ein Anstieg des Plasmaspiegels von TGF beta 1, der schlicht und einfach von unserem Messraster nicht erfasst wurde. Die Proliferative Phase hält jedoch etwa zwei Wochen nach Verletzung an. Somit wäre trotzdem ein Anstieg des Plasmaspiegels von TGF beta 1 zu T2 bis T3 zu erwarten gewesen (Velnar, Bailey et al. 2009, Weber, Li et al. 2012). Studien zum Verlauf von Zytokinen nach Hüft-Operation bzw. nach Zahnextraktion zeigten für TGF beta 1 einen Maximalwert sieben Tage postoperativ (Beloosesky, Weiss et al. 2011, Vieira, Repeke et al. 2015).

Eventuell ist ein möglicher Anstieg von TGF beta 1 durch initial hohe Werte, bedingt durch die Tumorerkrankung maskiert.

5.3 OPN fällt zu T3 nicht unter Ausgangsniveau

Bleibt die Frage, warum OPN postoperativ im Plasma im beobachteten Zeitraum nicht unter das Ausgangsniveau fällt, ist der OPN sezernierende Tumor doch entfernt. Eine Veröffentlichung aus dem Jahr 2010 von Blasberg et al. behandelt den postoperativen Verlauf von OPN im Plasma bei Patienten mit Nichtkleinzelligem Bronchialkarzinom (NSCLC) ohne vorangegangene neoadjuvante oder adjuvante Chemotherapie oder Bestrahlung. Bei dieser Krebsform konnte erst nach Ablauf von sechs Wochen nach Operation ein Abfall unter das präoperative Niveau von OPN im Plasma verzeichnet werden. Allerdings war die individuelle Variabilität sehr hoch. Nach der sechsten postoperativen Woche konnte nochmal ein signifikanter Rückgang im OPN Plasmaspiegel nachgewiesen werden. Dies wird mit weiter fortgeschrittener Wundheilung erklärt. Hinzu kommt, dass der Vergleich zwischen durchgeführter Thorakotomie und Videoassistierter Thorakoskopie (VATS) höhere OPN Werte für die invasivere Thorakotomie zeigte, die mit stärkerer postoperativer Wundheilung einhergeht (Blasberg, Pass et al. 2010).

Man kann also davon ausgehen, dass der beobachtete Zeitraum nach der Operation von drei Wochen in dieser Arbeit zu kurz gegriffen ist, da wie in Kapitel 5.2 beschrieben durch Wundheilungsprozesse wie EMT die Plasmaspiegel von OPN noch erhöht sein können (Weber, Li et al. 2012). Eine Verlängerung auf über sechs Wochen ist jedoch nicht möglich, da in unserem Therapieschema in den meisten Fällen eine adjuvante Radiatio nach vier Wochen vorgesehen ist. Ein Herausziehen mit eventuell einhergehender Verschlechterung der Prognose des Patienten ist ethisch nicht zulässig. Patienten, die keiner adjuvanten Therapie bedurften, wurden teils heimatnah nachgesorgt und waren einer weiteren Blutentnahme nicht mehr zugänglich.

5.4 Vorgängerstudie: OPN vor adjuvanter Radiatio nicht unter Niveau von Patienten vor primärer Radiatio

Zurück zur Frage, die sich aus den Ergebnissen der Vorgängerstudie stellt: Warum ist kein Unterschied im OPN Plasmaspiegel zwischen Patienten kurz vor primärer Radiatio und postoperativen Patienten kurz vor adjuvanter Radiatio festzustellen. Diese adjuvante Radiatio wurde vier Wochen postoperativ angegangen. Unsere Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass bei Tumoren im HNO-Bereich der OPN Plasmaspiegel nach drei bis vier Wochen wie in Kapitel 5.2 beschrieben durch Wundheilungsprozesse wie EMT auf erhöhtem Level gehalten wird (Weber, Li et al. 2012).

5.5 OPN und TGF beta 1 und Überleben

Die negative Korrelation zwischen der Höhe des OPN Plasmaspiegels und der Überlebensdauer bei Tumoren sowohl im HNO-Bereich, als auch bei Tumoren anderer Entität, konnte in mehreren Studien nachgewiesen werden (Overgaard, Eriksen et al. 2005, Petrik, Lavori et al. 2006, Polat, Said et al. 2009, Anborgh, Mutrie et al. 2011) und wird von Abbildung 21 verdeutlicht. In Anbetracht der in dieser Arbeit dargelegten positiven Korrelation zwischen OPN und TGF beta 1 und dem von Weber et al. beschriebenen Zusammenhang beider Marker bei der

Wundheilung (Weber, Li et al. 2012) stellt sich die Frage, ob analog zu OPN auch ein Zusammenhang zwischen TGF beta 1 und der Überlebensdauer bei HNO-Tumoren besteht. Die Abbildung 24 und

Abbildung 25 bestätigen dies. Patienten der Gruppe prim RTX hatten sowohl eine schlechtere Prognose hinsichtlich des Gesamtüberlebens, als auch des rezidivfreien Überlebens, wenn vor der Bestrahlung zum Zeitpunkt T0 ihr Plasmaspiegel für TGF beta 1 in der obersten Terzile lag. Wie in Kapitel 5.3 beschrieben, reguliert TGF beta 1 unter Einfluss von OPN die EMT bei der Wundheilung. Diese beinhaltet die TGF beta 1 geförderte Migration von Zellen ins Wundbett. Migration von Zellen mag bei der Wundheilung von Nutzen sein. Erleichterte Migration von Tumorzellen würde jedoch Metastasierung fördern und die Prognose der Überlebensdauer, sowie die Dauer des rezidivfreien Überlebens schmälern. Um invasiv in gesundes Nachbargewebe zu wachsen, oder in entferntes Gewebe zu metastasieren, müssen Tight Junctions des epithelialen Gewebes überwunden werden. Die Proteine Claudin und Occludin der Tight Junctions werden durch die Herunterregulierung epithelialer Marker durch EMT selbst herabreguliert. Das gleiche gilt für E-Cadherin, dessen extrazellulärer Anteil sich stabilisierend auf Tight Junctions auswirkt. Außerdem kann TGF beta 1 durch die Bindung an TGFBR2 eine Phosphorylierungskaskade an weiteren Rezeptoren der Zelloberfläche auslösen, an deren Ende die Destabilisierung von Tight Junctions steht. Das G-Protein Ras, allgemein als Tumorprogressor bekannt, wirkt außerdem zu TGF beta 1 synergistisch auf EMT und destabilisiert den E-Cadherin- β -Catenin-Komplex und damit Tight Junctions (Hiroaki Ikushima June, 2010).

In vitro konnten Weber et al. einen Zusammenhang von OPN und TGF beta 1 und der Aggressivität von Tumorzellen feststellen. Bei Brustkrebs wandeln sich MSCs zu „cancer-associated fibroblasts“ (CAF) um (Weber, Kothari et al. 2014). Hierzu wurde ähnlich wie in Kapitel 5.2 beschrieben in vitro eine Kultur von OPN produzierenden MSCs und Brustkrebszellen angelegt. Es konnte ein Anstieg von TGF beta1 und Anzeichen aggressiver Zellmigration und Invasion festgestellt werden. Dies konnte mit einer Blockade des Integrin Rezeptors $\alpha\beta3$ rückgängig gemacht werden. In einem zweiten Versuch wurden erneut MSCs mit

Brustkrebszellen kultiviert. Erstere hatten diesmal jedoch nicht die Fähigkeit, OPN zu produzieren. Erst nach externer Zugabe von OPN zeigte sich ebenfalls ein Anstieg von TGF beta 1 und Anzeichen aggressiver Zellmigration und Invasion. Ein Effekt, der sich erneut durch die Blockade des $\alpha\beta 3$ Rezeptors rückgängig machen ließ. In weiteren Experimenten konnte gezeigt werden, dass OPN mit MSCs über den $\alpha\beta 3$ und den CD44 Rezeptor interagiert. In Abhängigkeit von MZF1 wird die Expression von TGF beta 1 gefördert, was zur Expression von Markern führt, welche die Transformation von MSCs zu CAFs fördern, was wiederum die Invasivität und Aggressivität von Brustkrebszellen verstärkt. Die Blockade des $\alpha\beta 3$ Rezeptors durch Aptamere vermag dies zu verhindern, nicht jedoch die Blockade des CD44 Rezeptors (Weber, Kothari et al. 2014). Die Blockade des $\alpha\beta 3$ Rezeptors könnte ein vielversprechender therapeutischer Ansatz sein. Die Frage, inwiefern dies additiv bei operativ therapierten Patienten praktikabel ist, oder ob sich durch eine mögliche Störung der Wundheilung Grenzen auftun, wird vorher zu klären sein.

