

# **Osteopontin als endogener Marker der Tumorphoxie und therapeutisches Target in der Strahlentherapie**

Dissertation

zur Erlangung des  
Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I - Biowissenschaften -

der Martin-Luther-Universität  
Halle-Wittenberg,

vorgelegt von

Frau Diplom-Biochemikerin Antje Güttler

geb. am 28.November 1983 in Halle/Saale

## Gutachter

1. PD Dr. rer. nat. Ralph Golbik
2. Prof. Dr. med. Dirk Vordermark
3. Prof. Dr. rer. nat. Helge Taubert

Promotionsgesuch eingereicht am: 05.Juli 2016

Tag der öffentlichen Verteidigung: 17.März 2017

*meinem Mann Bert  
und  
meinen beiden Söhnen Oskar und Michel*

## Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>III</b>
<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>VI</b>
<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>VII</b>
<b>1. Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Tumorerkrankungen.....	1
1.1.1 Mammakarzinom.....	2
1.1.2 Gliome.....	4
1.1.3 Weichteilsarkome.....	6
1.2 Tumorhypoxie und Bestrahlung.....	8
1.2.1 HIF-1 $\alpha$ und andere hypoxieregulierte Proteine.....	10
1.3 Das extrazelluläre Matrixprotein Osteopontin.....	13
1.3.1 Struktur.....	13
1.3.2 Lokalisation.....	15
1.3.3 Physiologische Funktionen des Osteopontins.....	16
1.3.4 OPN-Signalwege und deren Bedeutung für die Tumorprogression.....	17
1.3.5 OPN als prognostischer Marker und therapeutisches Zielprotein.....	19
1.4 Zielstellung.....	20
<b>2. Ergebnisse und Diskussion.....</b>	<b>23</b>
2.1 Bedeutung von Osteopontin als Tumor- und Hypoxiemarker <i>in vitro</i> .....	23
2.1.1 Bedeutung von OPN in Mammakarzinomzellen im Zusammenhang mit Bestrahlung.....	23
2.1.2 OPN und OPN-Spleißvarianten in Glioblastomzellen.....	28
2.1.3 <i>OPN</i> -Genexpression unter Normoxie und Hypoxie in verschiedenen Tumorzelllinien.....	36
2.2 Bedeutung von Osteopontin bzw. der OPN-Spleißvarianten als Tumor-, Prognose- und Hypoxiemarker <i>in vivo</i> .....	42
2.2.1 In Weichteilsarkomen.....	42
2.2.2 In Glioblastomen.....	49
2.2.3 OPN als Hypoxiemarker.....	51
<b>3. Zusammenfassung und Ausblick.....</b>	<b>54</b>
<b>4. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>56</b>
<b>5. Publikationen, die die Grundlage für die Dissertation bilden.....</b>	<b>73</b>

<b>6. Anhang .....</b>	<b>98</b>
6.1 Publikationen.....	98
6.2 Poster.....	99
6.3 Vorträge.....	100
6.4 Auszeichnungen .....	100

**Abkürzungsverzeichnis**

AJCC	<i>American joint committee on cancer</i>
APC	<i>adenomatous polyposis coli</i>
ARCON	<i>accelerated radiotherapy with carbogen and nicotinamide</i>
AS	Aminosäure
Bcl-xl	<i>B-cell lymphoma-extra large</i>
bFGF	<i>basic fibroblast growth factor</i>
bp	Basenpaare
<i>BRCA1/BRCA2</i>	<i>breast cancer gene 1/breast cancer gene 2</i>
Bsp.	Beispiel
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CA IX/CA 9	Carboanhydrase IX
CBP	<i>CREB-binding protein</i>
CCNB1	Cyclin B1
CDC2	<i>cell division cycle protein 2</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CDS	<i>coding DNA sequence</i>
CREB	<i>cAMP response element-binding protein</i>
c- <i>Src</i>	<i>cellular sarcoma</i>
D	Asparaginsäure (Einbuchstabencode)
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
d. h.	das heißt
DMF	<i>dose modifying factor</i>
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EORTC	<i>European organisation for research and treatment of cancer</i>
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
ERM	Ezrin, Radixin und Moesin
EZM	extrazelluläre Matrix
FIH	<i>factor inhibiting HIF-1</i>
FMISO	Fluoromisonidazol
G	Glycin (Einbuchstabencode)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GLUT1	Glukosetransporter 1

GusB	$\beta$ -Glucuronidase
HGF	<i>hepatocyte growth factor</i>
HIF-1 $\alpha$ /HIF-1 $\beta$	<i>hypoxia-inducible factor 1alpha/beta</i>
HK2	<i>hexokinase 2</i>
HNO	Hals-Nasen-Ohren (bezeichnet Kopf-Hals-Bereich)
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase
HRE	<i>hypoxia response element</i>
IGF-2	<i>insulin-like growth factor 2</i>
IHC	Immunhistochemie (immunhistochemische Analyse)
I $\kappa$ B $\alpha$	<i>NF<math>\kappa</math>B inhibitor alpha</i>
IKK	<i>NF<math>\kappa</math>B inhibitor kinase</i>
iNOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
kDa	Kilodalton
KI	Konfidenzintervall
L	Leucin (Einbuchstabencode)
LMS	Leiomyosarkome
LOH	<i>loss of heterozygosity</i>
MAP	<i>mitogen-activated protein</i>
MFH	malignes fibröses Histiozytom
<i>MLH1</i>	<i>mutL homolog 1</i>
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule (Millimeter Hydrargyrum)
MMP	Matrixmetalloprotease
n	Anzahl
<i>NF1/NF2</i>	<i>neurofibromatosis 1 gene/neurofibromatosis 2 gene</i>
NF- $\kappa$ B	<i>nuclear factor kappa B</i>
NIK	<i>nuclear factor-inducing kinase</i>
NOS	<i>not otherwise specified</i>
OER	<i>oxygen enhancement ratio</i>
OPN	Osteopontin
p	p-Wert
PAI	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor
PARP	Poly(ADP-ribose)-Polymerase
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
<i>PMS2</i>	<i>PMS1 homolog 2</i>

---

<i>PTCH1</i>	<i>patched homolog 1</i>
qPCR	<i>quantitative real-time PCR</i>
r	Korrelationskoeffizient
R	Arginin (Einbuchstabencode)
Ras	<i>rat sarcoma</i>
RIPA	<i>radioimmunoprecipitation assay</i>
RMS	Rhabdomyosarkom
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RR	relatives Risiko
S	Serin (Einbuchstabencode)
<i>SPP1</i>	<i>secreted phosphoprotein 1</i>
TNM	Tumor, Lymphknoten ( <i>nodes</i> ), Metastasen
<i>TP53</i>	<i>tumour protein 53</i>
TRAIL	<i>tumour necrosis factor related apoptosis inducing ligand</i>
<i>TSC1/TSC2</i>	<i>tuberous sclerosis 1/tuberous sclerosis 2</i>
uPA	Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator
uPAR	Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator Rezeptor
UICC	<i>union internationale contre le cancer</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
VHL	von Hippel-Landau
vs.	<i>versus</i>
<i>WNR</i>	<i>Werner's syndrome gene</i>
WHO	<i>world health organisation</i>
WTS	Weichteilsarkome
Y	Tyrosin (Einbuchstabencode)
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1-1: Histologische Klassifizierung des Mammakarzinoms [Tavassoli und Devilee, 2003].....	3
Tabelle 1-2: WHO-Klassifizierung der Gliome, relative Häufigkeit und 5-Jahres-Überlebensrate (modifiziert nach [Kommission Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Neurologie (2014); Dolecek <i>et al.</i> , 2012]).....	5
Tabelle 1-3: Histologische Subtypen der WTS und deren Häufigkeit (modifiziert nach [DGHO Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie e.V. (2011)]) .....	7
Tabelle 1-4: Übersicht der OPN-Spleißvarianten (modifiziert nach [Lin <i>et al.</i> , 2015]) .....	14
Tabelle 2-1: EF-Werte der Transfektion der siRNA OpnS unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen in der Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-231 .....	28
Tabelle 2-2: Einfluss der Hypoxie (0,1 % O <sub>2</sub> ) auf den mRNA- und Proteingehalt von OPN in verschiedenen Tumorzelllinien .....	40
Tabelle 2-3: Klinische und histopathologische Parameter des WTS-Patientenkollektivs (modifiziert nach [Bache <i>et al.</i> , 2010]) .....	44
Tabelle 2-4: Medianer mRNA-Gehalt der OPN-Spleißvarianten [Kopien OPN/Kopien HPRT] im Tumorgewebe und im umliegenden „Normalgewebe“ bei WTS-Patienten .....	46
Tabelle 2-5: Bivariate Korrelation des mRNA-Gehalts der OPN-Spleißvarianten und des Protein- und mRNA-Gehalts der Invasionsmarker uPA, uPAR und PAI (nach Spearman-Rho) ...	47
Tabelle 2-6: Überlebensanalysen nach Kaplan-Meier und Cox-Regressionsanalyse (modifiziert nach [Hahnel <i>et al.</i> , 2012]) .....	48

**Abbildungsverzeichnis**

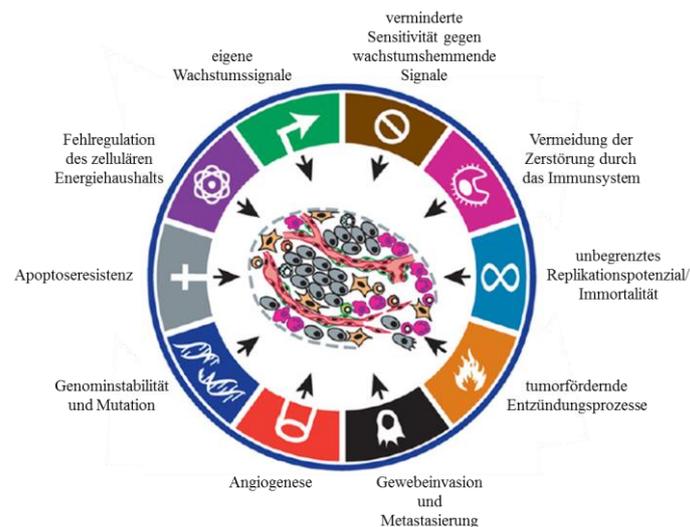
Abbildung 1-1: Spezifische Eigenschaften von Tumorzellen nach [Hanahan und Weinberg, 2011]....	2
Abbildung 1-2: Indirekter Strahleneffekt.....	9
Abbildung 1-3: Sauerstoffabhängige Regulation der Stabilität des HIF-1 (modifiziert nach [Carroll und Ashcroft, 2005; Nizet und Johnson, 2009]) .....	11
Abbildung 1-4: Postulierter Mechanismus der hypoxieabhängigen Regulation der <i>OPN</i> -Expression (modifiziert nach [Zhu <i>et al.</i> , 2005]).....	12
Abbildung 1-5: Schematische Struktur des OPN (modifiziert nach [Buback <i>et al.</i> , 2009]) .....	15
Abbildung 1-6: Entstehung von OPNs und OPNi (modifiziert nach [Buback <i>et al.</i> , 2009]) .....	15
Abbildung 1-7: OPN-regulierte Signalwege (modifiziert nach [Rangaswami <i>et al.</i> , 2006]).....	17
Abbildung 2-1: Zellphysiologische Effekte der Reduktion der <i>OPN</i> -Genexpression (modifiziert nach [Hahnel <i>et al.</i> , 2010]) .....	26
Abbildung 2-2: Radiosensitivität der Zelllinie MDA-MB-231 unter Normoxie (A) und Hypoxie (B).....	27
Abbildung 2-3: mRNA-Gehalt der <i>OPN</i> -Spleißvarianten in verschiedenen Tumorzelllinien.....	29
Abbildung 2-4: Extrazellulärer OPN-Proteingehalt ausgewählter Tumorzelllinien .....	30
Abbildung 2-5: Lokalisation des intrazellulären OPN in den Zelllinien MDA-MB-231 und U251MG.....	31
Abbildung 2-6: Immunfluoreszenzfärbung nach siRNA-Transfektion gegen OPN [Güttler <i>et al.</i> , 2013].....	32
Abbildung 2-7: Lokalisation des OPN bei Überexpression der <i>OPN</i> -Spleißvarianten.....	33
Abbildung 2-8: mRNA- und Proteingehalt von CCNB1 in U251MG-Zellen nach Reduktion der <i>OPN</i> -Genexpression .....	35
Abbildung 2-9: mRNA-Gehalt von <i>OPN</i> und <i>CA9</i> in den Zelllinien US 8-93 und SAS.....	38
Abbildung 2-10: OPN- und CA IX-Proteingehalt in den Zelllinien US 8/93 und SAS.....	39

# 1. Einleitung

## 1.1 Tumorerkrankungen

Unter einem Tumor versteht man im engeren medizinischen Sinne eine Gewebeneubildung (Neoplasie), welche aufgrund von fehlreguliertem Zellwachstum auftritt. Soweit das Ursprungsgewebe bekannt ist, unterscheidet man bei malignen Tumoren unter anderem zwischen Karzinomen, welche sich aus dem Ekto- bzw. Endoderm (Epithelgewebe) ableiten und den Sarkomen, welche sich aus dem Mesoderm (Binde- und Stützgewebe) ableiten.

Tumorerkrankungen sind nach Herz-Kreislaufkrankungen in Deutschland die zweithäufigste Todesursache [Statistisches Bundesamt (2014)]. Die aktuellen Untersuchungen belegen für Deutschland pro Jahr ca. 470.000 Krebsneuerkrankungen (252.000 bei Männern und 225.000 bei Frauen) und 218.000 krebsbedingte Sterbefälle (118.000 bei Männern und 100.000 bei Frauen) [Robert Koch-Institut und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V. (2013)]. Bei der Erforschung der Ursachen der Tumorentstehung geht man heute von einem Mehrstufenprozess aus, bei dem mehrere unabhängige Mutationen auftreten müssen, damit eine maligne Tumorzelle entsteht. Dieser Prozess wurde 1996 am Beispiel des Kolonkarzinoms von Kinzler und Vogelstein beschrieben [Kinzler und Vogelstein, 1996]. Die malignen Tumorzellen besitzen sechs definierte Merkmale, die sie als solche kennzeichnen [Hanahan und Weinberg, 2000]. Als Erstes weisen Tumorzellen im Vergleich zu gesunden Zellen eine verminderte Sensibilität gegen wachstumshemmende Signale und zweitens eine Resistenz gegen Apoptose auf. Drittens können Tumorzellen ihr Wachstum durch selbstständige Wachstumssignale stimulieren. Viertens haben sie ein uneingeschränktes Replikationspotenzial. Fünftens sind sie in der Lage, sich durch selbstständige Angiogenese ausreichend mit Nährstoffen zu versorgen und sechstens können sie durch Invasion und Metastasierung in fremdes Gewebe einzuwandern. 2011 beschrieben Hanahan und Weinberg zusätzlich vier weitere Merkmale, die eine Tumorzelle charakterisieren: erstens Genominstabilität und spezifische Mutationen in Tumorzellen, zweitens tumorfördernde Entzündungsprozesse, drittens die Fähigkeit, die eigene Zerstörung durch das Immunsystem zu umgehen, sowie viertens die Fehlregulation des zellulären Energiehaushalts [Hanahan und Weinberg, 2011] (Abbildung 1-1).



**Abbildung 1-1: Spezifische Eigenschaften von Tumorzellen nach [Hanahan und Weinberg, 2011]**

Diese beschriebenen Merkmale gelten für alle Neoplasien unabhängig von der Lokalisation und Histologie. Allerdings zeigen die Tumoren je nach Ursprungsgewebe ein extrem unterschiedliches zellbiologisches Verhalten und Therapieansprechen. In der vorliegenden Arbeit wurden sowohl *in vitro*- als auch *in vivo*-Untersuchungen an verschiedenen soliden Tumoren durchgeführt (Mammakarzinom, Glioblastom und Weichteilsarkom), die im Folgenden genauer beschrieben werden.

### 1.1.1 Mammakarzinom

Das Mammakarzinom ist mit 32 % die häufigste aller Tumorerkrankungen bei Frauen. 2010 gab es deutschlandweit bei den Frauen ungefähr 70.000 Neuerkrankungen, wobei die Anzahl stark altersabhängig ist und mit zunehmendem Alter deutlich ansteigt [Robert Koch-Institut und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V. (2013)]. Dementsprechend liegt das mittlere Erkrankungsalter bei 65 Jahren. Die Erkrankungsrate hat sich seit 1980 etwa verdoppelt, allerdings ist die Mortalitätsrate deutlich gesunken. Bei Frauen zwischen 30 und 60 Jahren ist Brustkrebs dennoch die häufigste Todesursache (ca. 17.000 Sterbefälle in 2010). Die absolute 5-Jahres-Überlebensrate liegt bei 79 % [Robert Koch-Institut und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V. (2013)].

Es gibt verschiedene Faktoren, die das Risiko an Brustkrebs zu erkranken nachweislich deutlich erhöhen [Armstrong *et al.*, 2000]. Das Alter stellt den größten Risikofaktor dar, denn Frauen ab 50 Jahren haben ein 6,5-fach erhöhtes Risiko an Brustkrebs zu erkranken. Da das Wachstum der Mammakarzinome hormonell reguliert wird, zählen Faktoren, die den Hormonhaushalt beeinflussen, zu potenziellen Risikofaktoren [Lippman *et al.*, 1986]. Dazu zählen eine frühe Menarche, späte Gravidität und Menopause sowie postmenopausale Hormonersatztherapien [Kobayashi *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2005; Parsa und Parsa, 2009]. Nur etwa 5 % aller Neuerkrankungen sind auf genetische Prädispositionen zurückzuführen. Die Keimbahnmutationen im *BRCA1* und *BRCA2*-Gen ist für den

Großteil aller hereditären Erkrankungen verantwortlich. Bei einer Mutation in den Tumorsuppressorgenen *BRCA1* bzw. *BRCA2* liegt die Wahrscheinlichkeit, dass eine Frau im Laufe ihres Lebens an Brustkrebs erkrankt, bei 64 % bzw. 45 % [Antoniou *et al.*, 2003]. Aber auch andere Faktoren wie postmenopausale Adipositas, Rauchen, hoher Alkoholkonsum und Strahlenexposition können das Brustkrebsrisiko erhöhen [Boyle und Boffetta, 2009; Johnson *et al.*, 2011; Reeves *et al.*, 2007; Ronckers *et al.*, 2005]. Bei Brustkrebs treten meist keine frühzeitigen Symptome auf, sodass eine frühestmögliche Erkennung durch regelmäßige Tastuntersuchungen der Brust bzw. Mammographiescreenings für die Diagnosestellung von entscheidender Bedeutung ist. Der generelle Überlebensvorteil bei regelmäßigem Mammographiescreening gilt vor allem durch skandinavische Studien als nachgewiesen [Roberts *et al.*, 1990; Tabar *et al.*, 1989], wird aber durchaus kontrovers diskutiert [Autier *et al.*, 2011; Autier *et al.*, 2012]. Liegt ein positiver Befund vor, ist die histologische Klassifizierung des Tumors für die Prognose- und Therapieerstellung essentiell. Hierbei wird zwischen nicht-invasiven und invasiven Mammakarzinomen sowie verschiedenen Untergruppen unterschieden (Tabelle 1-1). Außerdem werden die histologischen Tumortypen in drei verschiedene Differenzierungsgrade G1-G3 (*grading*) eingeteilt. Mit Hilfe der TNM-Klassifikation wird die Größe des Tumors (T), die Anzahl der befallenen Lymphknoten (N) und eine eventuelle Fernmetastasierung (M) beschrieben. Daraus leitet sich dann die Einteilung des Tumors in verschiedene Stadien nach dem AJCC (*American joint committee on cancer*)-System der UICC (*union internationale contre le cancer*) ab.