Die in unserer Arbeit gezeigte negative Korrelation zwischen Überleben und der Höhe des TGF beta 1 Plasmaspiegels stützen die Ergebnisse von Weber et al aus 2014 (Weber, Kothari et al. 2014).

Aktuell ist der Wirkstoff Cilengitide, der die Integrinrezeptoren $\alpha\beta 3$ und $\alpha\beta 5$ hemmt, Gegenstand klinischer Studien in Phase I - III bei Patienten mit Glioblastom, HNO-Tumoren und NSCLC. Es konnten keine Nachteile bezüglich der Verträglichkeit verglichen mit dem jeweils herkömmlichen Therapieregime gezeigt werden. Das Gesamt- und das progressionsfreie Überleben ist in den großen Phase II - III Studien nicht verbessert, auch wenn die Überlebenszeiten der individuellen Patienten recht inkonstant sind (Stupp, Hegi et al. 2014, Vermorken, Peyrade et al. 2014, Gerstner, Ye et al. 2015, Nabors, Fink et al. 2015, Vansteenkiste, Barlesi et al. 2015).

Auch die Antitumorreaktion des Immunsystems scheint durch TGF beta 1 beeinflusst zu werden. Flavell et al. geben in ihrem Review hierüber einen Überblick (Flavell, Sanjabi et al. 2010): Unter Einfluss von TGF beta 1 wird an Natural Killer Cells (NK) ein aktivierender Rezeptor herunterreguliert, was zu

einer verringerten zytolytischen Aktivität der NKs führt. Außerdem drosselt es die Migration von dendritischen Zellen (DC) und fördert deren Apoptose, was ihr Potential zur Präsentation von Tumorantigenen senkt. Innerhalb der Zellgruppe der Makrophagen scheinen vermehrt Typ 2 Makrophagen ausgebildet zu werden, die mit dendritischen Zellen um die Aufnahme von Tumorantigenen konkurrieren, aber nicht die Fähigkeit besitzen, diese dem Immunsystem wieder zu präsentieren, was die Toleranz gegenüber Tumoren erhöht. Außerdem produzieren diese Zellen große Mengen an TGF beta 1, was zu einem positiven Feedback Mechanismus führt. Bei den neutrophilen Granulozyten scheint der Typ 1 durch TGF beta 1 favorisiert zu werden, der als weniger zytotoxisch gilt. Auf die Funktion der T-Zellen mit CD4+ und CD8+ Rezeptor wirkt sich TGF beta 1 hemmend aus, wohingegen Regulatorische T-Zellen im Tumorbett hochreguliert werden, was das Tumorwachstum fördert. Außerdem werden innerhalb der T-Helferzellen weniger Zellen des Typ 1 und vermehrt Typ 2 ausgebildet, der als weniger effektiv gilt. Außerdem werden weniger zytotoxische T-Lymphozyten ausgebildet und deren Apoptose gefördert (Flavell, Sanjabi et al. 2010). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass TGF beta 1 über zahlreiche Einflüsse aufs Immunsystem dessen Antitumorreaktion schwächt und eine tumortolerante Umgebung fördert. Es verwundert also nicht, dass in unserer Studie Patienten mit erhöhtem Plasmaspiegel für TGF beta1 ein signifikant kürzeres Gesamt- und rezidivfreies Überleben zeigen. Entsprechend konnten Balermipas et al. zeigen, dass Patienten mit einem hohen Anteil CD8+ Tumorinfiltrierender Lymphozyten (TILs) eine bessere Prognose aufweisen (Balermipas, Rodel et al. 2016).

Eine Reihe anderer Studien kommt bei verschiedenen Tumorentitäten zu ähnlichen Ergebnissen. Bei Patienten mit Brustkrebs zeigen Studien eine negative Korrelation zwischen dem Plasmaspiegel von TGF beta 1 und dem Gesamtüberleben (Ivanovic, Demajo et al. 2006, Grau, Wen et al. 2008). Beim Ösophaguskarzinom konnte einerseits sowohl eine negative Korrelation zwischen Plasmaspiegel von TGF beta 1 und den Überlebensraten gezeigt werden (Fukuchi, Miyazaki et al. 2004), als auch eine Korrelation zwischen der Expression von TGF beta Rezeptor Typ 1 und 2 und der Invasionstiefe, dem

Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen, dem Tumorstadium und dem Überleben (Fukai, Fukuchi et al. 2003). Auch beim Blasenkarzinom konnte gezeigt werden, dass erhöhte Plasmaspiegel von TGF beta 1 mit verkürztem Gesamt- und rezidivfreiem Überleben korrelieren und vermehrt mit Lymphknotenmetastasen einhergehen (Shariat, Kim et al. 2001). Beim Cervixkarzinom besteht ebenfalls eine negative Korrelation zwischen TGF beta 1, lokaler Tumorkontrolle und dem Gesamtüberleben (Dickson, Davidson et al. 2000).

5.6 OPN und TGF beta 1 zum Zeitpunkt T0

Betrachtet man die Plasmaspiegel von OPN und TGF beta 1 zum Zeitpunkt T0, also Operation oder Bestrahlung, wird ersichtlich, dass die Patienten von prim RTX einen höheren Ausgangswert für OPN und TGF beta 1 aufweisen, als die Kontrollgruppe. Des Weiteren fällt auf, dass die Werte von prim RTX jene von prim OP übersteigen. Für TGF beta 1 gilt dies ausgeprägter als für OPN. Abbildung 3 und Abbildung 4 verdeutlichen oben genanntes. Zieht man nun mit in Betracht, dass hohe Plasmaspiegel von OPN mit einer relativ schlechteren Prognose einhergehen (Polat, Said et al. 2009), so legt dies wiederum die Vermutung nahe, dass Patienten mit einem weiter fortgeschrittenen Tumorstadium höhere Ausgangswerte für OPN haben müssten. Dies passt zum Befund höherer Ausgangswerte beider Marker bei primär bestrahlten Patienten, ist doch die Indikation einer primären Bestrahlung ein weiter fortgeschrittenes Tumorstadium. Entsprechend waren in prim OP mehr Patienten im Stadium I / II als in prim RTX. Dies führt zur Frage, ob OPN und TGF beta 1 mit den gängigen klinischen Parametern korreliert sind.

5.7 Verhältnis von OPN und TGF beta 1 zu klinischen Parametern

Wie oben dargelegt, korrelieren OPN und TGF beta 1 positiv zueinander und beide Marker sind prognostisch ungünstig bezüglich des medianen Überlebens. In Anbetracht dessen stellt sich die Frage, ob es einen Zusammenhang zwischen

OPN und TGF beta 1 mit den gängigen klinischen Parametern, also der TNM-Klassifikation, dem Tumorgrading und der UICC-Klassifikation gibt.

Abbildung 8 bis Abbildung 17 zeigen dies in der Gruppe prim OP zum Zeitpunkt T0 für beide Marker. Höhere Plasmaspiegel für OPN und TGF beta 1 bei erhöhtem Tumorstadium nach TNM-Klassifikation oder UICC-Stadium, N-Stadium oder Grading sind nicht nachweisbar. Hierbei muss auf die recht kleinen und auch untereinander ungleich großen Vergleichsgruppen hingewiesen werden. Ein Kollektiv von 40 Patienten aufgeteilt in Gruppen nach beispielsweise T-Stadium, lässt eine nur eingeschränkte statistische Aussage zu.

Die Literaturrecherche fördert, zumindest für OPN, Unterschiedliches zu diesem Thema. So konnte 2010 bei Sarkomen ein Zusammenhang zwischen OPN Level und Tumorstadium, -größe und -grading festgestellt werden (Bache, Kappler et al. 2010). Im selben Jahr wurde auch für das Kolorektale Karzinom ein Zusammenhang zwischen der mRNA von OPN und Tumorstadium, Lymphknotenmetastasen, sowie lymphatischer und venöser Invasion gezeigt (Likui, Hong et al. 2010). Im Gegensatz hierzu konnte für das NSCLC Selbiges nicht gezeigt werden (Blasberg, Pass et al. 2010). Man muss hierbei allerdings beachten, ob das Tumormaterial selbst oder ob das Blut der Patienten auf OPN untersucht wurde. Bei TGF beta 1 ergab eine Studie bei Brustkrebspatienten interessanterweise ähnliche Ergebnisse. Obwohl im Plasma gemessenes TGF beta 1 negativ mit dem Gesamtüberleben korreliert ist, konnte kein Zusammenhang zum Tumorstadium gezeigt werden (Grau, Wen et al. 2008).