**Tabelle 1-1: Histologische Klassifizierung des Mammakarzinoms [Tavassoli und Devilee, 2003]**

Histologie des Tumors	relative Häufigkeit
Nicht-invasiv	
<i>Duktales Karzinom in situ (DCIS)</i>	----
<i>Paget-Erkrankung der Brustwarze</i>	----
<i>Lobuläres Karzinom in situ (LCIS)</i>	----
Invasiv	
<i>Duktales Karzinom (IDC)</i>	40-75 %
<i>Lobuläres Karzinom (ILC)</i>	5-15 %
<i>Medulläres Karzinom</i>	1-7 %
<i>Tubuläres Karzinom</i>	< 2 %
<i>Muzinöses Karzinom</i>	2 %
<i>Papilläres Karzinom</i>	1-2 %

Die Wahl der Therapie richtet sich vor allem nach dem Stadium des Tumors, aber auch nach der immunhistologischen Klassifizierung des Östrogen-, Progesteron- und HER2-Rezeptorstatus. In der Regel erfolgt zunächst eine (brusterhaltende) Operation zur möglichst vollständigen Resektion des Tumors. Diese wird zumeist adjuvant (postoperativ) durch eine lokoregionäre Radiotherapie und eine

systemische Chemo-, Hormon- und/oder Antikörpertherapie ergänzt [Leitlinienprogramm Onkologie der AWMF, Deutschen Krebsgesellschaft e.V. und Deutschen Krebshilfe e. V. (2012)]. Die postoperative Radiotherapie dient nachweislich der Senkung der Rezidivrate [Fisher *et al.*, 2002; Overgaard *et al.*, 1999]. Bei fortgeschrittenen Tumorstadien (inoperable T4-Tumore) und bei inflammatorischen Tumoren wird die sogenannte neoadjuvante Therapie angewendet. In diesem Fall wird die Patientin vor der Operation mit Chemotherapeutika und/oder Hormonantagonisten behandelt, um das Tumolvolumen zu verringern und somit eine vollständige Entfernung des Tumors oder eine brusterhaltende Therapie zu ermöglichen. Bei HER2/neu positiven Tumoren, welche mit einer ungünstigen Prognose assoziiert sind [Slamon *et al.*, 1987], wird zusätzlich eine Antikörpertherapie mit Trastuzumab durchgeführt, welche das krankheitsfreie Überleben um das 1,6 - 2,1-fache erhöht (Kaplan-Meier-Analyse: 95 % KI = 1,4-2,0 bzw. 95 % KI = 1,7-2,6;  $p < 0,0001$ ; Log-Rank-Test) [Romond *et al.*, 2005; Smith *et al.*, 2007]. Neben einer optimalen individuellen Therapie für jeden Patienten steht auch die Etablierung neuer Prognosemarker wie z. B. dem extrazellulären Matrixprotein Osteopontin (OPN) im zentralen Blickfeld der Forschung. In Mammakarzinomen ist ein erhöhter OPN-Gehalt (mRNA/Plasma/immunhistochemisch) häufig mit einer schlechten Prognose und einer kürzeren Überlebenszeit der Patienten assoziiert [Rudland *et al.*, 2002; Singhal *et al.*, 1997; Tuck *et al.*, 1998]. Um die Bedeutung von OPN weiter zu charakterisieren, wurden in der vorliegenden Arbeit die Effekte einer Transfektion mit OPN-siRNAs im Zusammenhang mit Bestrahlung in der MDA-MB-231 als Modellzelllinie für Mammakarzinome untersucht (2.1.1).

### 1.1.2 Gliome

Gliome sind Primärtumore des zentralen Nervensystems, die meist aus den Gliazellen, dem Nähr- und Stützgewebe der Nervenzellen, entstehen. Die Inzidenzrate für Gliome beträgt pro Jahr fünf bis sechs Neuerkrankungen je 100.000 Einwohner. Sie machen ca. 40-50 % aller Hirntumore aus. Die Unterteilung in verschiedene Subtypen (Astrozytome, Oligodendrogliome, Ependynome und Mischgliome) erfolgt nach der Histologie der Gliazellen, welchen sie am meisten ähneln. Diese müssen allerdings nicht zwangsläufig die Ursprungszellen sein. Außerdem werden Gliome nach den verschiedenen Differenzierungsgraden der WHO (*world health organisation*) unterschieden [Louis *et al.*, 2007]. Grad I-Tumore sind als gutartig charakterisiert und besitzen noch eine klare Abgrenzung zum restlichen Hirngewebe. Dies erklärt unter anderem die sehr gute 5-Jahres-Überlebensrate von ca. 94 % (Tabelle 1-2). Höhergradige Tumore (Grad II-IV) wachsen infiltrierend und haben in Abhängigkeit vom Differenzierungsgrad eine deutlich ungünstigere 5-Jahres-Überlebensrate. Bei Grad IV-Tumoren beträgt diese nur noch 5 % (Tabelle 1-2).

**Tabelle 1-2: WHO-Klassifizierung der Gliome, relative Häufigkeit und 5-Jahres-Überlebensrate (modifiziert nach [Kommission Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Neurologie (2014); Dolecek *et al.*, 2012])**

WHO-Grad	Tumor (Beispiele)	Relative Häufigkeit	5-Jahres-Überleben
I	pilozytisches Astrozytom	5 %	94 %
II	diffuses Astrozytom	10 %	47 %
	Oligodendrogliom	6 %	79 %
III	anaplastisches Astrozytom	6 %	26 %
	anaplastisches Oligodendrogliom	2 %	49 %
IV	Glioblastom	54 %	5 %

Die Ursachen für die Entstehung von Gliomen sind weitgehend unklar. Es gibt jedoch einige bekannte Faktoren, die das Risiko ein Gliom zu entwickeln erhöhen. Ein wesentlicher Faktor ist das Alter. Vor allem bei malignen Gliomen (Grad III und IV) steigt die Inzidenzrate mit dem Alter deutlich an. Bei anaplastischen Astrozytomen und Oligodendrogliomen (beide Grad III) liegt das mittlere Erkrankungsalter bei 54 bzw. 49 Jahren und bei Glioblastomen (Grad IV) bei 64 Jahren [Dolecek *et al.*, 2012]. Wie auch bei anderen Tumorentitäten wird ionisierende Strahlung als mögliche Ursache für die Entstehung angesehen [Bondy *et al.*, 2008]. Nur sehr selten findet man hereditäre Gliome, die beispielweise bei Patienten mit Neurofibromatose (Mutation am *NF1* oder *NF2*), Li-Fraumeni-Syndrom (Mutation am *TP53*), Turcot-Syndrom (Mutation am *APC*, *hMLH1* und *hPMS2*) oder tuberöser Sklerose (Mutation am *TSC1* oder *TSC2*) auftreten [Goodenberger und Jenkins, 2012; Houshmandi und Gutmann, 2007]. Die Früherkennung von Gliomen spielt bei der Prävention keine Rolle, da sich vor allem Glioblastome innerhalb weniger Wochen entwickeln können. Die histologische und zytologische Untersuchung des Tumors dient als Grundlage für die Prognose- und Therapieerstellung. Im Therapieverlauf wird zunächst eine möglichst komplette Resektion des Tumors angestrebt. Die Effektivität einer adjuvanten Strahlen- und/oder Chemotherapie kann durch die Verkleinerung der Tumormasse verbessert werden. Durch die kombinierte Behandlung aus Radio- und Chemotherapie mit Temozolomid konnte eine deutliche Verbesserung der 2-Jahres-Überlebensrate von Glioblastompatienten auf 26,5 % im Vergleich zu 10,4 % bei alleiniger Radiotherapie erzielt werden (Kaplan-Meier-Analyse: 95 % KI = 21,2–31,7 bzw. 95 % KI = 6,8–14,1;  $p < 0,001$ ; Log-Rank-Test) [Stupp *et al.*, 2005]. Aber auch bei Patienten mit Grad III-Gliomen lässt sich nach 10-jähriger Nachbeobachtungszeit ein signifikanter Überlebensvorteil bei kombinierter Radiochemotherapie (42,3 Monate) im Vergleich zur alleinigen Radiotherapie (30,6 Monate) erkennen (Kaplan-Meier-Analyse:  $p = 0,018$ ; Log-Rank-Test) [van den Bent *et al.*, 2013]. Es gibt bereits verschiedene molekulare Marker, mit deren Hilfe eine prognostische (therapieunabhängige) Aussage für Gliompatienten möglich ist. Dazu zählen die Hypermethylierung des Promotors der O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase, die *loss of heterozygosity* (LOH)-Mutation auf den Chromosomenarmen 1p und 19q sowie die Punktmutation (R132H) der Isocitratdehydrogenase 1

(*IDH1*) [Cairncross *et al.*, 2006; Esteller *et al.*, 2000; Yan *et al.*, 2009]. Aufgrund der sehr schlechten Überlebensraten vor allem höhergradiger Gliome, wird nach alternativen molekularen Substanzen gesucht, die zur Hemmung des Tumorwachstums eingesetzt werden können. Aber auch die Charakterisierung weiterer prognostischer und/oder prädiktiver molekularer Marker ist essentiell, um die Therapiemöglichkeiten für die Gliompatienten weiter verbessern zu können. In der vorliegenden Arbeit wurde die Bedeutung von OPN bzw. der OPN-Spleißvarianten in der Glioblastomzelllinie U251MG und in Glioblastomen als möglicher Tumormarker genauer untersucht (2.1.2 und 2.2.2).

### 1.1.3 Weichteilsarkome

Weichteilsarkome (WTS) sind eine sehr heterogene Gruppe von malignen Tumoren mesenchymalen Ursprungs. Sie betreffen vor allem Fett-, Muskel- und Bindegewebe sowie Blutgefäße und periphere Nervenzellen. In den Extremitäten treten WTS am häufigsten auf (60 %), gefolgt vom Rumpf (30 %) und dem Kopf-Hals-Bereich (10 %). Sie zählen zu den seltenen Tumoren und machen nur etwa 1 % aller Tumorerkrankungen im Erwachsenenalter aus [Fletcher *et al.*, 2002]. Die Inzidenzrate beträgt zwei bis drei Neuerkrankungen je 100.000 Einwohner pro Jahr [Bannasch *et al.*, 2011]. Es sind alle Altersgruppen betroffen, aber man findet eine deutliche Prävalenz im Kindesalter (unter 15 Jahren). Der Großteil der Betroffenen ist über 55 Jahre alt, wobei Männer häufiger betroffen sind als Frauen [Weiss und Goldblum, 2007]. WTS entstehen in der Regel als primäre Neoplasien und gehen nur sehr selten aus benignen Weichteiltumoren hervor. Eine genetische Prädisposition konnte bei WTS-Patienten nur sehr selten nachgewiesen werden. Beispielsweise findet man bei Patienten mit Li-Fraumeni-Syndrom, Morbus Recklinghausen (*NF1*-Mutation), Gardner-Syndrom (*APC*-Mutation), Werner-Syndrom (*WNR*-Mutation), tuberöse Sklerose und Basalzellnävusyndrom (*PTCH1*-Mutation) ein erhöhtes Risiko an WTS zu erkranken [Brennan *et al.*, 1997]. Es sind einige chemische Substanzen bekannt, die das Risiko einer WTS-Erkrankung deutlich erhöhen, wie z. B. Polyvinylchlorid, Arsen, Asbest und Thorotrast [Falk *et al.*, 1981; Selikoff *et al.*, 1979]. Auch eine Bestrahlung infolge einer vorangegangenen Tumorerkrankung oder eine radioaktive Exposition geht mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko einher [Riad *et al.*, 2012; Samartzis *et al.*, 2013].

Da die Patienten meist keine typischen Symptome zeigen, werden WTS oft erst sehr spät erkannt, wobei bei 20 % der Patienten zum Zeitpunkt der Diagnose bereits Metastasen (in der Lunge) vorliegen [Weiss und Goldblum, 2007]. Da die Histogenese der meisten WTS ungeklärt ist, werden die Tumoren entsprechend ihres Ausgangsgewebes histologisch klassifiziert (Tabelle 1-3). Dies spielt für die Prognoseerstellung aber keine zentrale Rolle [Coindre *et al.*, 2001]. Vielmehr stellt der Differenzierungsgrad des Tumors (Einteilung nach dem FNCLCC (*Fédération Nationale de Centres de Lutte Contre le Cancer*)-System [Trojani *et al.*, 1984]) den klinisch relevantesten Prognosefaktor dar. Die metastasenfreie 5-Jahres-Überlebensrate bei G1-Tumoren beträgt 91 %, bei G2-Tumoren 71 % und bei G3-Tumoren nur noch 44 % [Coindre *et al.*, 2001].

**Tabelle 1-3: Histologische Subtypen der WTS und deren Häufigkeit (modifiziert nach [DGHO Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie e.V. (2011)])**

histologischer Subtyp	relative Häufigkeit
Leiomyosarkome (LMS)	15-25 %
Liposarkome	10-15 %
undifferenziertes pleomorphe Sarkome (NOS, früher MFH <sup>1</sup> )	15-25 %
Synovialsarkome	3-10 %
gastrointestinale Stromatumore	3-5 %
maligne periphere Nervenscheidentumoren	3-5 %
Fibrosarkome	2-3 %
Angiosarkome	2-3 %
Rhabdomyosarkome (RMS)	~2 %
seltene Formen (z. B. endometriale Stromasarkome, alveoläre WTS)	~ 1 %

WTS: Weichteilsarkom; NOS: *not otherwise specified*, MFH: malignes fibröses Histiozytom

<sup>1</sup>Nach neuer Einteilung gehören maligne fibröse Histiozytome (MFH) nicht mehr zur Gruppe der fibrohistiozytischen Tumore. Der Begriff MFH wird nicht mehr verwendet und wurde durch den Begriff des undifferenzierten Sarkoms ersetzt [Petersen, 2013].

Die Stadieneinteilung der WTS richtet sich nach der Größe und Lage des Primärtumors, dem regionalen Lymphknotenbefall, dem Auftreten von Fernmetastasen (TNM-System) und dem Tumorgrad. Die Wahl des Therapiekonzepts wird hauptsächlich durch das Stadium des Tumors bestimmt. Die lokale Tumorkontrolle sowie die Verhinderung des Auftretens von Fernmetastasen stehen dabei im Vordergrund. Die bevorzugte Behandlungsmethode ist die operative Entfernung des Primärtumors mit einem großzügigen Resektionsrand. Bei Sarkomen in den Extremitäten soll möglichst die entsprechende Extremität ohne Funktionsverlust erhalten bleiben. Bei Tumoren mit Stadium II oder höher werden die Patienten zusätzlich mit einer Strahlen- und/oder Chemotherapie behandelt. Die Strahlentherapie kommt primär adjuvant zum Einsatz um nach der Operation verbleibende Tumorzellen abzutöten. Eine neoadjuvante Strahlentherapie wird bei (scheinbar) inoperablen WTS eingesetzt. Der Nutzen einer Chemotherapie (neoadjuvant und/oder adjuvant) ist bei WTS mit Ausnahme des Ewing- und Rhabdomyosarkoms immer noch umstritten. Obwohl 2008 in einer Metaanalyse nach einer adjuvanten Chemotherapie aus Doxorubicin und Ifosfamid eine Verlängerung des Gesamtüberlebens nachgewiesen wurde [Pervaiz *et al.*, 2008], konnte dies in einer großen EORTC (*European organisation for research and treatment of cancer*)-Studie nicht bestätigt werden [Woll *et al.*, 2012]. Eine neoadjuvante Chemotherapie wird lediglich bei lokal fortgeschrittenen hochgradigen Sarkomen (Tumorgröße  $\geq 5$  cm) empfohlen oder um eine Amputation bzw. einen Funktionsverlust nach einer alleinigen Operation zu verhindern [Bannasch *et al.*, 2011]. Weitere Therapieoptionen sind die regionale Hyperthermie in Kombination mit einer Chemotherapie, für welche bereits eine Verbesserung des Gesamtüberlebens nachgewiesen werden konnte [Issels *et al.*, 2010], oder eine isolierte Extremitätenperfusion mit TNF $\alpha$ , Melphalan oder Interferon zur

Verhinderung von Amputationen [Eggermont *et al.*, 2003]. Um den Einsatz der verschiedenen Therapiemöglichkeiten weiter verbessern zu können, ist es wichtig, prognoserelevante molekulare Marker zu identifizieren. Die mögliche Bedeutung von OPN und seinen Spleißvarianten als solche wird in Kapitel 2.2.1 beschrieben.

## 1.2 Tumorhypoxie und Bestrahlung

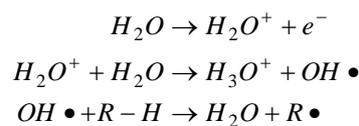
Unter Hypoxie versteht man die Sauerstoffunterversorgung von Gewebe, d. h. der Sauerstoffbedarf ist größer als der zur Verfügung stehende Sauerstoff. Während der Sauerstoffpartialdruck im Normalgewebe im Bereich von 25-60 mmHg liegt, findet man im hypoxischen Gewebe Bereiche mit einem Sauerstoffpartialdruck von 0-25 mmHg. Hypoxie tritt vor allem bei Gefäßverengungen infolge von Gefäß- und Lungenerkrankungen sowie bei soliden Tumoren auf. Es ist bekannt, dass ca. 50-60 % aller soliden Tumore hypoxische Bereiche aufweisen [Vaupel und Mayer, 2005]. Beispielsweise wurde für normales Brustgewebe ein durchschnittlicher Sauerstoffpartialdruck von 65 mmHg beschrieben, während dieser in Mammakarzinomen bei 30 mmHg lag [Vaupel *et al.*, 1991]. In Glioblastomen liegt der Sauerstoffpartialdruck durchschnittlich sogar nur bei 7,4 mmHg [Rampling *et al.*, 1994].

Ohne eine zusätzliche Sauerstoffversorgung wäre das Tumorwachstum auf eine maximale Größe von 2-3 mm<sup>3</sup> beschränkt, denn die diffusionsbedingte Sauerstoffbereitstellung kann bei größeren Tumoren nicht mehr gewährleistet werden. Man spricht dann von der sogenannten chronischen oder diffusionslimitierten Hypoxie. Die Bildung neuer Blutgefäße (Neovaskularisierung) zur Gewährleistung der Sauerstoff- und Nährstoffversorgung bietet dem Tumor die Möglichkeit für weiteres Wachstum und zur Metastasierung [Folkman, 1990; Gupta und Qin, 2003]. Um die Neovaskularisierung zu fördern, schütten Tumorzellen Angiogenesefaktoren aus, wie z. B. den vaskulären epidermalen Wachstumsfaktor (VEGF) und den Fibroblastenwachstumsfaktor (bFGF) [Gupta und Qin, 2003]. Da die Gefäßneubildung fehlerhaft ist (blinde Enden, temporäre Verschlüsse, durchlässige Basalmembran) entstehen fortlaufend hypoxische Bereiche innerhalb des Tumors [Brown und Giaccia, 1998]. Neben einer erhöhten Angiogenese gehören auch eine erhöhte genomische Instabilität, eine veränderte Gen- und Proteinregulation (z. B. hypoxieinduzierter Faktor 1 $\alpha$  (*HIF-1 $\alpha$* ), siehe 1.2.1) sowie die Selektion von apoptoseresistenten Klonen zu den Folgen einer zellulären Hypoxie [Graeber *et al.*, 1996; Reynolds *et al.*, 1996]. Für verschiedene Tumorentitäten (z. B. Mammakarzinome, WTS und Gliome) wurde zudem eine negative prognostische Bedeutung der Tumorhypoxie nachgewiesen [Nordmark *et al.*, 2001; Rundqvist und Johnson, 2013; Vaupel *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2012a].