Eine Reihe weiterer Fakten macht die Interpretation unseres Ergebnisses in diesem Punkt schwierig. So kann zumindest für TGF beta 1 als Kritikpunkt angeführt werden, dass der verwendete ELISA nicht direkt den aktiven Anteil von TGF beta 1 misst, sondern, wie im Methodenteil unter Kapitel 3.4 erwähnt, das Latency Associated Protein (LAP), welches Teil des TGF beta 1 Homodimers ist. Hier könnte ein Bioassay zum Einsatz kommen, der tatsächlich den aktiven Anteil von TGF beta 1 misst. Dieser macht sich zu Nutze, dass TGF beta 1 die Expression von Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) steigert. Mink lung epithelial cells (MLEC) werden demnach per Transfektion mit der Fähigkeit zur

Expression eines Konstrukts aus PAI-1 und Luciferase (PAI-1/L) ausgestattet. Bei der Luciferase handelt es sich um ein katalytisches Enzym, welches das Substrat Luciferol mit Sauerstoff reagieren lässt, wobei es zu Biolumineszenz kommt. Werden MLECs nun TGF beta 1 ausgesetzt, so erhöht sich die Konzentration von PAI-1-L und somit die Luciferaseaktivität, was in verstärkter Biolumineszenz resultiert (Abe, Harpel et al. 1994, Greer and Szalay 2002, Khan, Joyce et al. 2012).

Ein Kritikpunkt für die Ergebnisse für OPN ist die Tatsache, dass der verwendete, und im Übrigen auch alle anderen gängigen OPN ELISAs, keine Unterscheidung in Hinsicht auf die drei unterschiedlichen Splicevarianten von OPN machen (Anborgh, Mutrie et al. 2011).

Es ist bekannt, dass unterschiedliche Tumorentitäten unterschiedliche Splicevarianten von OPN produzieren. Ebenso kann das Verhältnis der Expression der verschiedenen Splicevarianten bei beispielsweise Brustkrebs zwischen Tumor- und Normalgewebe variieren. Für Tumoren des HNO-Bereiches ist OPN-a und OPN-b sowohl in Tumor- als auch in Normalgewebe vorherrschend. Diese unterscheiden sich in der fehlenden Translation von Exon 5 bei OPN-b, wodurch die dort gelegenen Phosphorylierungsstellen entfallen. In vitro Studien zum Einfluss des Ausmaßes der Phosphorylierung liefern gegensätzliche Ergebnisse für verschiedene Tumorentitäten. So konnte bei menschlichen Brustkrebszellen gezeigt werden, dass bei weniger phosphoryliertem OPN die Zellen aggressiveres Verhalten aufweisen, als bei unphosphoryliertem OPN. Die Exposition von humanen Choriokarzinomzellen mit hochphosphoryliertem OPN führte jedoch zum Gegenteil (Anborgh, Mutrie et al. 2011). Sollte sich dies bei Zellen von HNO-Tumoren ähnlich verhalten, so könnten erhöhte OPN-b Spiegel im Plasma die Aggressivität der Tumorzellen möglicherweise aufgrund weniger phosphorylierten Stellen nicht im selben Maße steigern, wie die anderen Splicevarianten, wodurch eine fehlende Korrelation zwischen klinischem Stadium des Tumors und OPN Plasmaspiegel zum Zeitpunkt T0 erklärbar wäre (Anborgh, Mutrie et al. 2011). Bisher gibt es jedoch noch kein kommerzielles Testverfahren, um die entsprechenden OPN Splicevarianten im Blut nachzuweisen.

Eine weitere posttranslationale Modifikation sind Cross-links zwischen OPN Monomeren. OPN-a und OPN-b verfügen am translatierten Exon 4 über zwei Glutaminreste, zwischen denen sich unter Mitwirkung des Enzyms Transglutaminase 2 (TG2) Isopeptidbindungen bilden und somit zu Polymerisation zweier OPN Monomere führen können (Anborgh, Mutrie et al. 2011). Wie genau OPN und TG2 bei Krebszellen im Verhältnis stehen, ist zwar letztlich noch nicht bekannt (Anborgh, Mutrie et al. 2011), jedoch deuten Studienergebnisse darauf hin, dass diese OPN Polymere aggressives Verhalten von Krebszellen fördern (Higashikawa, Eboshida et al. 2007). In Hinsicht auf die in Kapitel 3.3 beschriebene Funktionsweise des OPN ELISA besteht die Möglichkeit, dass die Polymerisation von OPN zu falsch erniedrigten Messwerten bei Patienten mit fortgeschrittenen Tumoren führt. So ist es vorstellbar, dass das ELISA-Kit ein OPN Molekül bindet, weitere mit diesem polymerisierte OPN Moleküle jedoch nicht erfasst werden, da Epitope im Polymer möglicherweise nicht mehr zugänglich sind. Eine genauere Betrachtung des Verhältnisses zwischen OPN und TGF beta 1 Werten und klinischen Parametern bei HNO-Tumoren mit größerer Patientengruppe, unter Berücksichtigung möglicher Schwierigkeiten, die Splicevarianten und Polymerisation nach sich ziehen, erscheint lohnenswert.

Ferner sind die verschiedenen ELISA Systeme nicht untereinander validiert, so dass absolute OPN-Werte nicht direkt miteinander verglichen werden können. Beim Vergleich absolut gemessener OPN Werte mit zwei verschiedenen ELISAs konnte eine durchschnittliche Abweichung der absoluten Werte um den Faktor 77 festgestellt werden. Auf die einzelnen Individuen bezogen reichte der Faktor von 2 bis 218. Einfaches Umrechnen vom einen System auf das andere unter Einbeziehen eines bestimmten Faktors ist also nicht möglich. Auch Messergebnisse des identischen Systems waren nicht immer reproduzierbar. Allerdings waren die Ergebnisse beider ELISA Systeme für Patienten mit Cervixkarzinom und HNO-Tumor positiv korreliert. Die Unterschiede beider ELISA Systeme werden in der Studie mit unterschiedlichen detektierten Epitopen und den verschiedenen Splicevarianten erklärt. Außerdem muss beachtet werden, ob OPN im Serum oder Plasma bestimmt wurde. Im Fall von Plasma

muss wiederum zwischen EDTA-Plasma, Citrat-Plasma, oder Heparin-Plasma unterschieden werden. Bei Gesunden scheint OPN im Serum niedriger gemessen zu werden. Zusätzlich können bei nicht tumorerkrankten Personen durch andere vorliegende Erkrankungen OPN Spiegel erhöht sein, da OPN nicht tumorspezifisch ist (Vordermark, Said et al. 2006).

6. Zusammenfassung und Schlussfolgerung

Die Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- OPN steigt am ersten postoperativen Tag stark an. Dieser Anstieg dauert bis zu drei Wochen postoperativ an und fällt dann auf sein Ausgangsniveau ab.
- Ursächlich für den Anstieg könnten die durch die Operation induzierte OPN-Ausschüttung und die Rolle, die OPN bei der Wundheilung spielt, sein.
- Für TGF beta 1 lässt sich postoperativ keine signifikante Veränderung im Plasmaspiegel feststellen.
- Zum Zeitpunkt T0 korreliert OPN mit TGF beta 1 bei den primär operierten (prim OP) und den primär bestrahlten (prim RTX) Patienten.
- Für TGF beta 1 und OPN konnte in der Gruppe prim OP zum Zeitpunkt T0 kein Zusammenhang zwischen Plasmaspiegel und den klassischen Prognoseparametern wie TNM-Stadium, Grading und UICC-Stadium gefunden werden.
- Zum Zeitpunkt T0 weisen Patienten in prim RTX und prim OP signifikant höhere OPN Plasmaspiegel auf, als die Kontrollgruppe.
- Patienten in prim RTX hatten signifikant höhere Ausgangswerte für TGF beta 1 als primär operativ therapierte Patienten und als die Kontrollgruppe.
- In Prim RTX haben Patienten mit erhöhtem Plasmaspiegel von OPN eine signifikant schlechtere Prognose hinsichtlich des Gesamtüberlebens.
- Auch die Ergebnisse des rezidivfreien Überlebens bei Patienten in prim RTX mit erhöhtem Plasmaspiegel für OPN deuten auf eine verminderte Rezidivfreiheit hin, sind aber statistisch nicht signifikant.
- In Prim RTX haben Patienten mit erhöhtem Plasmaspiegel für TGF beta 1 eine schlechtere Prognose sowohl bezüglich des Gesamtüberlebens als auch des rezidivfreien Überlebens.