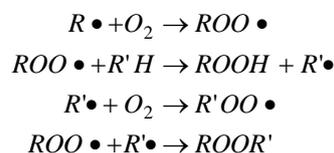
Darüber hinaus ist die Effektivität einer Radio- bzw. Chemotherapie in hypoxischen Tumorbereichen deutlich reduziert [Hockel und Vaupel, 2001; Overgaard, 2007]. Die Ursache für die verminderte Wirksamkeit von Chemotherapeutika ist zum einen in der zu großen Distanz der hypoxischen Zellen vom nächst gelegenen Blutgefäß begründet. Dadurch ist die Konzentration der Chemotherapeutika in den hypoxischen Zellen im Vergleich zu gut oxygenierten Zellen deutlich herabgesetzt. Zum anderen

richten sich Chemotherapeutika in erster Linie gegen schnell proliferierende Zellen. Die Teilungsrate hypoxischer Tumorzellen ist jedoch deutlich reduziert [Brown und Giaccia, 1998]. Die Strahlenresistenz hypoxischer Zellen ist auf die Abwesenheit von Sauerstoff zurückzuführen, da dieser unter anderem die zytotoxische Wirkung der Bestrahlung vermittelt [Gray *et al.*, 1953]. Locker ionisierende Strahlung (z. B. Röntgenstrahlung) wirkt zu ca. einem Drittel direkt, während zwei Drittel der Schäden durch indirekte Strahleneffekte hervorgerufen werden. Die direkte Strahlenwirkung beruht auf der direkten Ionisierung der DNA durch freie Elektronen wodurch DNA-Einzel- und Doppelstrangbrüche sowie Basenschäden initiiert werden. Bei der indirekten Strahlenwirkung interagieren freie Elektronen zunächst mit anderen Molekülen (z. B. Wasser). Dabei werden Radikale gebildet, die ihrerseits wiederum in der Lage sind Biomoleküle wie die DNA zu schädigen. Da die menschlichen Zellen zu ca. 80 % aus Wasser bestehen, stellt die Radiolyse des Wassers die Hauptquelle der Radikalbildung dar (Abbildung 1-2). Die daraus entstandenen hoch reaktiven Hydroxylradikale ( $\text{OH}\bullet$ ) schädigen die DNA indirekt und es entstehen Bioradikale (z. B. der DNA:  $\text{R}\bullet$ ). In Anwesenheit von Sauerstoff reagiert dieser mit den freien Radikalen oder den Bioradikalen ( $\text{R}\bullet$ ) und es entstehen Peroxidradikale. Dadurch wird eine stabile Veränderung der chemischen Struktur der DNA erzielt, d. h. der DNA-Schaden ist chemisch fixiert und kann nur schwer repariert werden. Ist kein Sauerstoff vorhanden, sind die reaktiven Bioradikale langlebiger und werden von Thiolen ( $\text{RSH}$ ) reduziert. Nach dieser Theorie kann der DNA-Schaden „chemisch repariert“ werden, d. h. die Anzahl der Strangbrüche wird somit reduziert und die „chemisch reparierte“ DNA ist somit für biochemische Reparaturmechanismen durch spezifische Enzyme besser zugänglich [von Sonntag, 2006].

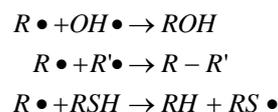
(1) Radiolyse des Wassers (Bsp.:  $\text{R}=\text{DNA}$ )



(2) Folgereaktionen unter normoxischen Bedingungen (Bsp.)



(3) Folgereaktionen unter hypoxischen Bedingungen (Bsp.)



**Abbildung 1-2: Indirekter Strahleneffekt**

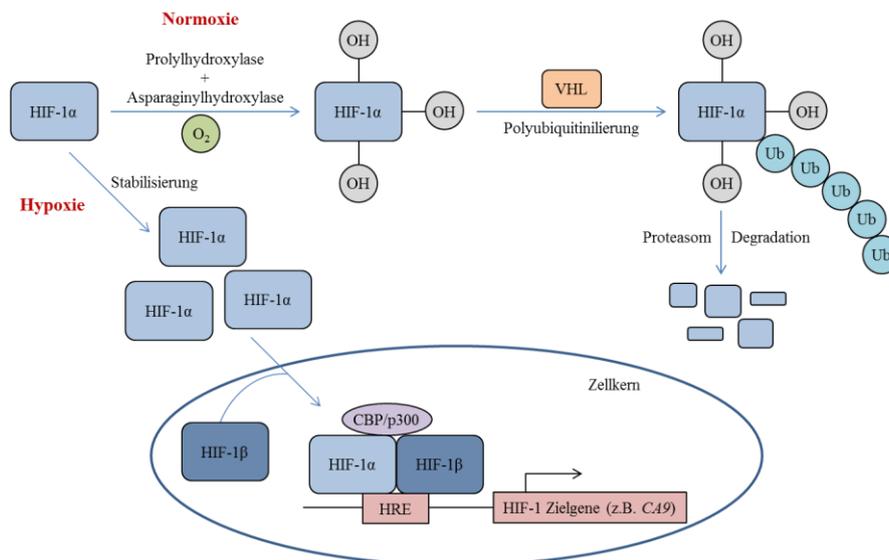
Radiolyse des Wassers (1) und Folgereaktionen unter normoxischen (2) und hypoxischen Bedingungen (3) (modifiziert nach [Hall und Giaccia, 2006; Richter und Feyerabend, 2002; von Sonntag, 2006])

Dies gilt als allgemein akzeptierte Erklärung des sogenannten Sauerstoffeffekts, der die reduzierte Strahlenwirkung unter hypoxischen im Vergleich zu normoxischen Bedingungen beschreibt. Die sogenannte *oxygen enhancement ratio* (OER) gibt an, dass unter hypoxischen Bedingungen die zwei- bis dreifache Strahlendosis im Vergleich zu normoxischen Bedingungen aufgewendet werden muss, um den gleichen toxischen Effekt zu erzielen [Gray *et al.*, 1953]. Es gibt bereits einige praxisrelevante Methoden zur gezielten Therapie von hypoxischen Tumoren. Dazu zählt die sogenannte ARCON (*accelerated radiotherapy with carbogen and nicotinamide*)-Therapie, bei der durch die zusätzliche Gabe von Carbogen (Gasgemisch aus 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % O<sub>2</sub>) und Nicotinamid die diffusions- bzw. perfusionsbedingte Hypoxie reduziert werden soll [Kaanders *et al.*, 2002]. Außerdem werden sogenannte Hypoxieradiosensibilisatoren eingesetzt. Dies sind Substanzen (z. B. Tirapazamin, AQ4N), die ihre toxische Wirkung erst im hypoxischen Milieu entfalten und somit zur selektiven Abtötung von hypoxischen Tumorzellen führen und damit auch die Wirksamkeit der Bestrahlung verbessern [Brown und Wilson, 2004; Marcu und Olver, 2006]. Damit Patienten von einer hypoxiegerichteten Therapie profitieren können, ist es wichtig hypoxische Tumoren zu identifizieren und zu quantifizieren. Die Bestimmung des intratumoralen Sauerstoffpartialdrucks kann entweder direkt mit Hilfe einer Feinnadelektrode erfolgen [Nordsmark *et al.*, 1994] oder indirekt durch Injektion von sogenannten exogenen Hypoxiemarkern, wie Pimonidazol oder Misonidazol, die sich selektiv in hypoxischen Zellen anreichern. Sind diese Substanzen radioaktiv markiert (z. B. <sup>18</sup>F-FMISO), ist es möglich über bildgebende Verfahren wie Positronenemissionstomographie die hypoxischen Bereiche im Tumor des Patienten nicht-invasiv zu lokalisieren und zu quantifizieren. Die immunhistochemische Quantifizierung endogener Hypoxiemarker wie z. B. HIF-1 $\alpha$ , Carboanhydrase IX (CA IX), VEGF und GLUT1, also Proteinen, deren Expression bei Sauerstoffmangel verstärkt wird, stellt eine weitere Möglichkeit zur Detektion hypoxischer Tumoreareale dar [Bussink *et al.*, 2003; Vordermark und Brown, 2003].