Unsere Ergebnisse legen nahe, dass die über vier Wochen anhaltend hohen postoperativen Werte im Serum für OPN durch Prozesse der Wundheilung bedingt sind. Dies würde erklären, warum in der Vorgängerstudie die postoperativ gemessenen Werte nicht niedriger waren, als die bei noch unbehandelten Patienten vor initialer Bestrahlung.

Der Grund für den initial starken Anstieg von OPN kurz nach der Operation ist vermutlich eine durch den operativen Eingriff bedingte Ausschwemmung. Die Literaturrecherche legt nahe, dass ein Absinken der Werte für OPN nach etwa sechs Wochen zu erwarten wären. Ob dies sich für HNO-Tumore bestätigt, könnten weitere Untersuchungen zeigen.

Weiter lassen unsere Ergebnisse vermuten, dass OPN, wie in der Literatur beschrieben, über den $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ Rezeptor die Expression von TGF beta 1 fördert, was zu vermehrter Wundheilung, aber auch vermehrter Invasivität von Tumorzellen führt. Die daraus folgende und von uns festgestellte Korrelation von OPN und dem Gesamtüberleben sowie TGF beta 1 und dem rezidivfreien Überleben und Gesamtüberleben bei Patienten mit HNO-Tumoren macht beide Proteine zu einem möglichen prognostischen Marker.

Durch Blockade des $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ Rezeptors könnte eine Reduktion der Invasivität von Tumorzellen, oder der Wundheilung, insbesondere der Angiogenese, erreicht werden. Dies stellt einen vielversprechenden therapeutischen Ansatz für die Zukunft dar.

7. Literaturverzeichnis

A. Dietz, M. F., R. Hagen, R. D. Kortmann, G. Hildebrand, F. Hoppe, I. Schwienhorst, U. Keilholz. (2010, 2010). "Docetaxel, cisplatin (TP), and radiation with or without cetuximab in advanced larynx carcinoma (DeLOS II trial)." Retrieved 09.04.2015.

Abe, M., J. G. Harpel, C. N. Metz, I. Nunes, D. J. Loskutoff and D. B. Rifkin (1994). "An assay for transforming growth factor-beta using cells transfected with a plasminogen activator inhibitor-1 promoter-luciferase construct." Anal Biochem **216**(2): 276-284.

Anborgh, P. H., J. C. Mutrie, A. B. Tuck and A. F. Chambers (2011). "Pre- and post-translational regulation of osteopontin in cancer." J Cell Commun Signal **5**(2): 111-122.

Ault, K. A. (2006). "Epidemiology and Natural History of Human Papillomavirus Infections in the Female Genital Tract." Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology **2006**.

Bache, M., M. Kappler, H. Wichmann, S. Rot, A. Hahnel, T. Greither, H. M. Said, M. Kotsch, P. Wurl, H. Taubert and D. Vordermark (2010). "Elevated tumor and serum levels of the hypoxia-associated protein osteopontin are associated with prognosis for soft tissue sarcoma patients." BMC Cancer **10**: 132.

Balermipas, P., F. Rodel, C. Rodel, M. Krause, A. Linge, F. Lohaus, M. Baumann, I. Tinhofer, V. Budach, E. Gkika, M. Stuschke, M. Avlar, A. L. Grosu, A. Abdollahi, J. Debus, C. Bayer, S. Stangl, C. Belka, S. Pigorsch, G. Multhoff, S. E. Combs, D. Monnich, D. Zips and E. Fokas (2016). "CD8+ tumour-infiltrating lymphocytes in relation to HPV status and clinical outcome in patients with head and neck cancer after postoperative chemoradiotherapy: A multicentre study of the German cancer consortium radiation oncology group (DKTK-ROG)." Int J Cancer **138**(1): 171-181.

Bellahcene, A., V. Castronovo, K. U. Ogbureke, L. W. Fisher and N. S. Fedarko (2008). "Small integrin-binding ligand N-linked glycoproteins (SIBLINGs): multifunctional proteins in cancer." Nat Rev Cancer **8**(3): 212-226.

Beloosesky, Y., A. Weiss, A. Hershkovitz, D. Hendel and V. Barak (2011). "Serum transforming growth factor beta-1 post hip fracture repair in elderly patients." Cytokine **54**(1): 56-60.

Bethesda, M. N. C. I. (2013, 15.02.2013). "National Cancer Institute: PDQ® Laryngeal Cancer Treatment." Retrieved 01.06.2013, 2013, from <http://cancer.gov/cancertopics/pdq/treatment/laryngeal/HealthProfessional>.

Blasberg, J. D., H. I. Pass, C. M. Goparaju, R. M. Flores, S. Lee and J. S. Donington (2010). "Reduction of elevated plasma osteopontin levels with resection of non-small-cell lung cancer." J Clin Oncol **28**(6): 936-941.

Blobe, G. C., W. P. Schieman and H. F. Lodish (2000). "Role of transforming growth factor beta in human disease." N Engl J Med **342**(18): 1350-1358.

Califano, J., P. L. Leong, W. M. Koch, C. F. Eisenberger, D. Sidransky and W. H. Westra (1999). "Second esophageal tumors in patients with head and neck squamous cell carcinoma: an assessment of clonal relationships." Clin Cancer Res **5**(7): 1862-1867.

Califano, J., P. van der Riet, W. Westra, H. Nawroz, G. Clayman, S. Piantadosi, R. Corio, D. Lee, B. Greenberg, W. Koch and D. Sidransky (1996). "Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization." Cancer Res **56**(11): 2488-2492.

Cerezo, L., C. Lopez, A. de la Torre, D. Suarez, A. Hervas, A. Ruiz, C. Ballestin, M. Martin and P. Sandoval (2013). "Incidence of HPV-related oropharyngeal cancer and outcomes after chemoradiation in a population of heavy smokers." Head Neck.

Chang, A. E., P. A. Ganz and D. F. Hayes (2006). Oncology An Evidence-Based Approach. New York, NY, Springer Science+Business Media, Inc.

Chaplet, M., L. de Leval, D. Waltregny, C. Detry, G. Fornaciari, G. Bevilacqua, L. W. Fisher, V. Castronovo and A. Bellahcene (2003). Dentin matrix protein 1 is expressed in human lung cancer. Hoboken, NJ, ETATS-UNIS, Wiley.

Choi, S. T., J. H. Kim, E. J. Kang, S. W. Lee, M. C. Park, Y. B. Park and S. K. Lee (2008). "Osteopontin might be involved in bone remodelling rather than in inflammation in ankylosing spondylitis." Rheumatology (Oxford) **47**(12): 1775-1779.

Cooper, J. S., T. F. Pajak, P. Rubin, L. Tupchong, L. W. Brady, S. A. Leibel, G. E. Laramore, V. A. Marcial, L. W. Davis, J. D. Cox and et al. (1989). "Second malignancies in patients who have head and neck cancer: incidence, effect on survival and implications based on the RTOG experience." Int J Radiat Oncol Biol Phys **17**(3): 449-456.

de Cassia Braga Ribeiro, K., L. P. Kowalski and R. Latorre Mdo (2003). "Perioperative complications, comorbidities, and survival in oral or oropharyngeal cancer." Arch Otolaryngol Head Neck Surg **129**(2): 219-228.

DeChancie, J. and K. N. Houk (2007). "The origins of femtomolar protein-ligand binding: hydrogen-bond cooperativity and desolvation energetics in the biotin-(strept)avidin binding site." J Am Chem Soc **129**(17): 5419-5429.

Dickson, J., S. E. Davidson, R. D. Hunter and C. M. West (2000). "Pretreatment plasma TGF beta 1 levels are prognostic for survival but not morbidity following radiation therapy of carcinoma of the cervix." Int J Radiat Oncol Biol Phys **48**(4): 991-995.