### 1.2.1 HIF-1 $\alpha$ und andere hypoxieregulierte Proteine

Ein wichtiges Merkmal der Tumorzellen zur Anpassung an Hypoxie ist eine veränderte Genexpression und -regulation, bei der die Familie der hypoxieinduzierten Faktoren (HIF) eine zentrale Rolle spielt. Der wichtigste Vertreter HIF-1 besteht aus der sauerstoffabhängigen Untereinheit HIF-1 $\alpha$  und der konstitutiv exprimierten Untereinheit HIF-1 $\beta$ . Bei Sauerstoffanwesenheit (Normoxie) wird HIF-1 $\alpha$  durch die Prolyl-4-hydroxylase hydroxyliert. Dies ermöglicht die Bindung des von-Hippel-Landau Proteins, einer Komponente des Ubiquitin-E3-Ligase-Komplexes. Infolgedessen kommt es zur kovalenten Bindung von Ubiquitin an HIF-1 $\alpha$ , wodurch dieses für den Abbau im 26S-Proteasom markiert wird (Abbildung 1-3). Die Halbwertszeit von HIF-1 $\alpha$  beträgt unter normoxischen Bedingungen lediglich fünf bis acht Minuten [Moroz *et al.*, 2009]. Zusätzlich kommt es unter normoxischen Bedingungen zur Hydroxylierung eines Asparaginrestes durch die Asparaginyhydroxylase FIH (*factor inhibiting HIF-1*), welche die Bindung der Transkriptionskoaktivatoren CBP/p300 (*CREB-binding protein*) an HIF-1 $\alpha$  verhindert und somit die

transkriptionelle Aktivität inhibiert. Bei Sauerstoffmangel (Hypoxie) wird HIF-1 $\alpha$  durch die fehlenden Hydroxylierungen stabilisiert und transkriptionell aktiv. Das stabilisierte HIF-1 $\alpha$  wird in den Zellkern importiert, wo die Bindung an die konstitutiv exprimierte Untereinheit HIF-1 $\beta$  erfolgt. Das Heterodimer bindet über eine Erkennungssequenz an die HREs (*hypoxia response elements*) der Zielgene und nach erfolgreicher Interaktion der Koaktivatoren CBP/p300 mit HIF-1 $\alpha$  wird die transkriptionelle Aktivität initiiert (Abbildung 1-3) [Brahimi-Horn und Pouyssegur, 2006; Patiar und Harris, 2006]. HIF-1 $\alpha$  reguliert auf diese Weise die Expression von ca. 2 % aller Gene des menschlichen Genoms [Manalo *et al.*, 2005]. Es beeinflusst über die Induktion spezifischer Zielgene zentrale Prozesse in der Zelle, wie den Energiestoffwechsel/Glykolyse (*GLUT1* und *HK2*, *hexokinase 2*), die Angiogenese (*VEGFA*), Zellproliferation (*IGF2*, *insulin-like growth factor 2*), Apoptose (*TP53*) und die pH-Regulation (*CA9*) [An *et al.*, 1998; Carmeliet *et al.*, 1998; Ebert *et al.*, 1996; Feldser *et al.*, 1999; Forsythe *et al.*, 1996; Wykoff *et al.*, 2000].

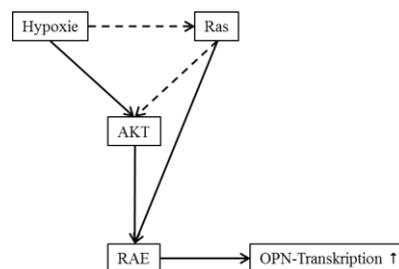


**Abbildung 1-3: Sauerstoffabhängige Regulation der Stabilität des HIF-1 (modifiziert nach [Carroll und Ashcroft, 2005; Nizet und Johnson, 2009])**

Bei Sauerstoffanwesenheit wird HIF-1 $\alpha$  destabilisiert und durch das Proteasom abgebaut. Unter hypoxischen Bedingungen kommt es zur Stabilisierung des HIF-1 $\alpha$  Proteins. Es wird in den Zellkern importiert und bildet mit der konstitutiv exprimierten Untereinheit HIF-1 $\beta$  ein Heterodimer. Durch die Bindung der Koaktivatoren CBP/p300 wird das Heterodimer transkriptionell aktiv und induziert die Transkription der Zielgene.

Die Carboanhydrase IX (CA IX) gehört zur Enzymfamilie der  $\alpha$ -Carboanhydrasen. Zu den Hauptaufgaben im menschlichen Organismus zählen die Regulation und Aufrechterhaltung des pH-Wertes und des Säure-Base-Haushalts der Zellen. Wykoff und Mitarbeiter (2000) konnten in VHL-Wildtyp-Zelllinien eine hypoxieabhängige CA9-Expression nachweisen, während CA9 in VHL-defizienten Zelllinien konstitutiv und hypoxieunabhängig exprimiert wurde [Wykoff *et al.*, 2000]. Die Regulation der hypoxieabhängigen Expression wird durch ein HIF-reguliertes HRE (*hypoxia response element*) in der Promotorregion des CA9 realisiert [Wykoff *et al.*, 2000]. Durch immunhistochemische

Färbungen konnte in zahlreichen Tumoren (Nierenzell-, Speiseröhren-, nicht-kleinzellige Bronchial-, Kolorektal- und Mammakarzinome) bereits ein erhöhter CA IX-Proteingehalt nachgewiesen werden [Chia *et al.*, 2001; Liao *et al.*, 1997; Saarnio *et al.*, 1998; Turner *et al.*, 1997; Vermeylen *et al.*, 1999]. CA IX ist zudem in HT 1080- und FaDu-Zellen, aber auch bei invasiven Mammakarzinomen, als Hypoxiemarker beschrieben [Chia *et al.*, 2001; Vordermark *et al.*, 2005]. Neben den nachweislich hypoxieregulierten Proteinen HIF-1 $\alpha$ , CA IX und GLUT1 [Vordermark und Brown, 2003], wird auch das extrazelluläre Matrixprotein OPN als potentieller Hypoxiemarker diskutiert [Bache *et al.*, 2008]. Sodhi und Mitarbeiter (2000, 2001) zeigten in ersten Untersuchungen an Mesangiumzellen und vaskulären Muskelzellen der Ratte, dass der mRNA- und Proteingehalt von OPN bei niedrigen Sauerstoffkonzentrationen ansteigt [Sodhi *et al.*, 2000; Sodhi *et al.*, 2001a; Sodhi *et al.*, 2001b]. 2003 konnten auch erste *in vivo*-Analysen an Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren einen Zusammenhang zwischen Hypoxie und OPN nachweisen. Die OPN-Plasmaspiegel der Patienten zeigten eine signifikant inverse Korrelation mit dem Sauerstoffpartialdruck im Tumor [Le *et al.*, 2003]. Immunhistochemische Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe bestätigen diese Beobachtungen. Bei Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren wurde eine deutliche Korrelation zwischen einem erhöhten OPN-Proteingehalt im Tumor und einem niedrigen Hämoglobingehalt im Blut bzw. einem erhöhten HIF-1 $\alpha$ -Proteingehalt im Tumor nachgewiesen [Bache *et al.*, 2006]. Bei Strukturuntersuchungen der murinen *Opn*-Promotorregion wurde eine sogenannte RAE-Sequenz (*ras-activated enhancer*) identifiziert, deren Aktivierung in NIH-3T3-Zellen essentiell für die hypoxieregulierte Induktion von OPN ist. In Abwesenheit von Sauerstoff werden Ras und die Akt Kinase aktiviert. Infolgedessen bindet ein noch unbekannter Transkriptionsfaktor an die RAE-Sequenz im *Opn*-Promotor und induziert somit die Transkription von *Opn* (Abbildung 1-4) [Zhu *et al.*, 2005].



**Abbildung 1-4: Postulierter Mechanismus der hypoxieabhängigen Regulation der OPN-Expression (modifiziert nach [Zhu *et al.*, 2005])**

Aber auch *in vivo* zeigte sich bei Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren, dass OPN und Tumorphoxie im Zusammenhang stehen. Patienten mit einem erhöhten OPN-Plasmaspiegel zeigten ein deutlich schlechteres Überleben nach Bestrahlung im Vergleich zu Patienten mit einem niedrigen OPN-Plasmaspiegel (univariate Cox-Regression: RR = 1,9; 95 % KI = 1,2-3,0; p = 0,0002). Durch die Gabe des Hypoxieradiosensibilisators Nimorazol konnte die Prognose der Patienten mit einem hohen OPN-Plasmaspiegel deutlich verbessert werden (univariate Cox-Regression: RR = 4,0; 95 %

KI = 1,7-9,1;  $p = 0,01$ ) [Overgaard *et al.*, 2005]. Dies deutet darauf hin, dass durch die Bestimmung des OPN-Plasmaspiegels eine Aussage über mögliche hypoxische Bereiche im Tumor getroffen werden kann. Daraus resultierend könnte durch die Reduktion der Tumorphoxie bei den betroffenen Patienten eine deutliche Verbesserung der Wirksamkeit der Strahlentherapie und somit der Prognose erreicht werden. Aus diesem Grund wurde die Bedeutung von OPN als Hypoxiemarker, vor allem im Zusammenhang mit Bestrahlung, näher untersucht.

### 1.3 Das extrazelluläre Matrixprotein Osteopontin

Osteopontin ist ein sezerniertes Phosphoglykoprotein, das erstmals 1979 von Senger bei der Untersuchung sezernierter Proteine maligner transformierter Epithelzellen entdeckt und beschrieben wurde [Senger *et al.*, 1979].