Dietz, A., V. Rudat, J. Dreyhaupt, M. Pritsch, F. Hoppe, R. Hagen, L. Pfreundner, U. Schroder, H. Eckel, M. Hess, M. Schroder, P. Schneider, B. Jens, H. P. Zenner, J. A. Werner, R. Engenhardt-Cabillic, B. Vanselow, P. Plinkert, M. Niewald, T. Kuhnt, W. Budach and M. Flentje (2009). "Induction chemotherapy with paclitaxel and cisplatin followed by radiotherapy for larynx organ preservation in advanced laryngeal and hypopharyngeal cancer offers moderate late toxicity outcome (DeLOS-I-trial)." Eur Arch Otorhinolaryngol **266**(8): 1291-1300.

Dietz, A., G. Wichmann, M. Flentje and e. al. (2016). "Final results of the randomized phase II DeLos-II trial: Induction chemotherapy (IC) followed by radiotherapy (R) vs. cetuximab (E) plus IC and R for functional larynx preservation in resectable laryngeal and hypopharyngeal cancer (LHSCC)." J Clin Oncol **34**: (suppl; abstract 6025).

Flavell, R. A., S. Sanjabi, S. H. Wrzesinski and P. Licona-Limon (2010). "The polarization of immune cells in the tumour environment by TGFbeta." Nat Rev Immunol **10**(8): 554-567.

Foy, J. P., C. Bertolus, W. N. William and P. Saintigny (2013). "Oral Premalignancy: The Roles of Early Detection and Chemoprevention." Otolaryngol Clin North Am **46**(4): 579-597.

Fukai, Y., M. Fukuchi, N. Masuda, H. Osawa, H. Kato, T. Nakajima and H. Kuwano (2003). "Reduced expression of transforming growth factor-beta receptors is an unfavorable prognostic factor in human esophageal squamous cell carcinoma." Int J Cancer **104**(2): 161-166.

Fukuchi, M., T. Miyazaki, Y. Fukai, M. Nakajima, M. Sohda, N. Masuda, R. Manda, K. Tsukada, H. Kato and H. Kuwano (2004). "Plasma level of transforming growth factor beta1 measured from the azygos vein predicts prognosis in patients with esophageal cancer." Clin Cancer Res **10**(8): 2738-2741.

Gacka, M. and R. Adamiec (2002). "[Role of TGF-beta in the pathogenesis of atherosclerosis]." Pol Arch Med Wewn **108**(4): 987-991.

Gerstner, E. R., X. Ye, D. G. Duda, M. A. Levine, T. Mikkelsen, T. J. Kaley, J. J. Olson, B. L. Nabors, M. S. Ahluwalia, P. Y. Wen, R. K. Jain, T. T. Batchelor and S. Grossman (2015). "A phase I study of cediranib in combination with cilengitide in patients with recurrent glioblastoma." Neuro Oncol.

Grau, A. M., W. Wen, D. S. Ramroosingh, Y. T. Gao, J. Zi, Q. Cai, X. O. Shu and W. Zheng (2008). "Circulating transforming growth factor-beta-1 and breast cancer prognosis: results from the Shanghai Breast Cancer Study." Breast Cancer Res Treat **112**(2): 335-341.

Greer, L. F., 3rd and A. A. Szalay (2002). "Imaging of light emission from the expression of luciferases in living cells and organisms: a review." Luminescence **17**(1): 43-74.

Hashibe, M., B. Mathew, B. Kuruvilla, G. Thomas, R. Sankaranarayanan, D. M. Parkin and Z. F. Zhang (2000). "Chewing tobacco, alcohol, and the risk of erythroplakia." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **9**(7): 639-645.

He, B., M. Mirza and G. F. Weber (2006). "An osteopontin splice variant induces anchorage independence in human breast cancer cells." Oncogene **25**(15): 2192-2202.

Higashikawa, F., A. Eboshida and Y. Yokosaki (2007). "Enhanced biological activity of polymeric osteopontin." FEBS Lett **581**(14): 2697-2701.

Hiroaki Ikushima, K. M. (June, 2010). "TGF-beta signaling: A complex web in cancer progression." Nature **10**: 415 - 424.

Ivanovic, V., M. Demajo, K. Krtolica, M. Krajnovic, M. Konstantinovic, V. Baltic, G. Prtenjak, B. Stojiljkovic, M. Breberina, Z. Neskovic-Konstantinovic, D. Nikolic-Vukosavljevic and B. Dimitrijevic (2006). "Elevated plasma TGF-beta1 levels correlate with decreased survival of metastatic breast cancer patients." Clin Chim Acta **371**(1-2): 191-193.

Jones, A. S., P. Morar, D. E. Phillips, J. K. Field, D. Husband and T. R. Helliwell (1995). "Second primary tumors in patients with head and neck squamous cell carcinoma." Cancer **75**(6): 1343-1353.

Kajdaniuk, D., B. Marek, H. Borgiel-Marek and B. Kos-Kudla (2013). "Transforming growth factor beta1 (TGFbeta1) in physiology and pathology." Endokrynol Pol **64**(5): 384-396.

- Kehrl, J. H., A. B. Roberts, L. M. Wakefield, S. Jakowlew, M. B. Sporn and A. S. Fauci (1986). "Transforming growth factor beta is an important immunomodulatory protein for human B lymphocytes." J Immunol **137**(12): 3855-3860.
- Khan, S. A., J. Joyce and T. Tsuda (2012). "Quantification of active and total transforming growth factor-beta levels in serum and solid organ tissues by bioassay." BMC Res Notes **5**: 636.
- Kramer, I. R., R. B. Lucas, J. J. Pindborg and L. H. Sobin (1978). "Definition of leukoplakia and related lesions: an aid to studies on oral precancer." Oral Surg Oral Med Oral Pathol **46**(4): 518-539.
- Kreimer, A. R., G. M. Clifford, P. Boyle and S. Franceschi (2005). "Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **14**(2): 467-475.
- Krzemien, S. and P. Knapczyk (2005). "[Current review on the role of transforming growth factor beta (TGF-beta) in some pathological disorders]." Wiad Lek **58**(9-10): 536-539.
- Kuwahara, F., H. Kai, K. Tokuda, M. Kai, A. Takeshita, K. Egashira and T. Imaizumi (2002). "Transforming growth factor-beta function blocking prevents myocardial fibrosis and diastolic dysfunction in pressure-overloaded rats." Circulation **106**(1): 130-135.
- Lenarz, T. and H.-G. Boenninghaus (2012). Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde mit 6 Tabellen ; [mit Fallquiz]. Berlin ; Heidelberg, Springer.
- Lenga, Y., A. Koh, A. S. Perera, C. A. McCulloch, J. Sodek and R. Zohar (2008). "Osteopontin expression is required for myofibroblast differentiation." Circ Res **102**(3): 319-327.
- Levi, F., C. Pasche, C. La Vecchia, F. Lucchini, S. Franceschi and P. Monnier (1998). "Food groups and risk of oral and pharyngeal cancer." Int J Cancer **77**(5): 705-709.
- Likui, W., W. Hong and Z. Shuwen (2010). "Clinical significance of the upregulated osteopontin mRNA expression in human colorectal cancer." J Gastrointest Surg **14**(1): 74-81.
- Lim, A. M., D. Rischin, R. Fisher, H. Cao, K. Kwok, D. Truong, G. A. McArthur, R. J. Young, A. Giaccia, L. Peters and Q. T. Le (2012). "Prognostic significance of plasma osteopontin in patients with locoregionally advanced head and neck squamous cell carcinoma treated on TROG 02.02 phase III trial." Clin Cancer Res **18**(1): 301-307.
- Lo, K. W., G. T. Chung and K. F. To (2012). "Deciphering the molecular genetic basis of NPC through molecular, cytogenetic, and epigenetic approaches." Semin Cancer Biol **22**(2): 79-86.
- Lodi, G., A. Sardella, C. Bez, F. Demarosi and A. Carrassi (2006). "Interventions for treating oral leukoplakia." Cochrane Database Syst Rev(4): CD001829.
- Marek, A., J. Brodzicki, A. Liberek and M. Korzon (2002). "TGF-beta (transforming growth factor-beta) in chronic inflammatory conditions - a new diagnostic and prognostic marker?" Med Sci Monit **8**(7): RA145-151.
- Merry, K., R. Dodds, A. Littlewood and M. Gowen (1993). "Expression of osteopontin mRNA by osteoclasts and osteoblasts in modelling adult human bone." J Cell Sci **104 (Pt 4)**: 1013-1020.