#### 1.3.1 Struktur

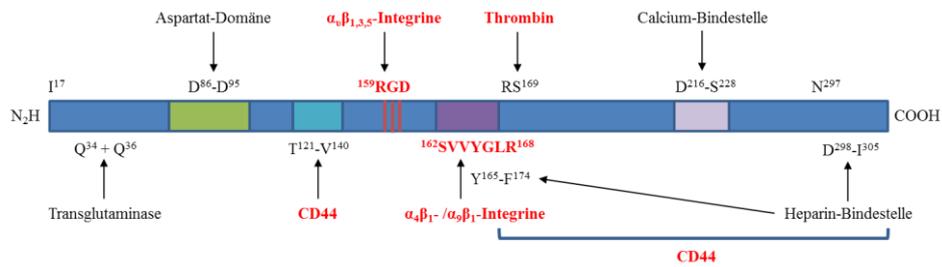
Die cDNA des OPN weist bei verschiedenen Säugetierarten (Schwein, Kuh, Kaninchen, Maus und Mensch) einen hohen Anteil an Sequenzhomologien auf. Das Gen *SPP1* (*secreted phosphoprotein 1*, im Folgenden bezeichnet als *OPN*), welches für OPN codiert, liegt auf Chromosom 4 (4q21–4q25). Nach aktuellem Stand enthält *OPN* acht Exone, wobei durch posttranskriptionelles Spleißen fünf verschiedene Varianten entstehen (*OPN-a* – *OPN-e*). *OPN-e* ist die längste Isoform und enthält als einzige Variante Exon 4. Dort befindet sich auch das alternative Startcodon. Die kodierende Sequenz liegt somit im Bereich von Exon 4 bis Exon 8 (984 bp). Da allen anderen Varianten (*OPN-a* – *OPN-d*) Exon 4 (inkl. vorgelagertem Stoppcodon) fehlt, befindet sich das Startcodon dieser vier Varianten in Exon 2. Außerdem fehlt *OPN-b* zusätzlich Exon 6, *OPN-c* Exon 5 und *OPN-d* Exon 5 und Exon 6. Es entstehen also vier verkürzte Proteine mit einem im Vergleich zu *OPN-e* veränderten N-Terminus (Tabelle 1-4). Zum Zeitpunkt der Datenerfassung waren lediglich die Varianten *OPN-a*, *OPN-b* und *OPN-c* bekannt [Saitoh *et al.*, 1995], sodass die Untersuchungen nur die drei genannten Varianten einschließen und die beiden Varianten *OPN-d* und *OPN-e* nicht untersucht wurden.

**Tabelle 1-4: Übersicht der OPN-Spleißvarianten (modifiziert nach [Lin *et al.*, 2015])**

Isoform	Exon 1-3	Exon 4	Exon 5	Exon 6	Exon 7+8	CDS (bp)	Protein (AS)
<i>OPN-a</i>	1	-	1	1	1	945 (NM_001040058.1)	314 (NP_001035147.1)
<i>OPN-b</i>	1	-	1	-	1	903 (NM_000582.2)	300 (NP_000573.1)
<i>OPN-c</i>	1	-	-	1	1	864 (NM_001040060.1)	287 (NP_001035149.1)
<i>OPN-d</i>	1	-	-	-	1	822 (NM_001251829.1)	273 (NP_001238758.1)
<i>OPN-e</i>	1	1	1	1	1	984 (NM_001251830.1)	327 (NP_001238759.1)

OPN: Osteopontin; CDS: *coding DNA sequence*, bp: Basenpaare, AS: Aminosäure

Aufgrund zahlreicher posttranslationaler Modifikationen variiert das Molekulargewicht des OPN zwischen 44 und 75 kDa [Denhardt und Guo, 1993]. Neben einigen N- bzw. O-Glykosylierungen sind auch zahlreiche Phosphorylierungen an den Aminosäuren Serin und Threonin sowie Sulfatierungen bekannt [Christensen *et al.*, 2005]. OPN besitzt eine hochkonservierte Glycin-Arginin-Glycin-Aspartat-Serin-Sequenz (GRGDS- oder RGD-Sequenz) [Oldberg *et al.*, 1986], welche die Bindung an  $\alpha_v\beta_3$ -,  $\alpha_v\beta_1$ -,  $\alpha_v\beta_5$ -, und  $\alpha_5\beta_1$ -Integrine vermittelt (Abbildung 1-5). Diese Sequenz findet man auch bei anderen extrazellulären Matrixproteinen, wie z. B. Fibronectin, Vitronectin und Kollagen. Außerdem besitzt OPN eine Transglutaminasedomäne, eine putative Calcium- und zwei Heparinbindestellen sowie eine Thrombinschnittstelle (RS-Sequenz). Transglutaminase ist in der Lage OPN mit sich selbst zu Polymeren zu verknüpfen, welche eine erhöhte Zellmigration sowie eine verstärkte Zell- und Fokaladhäsion induzieren [Higashikawa *et al.*, 2007]. Thrombin hingegen schneidet OPN sechs Aminosäuren von der RGD-Sequenz entfernt, wobei zwei etwa gleich lange Produkte entstehen. Die Aktivität der OPN-Fragmente ist im Vergleich zum ungeschnittenen OPN erhöht und führt zu einer gesteigerten Zelladhäsion [Senger *et al.*, 1994]. Außerdem wird durch diese proteolytische Spaltung eine Bindestelle für  $\alpha_4\beta_1$ - und  $\alpha_9\beta_1$ -Integrine (SVVYGLR-Sequenz) aktiviert [Yokosaki *et al.*, 1999]. OPN ist aber auch ein Ligand für diverse Isoformen des ebenfalls membranständigen CD44-Rezeptors. Es ist allerdings noch nicht bekannt, welche Domäne diese Bindung vermittelt [Katagiri *et al.*, 1999].

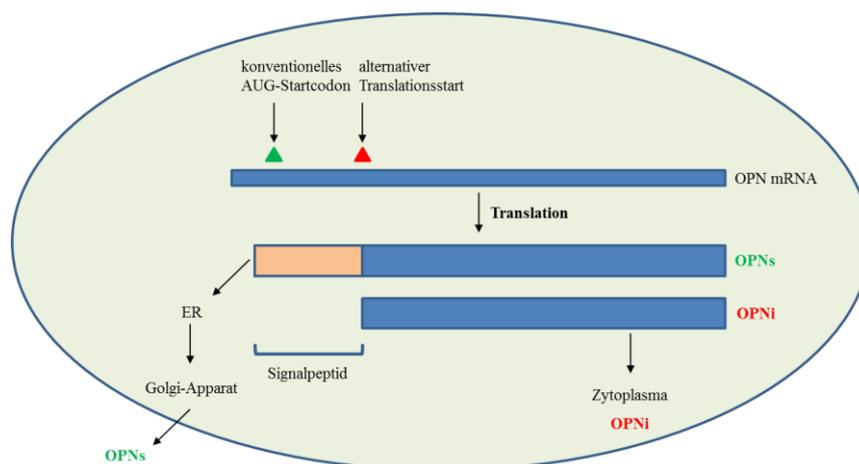


**Abbildung 1-5: Schematische Struktur des OPN (modifiziert nach [Buback *et al.*, 2009])**

OPN besitzt verschiedene, z. T. hochkonservierte, funktionelle Domänen, wie z. B. die RGD-Domäne (die Bindestelle für  $\alpha_0\beta_{1,3,5}$ -Integrine), CD44-Bindedomänen, die RS-Sequenz (Thrombinschnittstelle), eine Transglutaminase-Domäne und eine Calcium- sowie zwei Heparinbindestellen.

### 1.3.2 Lokalisation

Die Hauptfunktionen des OPN werden durch seine umfassend beschriebene extrazelluläre Form (OPNs) und deren Interaktionen mit membranständigen Integrin- und CD44-Rezeptoren vermittelt. Daneben existiert auch eine intrazelluläre Form des OPN (OPNi) [Zohar *et al.*, 1997; Zohar *et al.*, 2000]. Für Makrophagen und dendritische Zellen, die für die zelluläre Immunantwort eine wichtige Rolle spielen, ist die Bedeutung des intrazellulären OPN gut untersucht. In stark migrierenden Zellen konnte eine Kollokalisierung von OPNi und CD44 sowie eine Beteiligung des OPNi an dem Hyaluronan-CD44-ERM-Komplex (Ezrin, Radixin, und Moesin) nachgewiesen werden. Dieser ist bei der Migration von embryonalen Fibroblasten, aktivierten Makrophagen und metastatischen Zellen von Bedeutung [Zhu *et al.*, 2004; Zohar *et al.*, 2000]. Die Migration und Resorption der Osteoklasten wird ebenfalls durch die Kollokalisierung von OPNi und CD44 beeinflusst [Suzuki *et al.*, 2002].



**Abbildung 1-6: Entstehung von OPNs und OPNi (modifiziert nach [Buback *et al.*, 2009])**

Bei der konventionellen Translation entsteht OPNs, welches ein Signalpeptid enthält und in die extrazelluläre Matrix sezerniert wird. Das verkürzte OPNi (ohne Signalpeptid) entsteht hingegen durch die alternative Translation und verbleibt im Zytoplasma.

OPNs und OPNi entstehen aus einer gemeinsamen maternalen mRNA durch alternative Translation (Abbildung 1-6). Diese mRNA enthält neben dem konventionellen AUG-Startcodon *downstream* noch eine zweite AUG-unabhängige Sequenz zur Translationsinitiation [Shinohara *et al.*, 2008]. Bei der konventionellen Translation entsteht OPNs. Dieses enthält ein 16 Aminosäuren langes Signalpeptid, welches für die Lokalisation an den Golgi-Apparat verantwortlich ist und den Abtransport von OPNs über Vesikel aus der Zelle in die extrazelluläre Matrix (EZM) vermittelt. OPNi entsteht als verkürztes Produkt der alternativen Translation, welchem die Signalsequenz fehlt und somit im Zytoplasma der Zelle verbleibt [Shinohara *et al.*, 2008].

### 1.3.3 Physiologische Funktionen des Osteopontins

Als extrazelluläres Matrixprotein fungiert OPN als Bindeglied zwischen den Knochenzellen und der Knochenmatrix und ist sowohl an der Regulation der Knochenmineralisation als auch der Knochenresorption beteiligt. OPN ist in der Lage Hydroxylapatit, die anorganische Komponente der Knochenmatrix, zu binden und so die Bildung von Hydroxylapatitkristallen zu inhibieren. Die funktionellen OPN-Bindedomänen für  $\alpha_v\beta_3$ -Integrine und CD44-Rezeptoren sind maßgeblich an der Interaktion zwischen OPN und den Osteoklasten beteiligt. Durch einen autokrinen Mechanismus ist extrazelluläres OPN in der Lage die Migration der Osteoklasten zu regulieren [Chellaiah und Hruska, 2003]. Aber auch intrazelluläres OPN scheint die Osteoklastenbeweglichkeit und Knochenresorption zu beeinflussen [Suzuki *et al.*, 2002].