Miller, C. S. and B. M. Johnstone (2001). "Human papillomavirus as a risk factor for oral squamous cell carcinoma: a meta-analysis, 1982-1997." Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod **91**(6): 622-635.

Miyazaki, K., Y. Okada, O. Yamanaka, A. Kitano, K. Ikeda, S. Kon, T. Uede, S. R. Rittling, D. T. Denhardt, W. W. Kao and S. Saika (2008). "Corneal wound healing in an osteopontin-deficient mouse." Invest Ophthalmol Vis Sci **49**(4): 1367-1375.

Mori, R., T. J. Shaw and P. Martin (2008). "Molecular mechanisms linking wound inflammation and fibrosis: knockdown of osteopontin leads to rapid repair and reduced scarring." J Exp Med **205**(1): 43-51.

Nabors, L. B., K. L. Fink, T. Mikkelsen, D. Grujicic, R. Tarnawski, H. Nam do, M. Mazurkiewicz, M. Salacz, L. Ashby, V. Zagonel, R. Depenni, J. R. Perry, C. Hicking, M. Picard, M. E. Hegi, B. Lhermitte and D. A. Reardon (2015). "Two cilengitide regimens in combination with standard treatment for patients with newly diagnosed glioblastoma and unmethylated MGMT gene promoter: results of the open-label, controlled, randomized phase II CORE study." Neuro Oncol **17**(5): 708-717.

Nagasaka, A., H. Matsue, H. Matsushima, R. Aoki, Y. Nakamura, N. Kambe, S. Kon, T. Uede and S. Shimada (2008). "Osteopontin is produced by mast cells and affects IgE-mediated degranulation and migration of mast cells." Eur J Immunol **38**(2): 489-499.

Neville, B. W. and T. A. Day (2002). "Oral cancer and precancerous lesions." CA Cancer J Clin **52**(4): 195-215.

Overgaard, J., J. G. Eriksen, M. Nordmark, J. Alsner and M. R. Horsman (2005). "Plasma osteopontin, hypoxia, and response to the hypoxia sensitiser nimorazole in radiotherapy of head and neck cancer: results from the DAHANCA 5 randomised double-blind placebo-controlled trial." Lancet Oncol **6**(10): 757-764.

Overgaard, J., J. G. Eriksen, M. Nordmark, J. Alsner, M. R. Horsman, H. Danish and G. Neck Cancer Study (2005). "Plasma osteopontin, hypoxia, and response to the hypoxia sensitiser nimorazole in radiotherapy of head and neck cancer: results from the DAHANCA 5 randomised double-blind placebo-controlled trial." Lancet Oncol **6**(10): 757-764.

Parkin, D. M. (2006). "The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002." Int J Cancer **118**(12): 3030-3044.

Parkin, D. M., P. Pisani and J. Ferlay (1999). "Estimates of the worldwide incidence of 25 major cancers in 1990." Int J Cancer **80**(6): 827-841.

Petrik, D., P. W. Lavori, H. Cao, Y. Zhu, P. Wong, E. Christofferson, M. J. Kaplan, H. A. Pinto, P. Sutphin, A. C. Koong, A. J. Giaccia and Q. T. Le (2006). "Plasma osteopontin is an independent prognostic marker for head and neck cancers." J Clin Oncol **24**(33): 5291-5297.

Plinkert, P. D. P.-K. (2013). "Bösartige Tumoren des Kopf-Hals-Bereichs allgemein." Retrieved 17.05.2013, 2013, from <http://www.klinikum.uni-heidelberg.de/Boesartige-Erkrankungen-des-Kopf-Hals-Bereiches.9371.0.html>.

Polat, B., H. M. Said, A. Katzer, J. Göbel, M. Guckenberger, M. Flentje and D. Vordermark. (2009). "Zeitlicher Verlauf des Plasma-Hypoxiemarkers Osteopontin (OPN) unter der Strahlenbehandlung bei Patienten mit HNO-Tumoren." Retrieved 13.05., 2013, from <http://degro.wcenter.de/dav/html/kongress2009/eposter/P253.pdf>.

Polat, B., H. M. Said, A. Katzer, M. Guckenberger, R. Mlynski, M. Flentje and D. Vordermark (2010). "Osteopontin Plasma Levels in Head and Neck Cancer Patients During Radiotherapy." International journal of radiation oncology, biology, physics **78**(3): S660.

Qin, C., O. Baba and W. T. Butler (2004). "Post-translational Modifications of SIBLING Proteins and Their Roles in Osteogenesis and Dentinogenesis." Critical Reviews in Oral Biology & Medicine **15**(3): 126-136.

Rangaswami, H., A. Bulbule and G. C. Kundu (2006). "Osteopontin: role in cell signaling and cancer progression." Trends Cell Biol **16**(2): 79-87.

Reinholt, F. P., K. Hultenby, A. Oldberg and D. Heinegard (1990). "Osteopontin--a possible anchor of osteoclasts to bone." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(12): 4473-4475.

Reith, A. and J. Sudbø (2002). "Retracted: Impact of genomic instability in risk assessment and chemoprevention of oral premalignancies." International Journal of Cancer **101**(3): 205-209.

Rittling, S. R. and D. T. Denhardt (1999). "Osteopontin function in pathology: lessons from osteopontin-deficient mice." Exp Nephrol **7**(2): 103-113.

Robert-Koch-Institut. (2009/2010, 25.03.2015). "5-Jahres-Überleben Kehlkopfkarcinom, Relative Rate in Prozent in Deutschland " Retrieved 08.04.2015, 2015.

Rodriguez, T., A. Altieri, L. Chatenoud, S. Gallus, C. Bosetti, E. Negri, S. Franceschi, F. Levi, R. Talamini and C. La Vecchia (2004). "Risk factors for oral and pharyngeal cancer in young adults." Oral Oncol **40**(2): 207-213.

Scully, C. and S. Porter (2000). "ABC of oral health. Swellings and red, white, and pigmented lesions." BMJ **321**(7255): 225-228.

Shafer, W. G. and C. A. Waldron (1975). "Erythroplakia of the oral cavity." Cancer **36**(3): 1021-1028.

Shariat, S. F., J. H. Kim, B. Andrews, M. W. Kattan, T. M. Wheeler, I. Y. Kim, S. P. Lerner and K. M. Slawin (2001). "Preoperative plasma levels of transforming growth factor beta(1) strongly predict clinical outcome in patients with bladder carcinoma." Cancer **92**(12): 2985-2992.

Shevde, L. A., R. S. Samant, J. C. Paik, B. J. Metge, A. F. Chambers, G. Casey, A. R. Frost and D. R. Welch (2006). "Osteopontin knockdown suppresses tumorigenicity of human metastatic breast carcinoma, MDA-MB-435." Clin Exp Metastasis **23**(2): 123-133.

Shibuya, K., C. D. Mathers, C. Boschi-Pinto, A. D. Lopez and C. J. Murray (2002). "Global and regional estimates of cancer mortality and incidence by site: II. Results for the global burden of disease 2000." BMC Cancer **2**: 37.

Siegel, R. L., K. D. Miller and A. Jemal (2015). "Cancer statistics, 2015." CA Cancer J Clin **65**(1): 5-29.

Slaughter, D. P., H. W. Southwick and W. Smejkal (1953). "Field cancerization in oral stratified squamous epithelium; clinical implications of multicentric origin." Cancer **6**(5): 963-968.

Stupp, R., M. E. Hegi, T. Gorlia, S. C. Erridge, J. Perry, Y. K. Hong, K. D. Aldape, B. Lhermitte, T. Pietsch, D. Grujicic, J. P. Steinbach, W. Wick, R. Tarnawski, D. H. Nam, P. Hau, A. Weyerbrock, M. J. Taphoorn, C. C. Shen, N. Rao, L. Thurzo, U. Herrlinger, T. Gupta, R. D. Kortmann, K. Adamska, C. McBain, A. A. Brandes, J. C. Tonn, O. Schnell, T. Wiegel, C. Y. Kim, L. B. Nabors, D. A. Reardon, M. J. van den Bent, C. Hicking, A. Markivsky, M. Picard, M. Weller, R. European Organisation for, C. Treatment of, C. Canadian Brain Tumor and C. s. team (2014). "Cilengitide combined with standard treatment for patients with newly diagnosed glioblastoma with methylated MGMT promoter (CENTRIC EORTC 26071-22072 study): a multicentre, randomised, open-label, phase 3 trial." Lancet Oncol **15**(10): 1100-1108.

Suzuki, K., B. Zhu, S. R. Rittling, D. T. Denhardt, H. A. Goldberg, C. A. McCulloch and J. Sodek (2002). "Colocalization of intracellular osteopontin with CD44 is associated with migration, cell fusion, and resorption in osteoclasts." J Bone Miner Res **17**(8): 1486-1497.

Thurnher, D. (2011). HNO-Heilkunde ein symptomorientiertes Lehrbuch. Wien ; New York, Springer.

Toporcov, T. N., A. Znaor, Z. F. Zhang, G. P. Yu, D. M. Winn, Q. Wei, M. Vilensky, T. Vaughan, P. Thomson, R. Talamini, N. Szeszenia-Dabrowska, E. M. Sturgis, E. Smith, O. Shangina, S. M. Schwartz, S. Schantz, P. Rudnai, L. Richiardi, H. Ramroth, M. P. Purdue, A. F. Olshan, J. Eluf-Neto, J. Muscat, R. A. Moyses, H. Morgenstern, A. Menezes, M. McClean, K. Matsuo, D. Mates, T. V. Macfarlane, J. Lissowska, F. Levi, P. Lazarus, C. La Vecchia, P. Laggiou, S. Koifman, K. Kjaerheim, K. Kelsey, I. Holcatova, R. Herrero, C. Healy, R. B. Hayes, S. Franceschi, L. Fernandez, E. Fabianova, A. W. Daudt, O. A. Curioni, L. D. Maso, M. P. Curado, D. I. Conway, C. Chen, X. Castellsague, C. Canova, G. Cadoni, P. Brennan, S. Boccia, J. L. Antunes, W. Ahrens, A. Agudo, P. Boffetta, M. Hashibe, Y. C. Lee and V. W. Filho (2015). "Risk factors for head and neck cancer in young adults: a pooled analysis in the INHANCE consortium." Int J Epidemiol **44**(1): 169-185.

Vansteenkiste, J., F. Barlesi, C. F. Waller, J. Bennouna, C. Gridelli, E. Goekkurt, D. Verhoeven, A. Szczesna, M. Feurer, J. Milanowski, P. Germonpre, H. Lena, D. Atanackovic, M. Krzakowski, C. Hicking, J. Straub, M. Picard, W. Schuette and K. O'Byrne (2015). "Cilengitide combined with cetuximab and platinum-based chemotherapy as first-line treatment in advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC) patients: results of an open-label, randomized, controlled phase II study (CERTO)." Ann Oncol **26**(8): 1734-1740.

Velnar, T., T. Bailey and V. Smrkolj (2009). "The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms." J Int Med Res **37**(5): 1528-1542.

Vermorcken, J. B., F. Peyrade, J. Krauss, R. Mesia, E. Remenar, T. C. Gauler, U. Keilholz, J. P. Delord, P. Schafhausen, J. Erfan, T. H. Brummendorf, L. Iglesias, U. Bethe, C. Hicking and P. M. Clement (2014). "Cisplatin, 5-fluorouracil, and cetuximab (PFE) with or without cilengitide in recurrent/metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck: results of the randomized phase I/II ADVANTAGE trial (phase II part)." Ann Oncol **25**(3): 682-688.

- Vieira, A. E., C. E. Repeke, B. Ferreira Junior Sde, P. M. Colavite, C. C. Bigueti, R. C. Oliveira, G. F. Assis, R. Taga, A. P. Trombone and G. P. Garlet (2015). "Intramembranous bone healing process subsequent to tooth extraction in mice: micro-computed tomography, histomorphometric and molecular characterization." PLoS One **10**(5): e0128021.
- Vordermark, D., H. M. Said, A. Katzer, T. Kuhnt, G. Hansgen, J. Dunst, M. Flentje and M. Bache (2006). "Plasma osteopontin levels in patients with head and neck cancer and cervix cancer are critically dependent on the choice of ELISA system." BMC Cancer **6**: 207.
- Wang, K. X. and D. T. Denhardt (2008). "Osteopontin: role in immune regulation and stress responses." Cytokine Growth Factor Rev **19**(5-6): 333-345.
- Weber, C. E., A. N. Kothari, P. Y. Wai, N. Y. Li, J. Driver, M. A. Zapf, C. A. Franzen, G. N. Gupta, C. Osipo, A. Zlobin, W. K. Syn, J. Zhang, P. C. Kuo and Z. Mi (2014). "Osteopontin mediates an MZF1-TGF-beta1-dependent transformation of mesenchymal stem cells into cancer-associated fibroblasts in breast cancer." Oncogene.
- Weber, C. E., N. Y. Li, P. Y. Wai and P. C. Kuo (2012). "Epithelial-mesenchymal transition, TGF-beta, and osteopontin in wound healing and tissue remodeling after injury." J Burn Care Res **33**(3): 311-318.
- Weber, G. F., G. S. Lett and N. C. Haubein (2010). "Osteopontin is a marker for cancer aggressiveness and patient survival." Br J Cancer **103**(6): 861-869.
- Wells, R. G. (2000). "Fibrogenesis. V. TGF-beta signaling pathways." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **279**(5): G845-850.
- Wikstrom, P., J. Damber and A. Bergh (2001). "Role of transforming growth factor-beta1 in prostate cancer." Microsc Res Tech **52**(4): 411-419.
- Winn, D. M., W. J. Blot, C. M. Shy, L. W. Pickle, A. Toledo and J. F. Fraumeni, Jr. (1981). "Snuff dipping and oral cancer among women in the southern United States." N Engl J Med **304**(13): 745-749.
- Yucha, C. and D. Guthrie (2003). "Renal homeostasis of calcium." Nephrol Nurs J **30**(6): 621-626; quiz 627-628.
- Zhang, J., Y. Wang, D. Li and S. Jing (2014). "Notch and TGF-beta/Smad3 pathways are involved in the interaction between cancer cells and cancer-associated fibroblasts in papillary thyroid carcinoma." Tumour Biol **35**(1): 379-385.
- Zhu, B., K. Suzuki, H. A. Goldberg, S. R. Rittling, D. T. Denhardt, C. A. McCulloch and J. Sodek (2004). "Osteopontin modulates CD44-dependent chemotaxis of peritoneal macrophages through G-protein-coupled receptors: evidence of a role for an intracellular form of osteopontin." J Cell Physiol **198**(1): 155-167.
- Znaor, A., P. Brennan, V. Gajalakshmi, A. Mathew, V. Shanta, C. Varghese and P. Boffetta (2003). "Independent and combined effects of tobacco smoking, chewing and alcohol drinking on the risk of oral, pharyngeal and esophageal cancers in Indian men." Int J Cancer **105**(5): 681-686.

Zohar, R., N. Suzuki, K. Suzuki, P. Arora, M. Glogauer, C. A. McCulloch and J. Sodek (2000). "Intracellular osteopontin is an integral component of the CD44-ERM complex involved in cell migration." *J Cell Physiol* **184**(1): 118-130.

8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die drei Splicevarianten von OPN. Grafik und Erläuterung (Anborgh, Mutrie et al. 2011).	8
Abbildung 2: Zeitpunkte der Blutentnahme für OPN und TGF beta 1 T0–T3 bei der aktuellen und der vorangegangenen Studie.	18
Abbildung 3: OPN Plasmaspiegel einen Tag vor der Operation/Bestrahlung (T0) von prim OP und prim RTX, sowie die Kontrollgruppe. * t-Test $p < 0,05$	23
Abbildung 4: TGF beta 1 Plasmaspiegel einen Tag vor der Operation/Bestrahlung (T0) von prim OP und prim RTX, sowie die Kontrollgruppe. * $p < 0,05$	24
Abbildung 5: OPN Plasmaspiegel von prim OP einen Tag präoperativ (T0), einen Tag postoperativ (T1), eine Woche postoperativ (T2) und drei Wochen postoperativ (T3). * $p < 0,05$	25
Abbildung 6: OPN Plasmaspiegel von prim RTX einen Tag vor Bestrahlungsbeginn (T0), in der dritten Bestrahlungswoche (T1), zum Ende der Bestrahlung (T2) und vier Wochen nach Bestrahlungsende (T3).	26
Abbildung 7: TGF beta 1 Plasmaspiegel von prim OP einen Tag präoperativ (T0), einen Tag postoperativ (T1), eine Woche postoperativ (T2) und drei Wochen postoperativ (T3).	27
Abbildung 8: OPN Plasmaspiegel von prim OP nach T-Stadium einen Tag präoperativ (T0), einen Tag postoperativ (T1), eine Woche postoperativ (T2) und drei Wochen postoperativ.	28
Abbildung 9: OPN Plasmaspiegel von prim OP nach N-Stadium einen Tag präoperativ (T0), einen Tag postoperativ (T1), eine Woche postoperativ (T2) und drei Wochen postoperativ.	29
Abbildung 10: OPN Plasmaspiegel von prim OP nach UICC-Stadium einen Tag präoperativ (T0), einen Tag postoperativ (T1), eine Woche postoperativ (T2) und drei Wochen postoperativ.	30
Abbildung 11: OPN Plasmaspiegel von prim OP nach Grading einen Tag präoperativ (T0), einen Tag postoperativ (T1), eine Woche postoperativ (T2) und drei Wochen postoperativ.	31
Abbildung 12: OPN Plasmaspiegel von prim OP nach Geschlecht einen Tag präoperativ (T0), einen Tag postoperativ (T1), eine Woche postoperativ (T2) und drei Wochen postoperativ.	32
Abbildung 13: TGF beta 1 Plasmaspiegel von prim OP nach T-Stadium einen Tag präoperativ (T0), einen Tag postoperativ (T1), eine Woche postoperativ (T2) und drei Wochen postoperativ.	33
Abbildung 14: TGF beta 1 Plasmaspiegel von prim OP nach N-Stadium einen Tag präoperativ (T0), einen Tag postoperativ (T1), eine Woche postoperativ (T2) und drei Wochen postoperativ.	34
Abbildung 15: TGF beta 1 Plasmaspiegel von prim OP nach UICC-Stadium einen Tag präoperativ (T0), einen Tag postoperativ (T1), eine Woche postoperativ (T2) und drei Wochen postoperativ.	35
Abbildung 16: TGF beta 1 Plasmaspiegel von prim OP nach Grading einen Tag präoperativ (T0), einen Tag postoperativ (T1), eine Woche postoperativ (T2) und drei Wochen postoperativ.	36

Abbildung 17: TGF beta 1 Plasmaspiegel von prim OP nach Geschlecht einen Tag präoperativ (T0), einen Tag postoperativ (T1), eine Woche postoperativ (T2) und drei Wochen postoperativ.	37
Abbildung 18: Korrelation zwischen Plasmaspiegeln von OPN und TGF beta 1 bei prim OP einen Tag präoperativ (T0). Pearson-R= 0,619; p=0,001.	38
Abbildung 19: Korrelation zwischen Plasmaspiegeln von OPN und TGF beta 1 bei prim OP eine Woche postoperativ (T2). Pearson-R=0,546; p=0,004.	39
Abbildung 20: Korrelation zwischen Plasmaspiegeln von OPN und TGF beta 1 bei prim RTX einen Tag präoperativ (T0). Pearson-R=0,393; p=0,11; Nichtparametrische Rangkorrelation: 0,445; p=0,004.	40
Abbildung 21: Kaplan-Meier Kurve bezüglich Gesamtüberleben nach adjuvanter Radiatio in Tagen in Abhängigkeit vom OPN Plasmaspiegel (getrennt nach Terzilen) (Polat B, 2009).	41
Abbildung 22: Überlebenszeit in Monaten von prim RTX bei OPN Plasmaspiegel zum Zeitpunkt T0.	42
Abbildung 23: Rezidivfreies Überleben in Monaten von prim RTX in Abhängigkeit zu OPN zum Zeitpunkt T0.	43
Abbildung 24: Überlebenszeit in Monaten von prim RTX bei TGF beta 1 Plasmaspiegel einen Tag vor Bestrahlung (T0); Schlechteres Überleben für Patienten im obersten Terzil, p=0,008.	44
Abbildung 25: Rezidivfreies Überleben in Monaten prim RTX bei TGF beta 1 Plasmaspiegel einen Tag vor Bestrahlung (T0). Schlechteres rezidivfreies Überleben für Patienten im obersten Terzil, p=0,004.	45
Abbildung 26: OPN Plasmaspiegel einen Tag vor Bestrahlung (T0) bei Patienten vor primärer Bestrahlung und postoperativen Patienten vor adjuvanter Bestrahlung, sowie der Kontrollgruppe (Polat, Said et al. 2010).	47

9. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auflistung und Charakterisierung operativ therapierter und primär bestrahlter Patienten, sowie Tests auf statistische Unterschiede der Häufigkeitsverteilung. * Kontrollgruppe signifikant jünger, p<0,001.	17
Tabelle 2: Überblick der verwendeten statistischen Testverfahren.	22
Tabelle 3: Zusammenfassung der Ergebnisse. * p<0,05.	46

Danksagung

Zunächst möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Michael Flentje für die Möglichkeit zur Erstellung einer Dissertation an der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie danken.

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer Dr. med. Bülent Polat, der meine Begeisterung für das interessante Thema zu wecken wusste und mir zu jeder Zeit mit großer Kompetenz und Einsatz hilfreich zur Seite stand.

Weiterhin möchte ich Herrn Priv.-Doz. Dr. med. S. Hackenberg aus der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenkrankheiten danken, der sich freundlicherweise bereit erklärt hat, das Koreferendariat zu übernehmen.

Auch Dank an die Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenkrankheiten für die freundliche Kooperation bei der Probengewinnung.

Großer Dank gebührt auch Dr. Uwe Malzahn aus der Zentrale für klinische Studien am Universitätsklinikum Würzburg, vormals Institut für Klinische Epidemiologie und Biometrie, für seine Beratung.

Danke auch an Frau Prof. Dr. Tcholpon Djuzenova aus dem Strahlenlabor und an das gesamte Laborteam für die Unterstützung und die schöne Zeit. Ganz besonders möchte ich mich bei Frau Dr. Gisela Wohlleben für ihre Geduld und Hilfe bedanken.

Zuletzt gilt mein besonderer Dank meiner Familie, deren stete Unterstützung vieles erst möglich gemacht hat.

LEBENS LAUF DES PROMOVENDEN

Persönliche Daten

Name	Philipp Johannes Kaiser
Geburtstag	07. Januar 1988
Geburtsort	Stuttgart
Nationalität	Deutsch

Werdegang

03/2018	Assistenzarzt im Fachgebiet Augenheilkunde Sankt Gertrauden Krankenhaus, Berlin
09/2014–02/2017	Assistenzarzt im Fachgebiet Augenheilkunde Praxis Dr. Kaiser, Stuttgart
02/2013–01/2014	Praktisches Jahr <ul style="list-style-type: none">- 1. Terial: Leopoldina Krankenhaus Schweinfurt Fachgebiet: Innere Medizin- 2. Terial: Leopoldina Krankenhaus Schweinfurt/ National University Hospital of Singapore Fachgebiet: Chirurgie- 3. Terial: Universitätsklinikum Würzburg Fachgebiet: Strahlenheilkunde
11/2012	Famulaturen <ul style="list-style-type: none">- Klinikum Friedrichshain, Berlin: Kinderheilkunde
09/2012	<ul style="list-style-type: none">- Krankenhaus Hietzing, Wien: Herz- und Gefäßchirurgie
03/2012–04/2012	<ul style="list-style-type: none">- Universitätsklinikum Würzburg: Strahlenheilkunde
09/2011–10/2011	<ul style="list-style-type: none">- Universitätsklinikum Würzburg: Neuroradiologie
03/2011–04/2011	<ul style="list-style-type: none">- Universitätsklinikum Würzburg: HNO
09/2010–10/2010	<ul style="list-style-type: none">- Universitätsklinikum Würzburg: Augenheilkunde
08/2009–09/2009	Krankenpflegepraktika <ul style="list-style-type: none">- Robert-Bosch-Krankenhaus, Stuttgart
03/2009	<ul style="list-style-type: none">- DRK Klinikum, Berlin Mitte
07/2008–08/2008	<ul style="list-style-type: none">- Oberschwaben-Klinik St. Elisabeth, Ravensburg
04/2008–03/2014	Studium der Humanmedizin an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

27.05.2014	- 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
12.03.2010	- 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
07/2007–03/2008	Grundwehrdienst
09/1998–07/2007	Lise-Meitner-Gymnasium Remseck
19.06.2007	Allgemeine Hochschulreife
09/1994-07/1998	Neckarschule Remseck - Aldingen

PHILIPP KAISER

Berlin, 08.05.2018