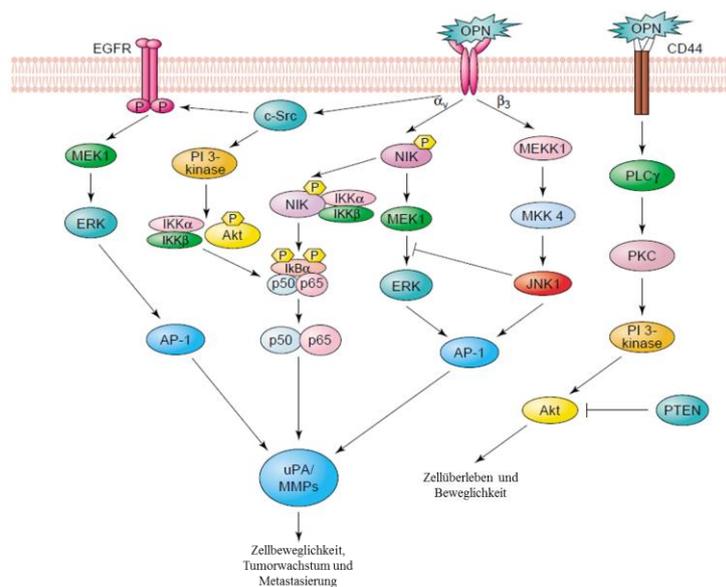
Neben den Knochenzellen sind auch renale Epithelzellen in der Lage OPN zu bilden und in den Urin zu sezernieren (Uropontin) [Shiraga *et al.*, 1992]. Durch die Bindung von Calciumionen ( $\text{Ca}^{2+}$ ) (Abbildung 1-5) wirkt OPN protektiv gegen die Bildung von Nierensteinen, indem es die Kristallisation (Nukleation, Wachstum und Aggregation) von Calciumoxalat, einer der Hauptkomponenten von Nierensteinen, verhindert [Shiraga *et al.*, 1992]. Die OPN-Konzentration im Urin von gesunden Menschen ist ausreichend hoch, um das Wachstum und die Aggregation von Calciumoxalatkristallen zu verhindern [Asplin *et al.*, 1998; Min *et al.*, 1998]. Die Tatsache, dass im Urin von Patienten mit Nierensteinen signifikant niedrigere OPN-Konzentrationen gemessen wurden als bei gesunden Probanden [Nishio *et al.*, 1999; Nishio *et al.*, 2000], bestätigt die Bedeutung von OPN für renale Kristallisationsprozesse.

OPN wird auch von immunologischen Zellen, wie z. B. T-Zellen, B-Zellen, Makrophagen und natürlichen Killerzellen gebildet und ist für immunologische Prozesse ebenfalls von immenser Bedeutung [O'Regan und Berman, 2000]. Infolge von Entzündungen und Infektionen (z. B. durch Arteriosklerose oder Mykobakterien) ist der mRNA- und Proteingehalt von OPN nachweislich erhöht, wodurch sowohl die Adhäsion als auch die Migration von Makrophagen und T-Lymphozyten zu den Entzündungsherden gefördert wird (Übersicht in [O'Regan und Berman, 2000]). Während der T-Zellaktivierung konnte eine Kostimulation der T-Zellproliferation durch OPN beobachtet werden [O'Regan *et al.*, 1999]. Außerdem induziert die OPN-Stimulation in T-Zellen und Makrophagen RDG-abhängig die Bildung von Th1-Zytokinen ( $\text{IFN}\gamma$ ,  $\text{TNF}\alpha$ , IL-12), hemmt aber RGD-unabhängig

über CD44-Rezeptoren die Bildung von Th2-Zytokinen (IL-4, IL-10) [Ashkar *et al.*, 2000]. OPN kann aber nicht nur als proinflammatorisches Zytokin, sondern auch antiinflammatorisch wirken. OPN ist nämlich in der Lage die induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) in Makrophagen zu inhibieren [Rollo *et al.*, 1996]. Die NO-vermittelte Gewebsschädigung wird durch einen negativen Rückkopplungsmechanismus limitiert, da OPN durch NO verstärkt wird [Guo *et al.*, 2001; Takahashi *et al.*, 2000].

### 1.3.4 OPN-Signalwege und deren Bedeutung für die Tumorprogression

OPN ist als extrazelluläres Matrixprotein in der Lage über Rezeptorbindung zahlreiche Signalkaskaden in der Zelle zu aktivieren, wodurch verschiedene Prozesse wie Zellwachstum, Differenzierung, Apoptose, Zellbeweglichkeit und Invasion reguliert werden. Dadurch manipuliert OPN die Tumorprogression und Metastasierung und beeinflusst somit die Prognose der Patienten [Weber *et al.*, 2010]. Diese Prozesse können zum einen RGD-abhängig über  $\alpha_v\beta_3$ -Integrine oder RGD-unabhängig über CD44-Rezeptoren vermittelt werden (1.3.1).



**Abbildung 1-7: OPN-regulierte Signalwege (modifiziert nach [Rangaswami *et al.*, 2006])**

Durch Bindung des OPN an membranständige Integrine oder CD44-Rezeptoren können verschiedene Prozesse der Tumorprogression und Metastasierung reguliert werden.

Der Schutz vor Apoptose und eine verstärkte Zellproliferation sind initiale Prozesse der Tumorprogression, die durch OPN nachweislich beeinflusst werden. Sowohl lösliches als auch immobilisiertes OPN ist in der Lage Epithelzellen vor stressinduzierter Apoptose, hervorgerufen durch Serumangel oder TRAIL (*tumour necrosis factor related apoptosis inducing ligand*), zu schützen [Pritzker *et al.*, 2004; Scatena *et al.*, 1998]. Immobilisiertes OPN vermittelt seine antiapoptotische Wirkung durch die Bindung an  $\alpha_v\beta_3$ -Integrine über den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B (*nuclear factor kappa B*), lösliches OPN dagegen über das proapoptotische Protein Bcl-x1 [Khan *et al.*, 2002; Scatena

*et al.*, 1998]. Aber auch durch die Interaktion mit CD44-Rezeptoren und die nachfolgende Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges (Phosphoinositid-3-Kinase/Akt-Signalweg) vermittelt OPN einen Schutz vor Apoptose (Abbildung 1-7) [Lin und Yang-Yen, 2001]. Weiterhin kommt es durch die Interaktion von OPN mit Integrinrezeptoren zur Aktivierung der Kinase c-Src (*cellular sarcoma*) (Abbildung 1-7). Diese phosphoryliert und transaktiviert EGFR (*epidermal growth factor receptor*). Infolgedessen erfolgt die Aktivierung verschiedener EGFR-Signalwege, wie z. B. PI3K/Akt-, Ras-MAP-Kinase-, PLC- (Phospholipase-C) und PKC-Signalweg (Proteinkinase C) [Das *et al.*, 2004; Tuck *et al.*, 2003]. Angelucci und Mitarbeiter (2004) beobachteten in diesem Zusammenhang eine Verstärkung der wachstumsfördernden Wirkung des EGF (*epidermal growth factor*) durch OPN [Angelucci *et al.*, 2004].

Damit die Tumorzellen in das umliegende Gewebe infiltrieren können, ist es zunächst notwendig die extrazelluläre Matrix proteolytisch abzubauen. Exogenes OPN führt in Mammakarzinomzellen zu einer erhöhten Migration und Invasion der Zellen. Gleichzeitig ist ein erhöhter mRNA-Gehalt der Protease *uPA* (Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator) sowie eine erhöhte *uPA*-Enzymaktivität nachweisbar [Tuck *et al.*, 1999]. OPN aktiviert durch die Interaktion mit  $\alpha_0\beta_3$ -Integrinen den c-Src/EGFR/ERK-Signalweg, welcher zur Aktivatorprotein 1-vermittelten *uPA*-Sekretion führt (Abbildung 1-7) [Das *et al.*, 2004]. Aber auch die EZM-degradierenden MMPs (Matrixmetalloprotease) können durch OPN aktiviert werden. Die Stimulation der MMP-2 erfolgt über den NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B $\alpha$ /IKK-Signalweg in Abhängigkeit von der PI3K/Akt-Aktivität [Philip und Kundu, 2003]. Die Aktivierung von MMP-9 ist hingegen von der *uPA*-Aktivität abhängig, welche durch NIK (*NF- $\kappa$ B-inducing kinase*) vermittelt und ebenfalls über den NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B $\alpha$ /IKK-Signalweg reguliert wird (Abbildung 1-7) [Rangaswami *et al.*, 2004].

Ein weiterer wichtiger Schritt für die Metastasierung ist die Migration der Tumorzellen durch die extrazelluläre Matrix. OPN wirkt in diesem Prozess als Chemoattraktant. Diese Funktion des OPN wurde bereits für die Migration von Makrophagen, T-Zellen, Epithelzellen, glatten Muskelzellen und Tumorzellen beschrieben (Übersicht in [Standal *et al.*, 2004]). Neben einer erhöhten Empfindlichkeit gegenüber OPN zeigen Tumorzellen oft eine verstärkte Bildung von Integrinen, die wachstums- oder migrationsfördernde Signalwege aktivieren [Guo und Giancotti, 2004]. Hierbei vermitteln vor allem  $\alpha_0\beta_3$ -Integrine eine verstärkte Migration maligner Zellen. Die OPN-vermittelte Migration kann zusätzlich durch die Wachstumsfaktoren EGF und HGF (*hepatocyte growth factor*) sowie deren Rezeptoren EGFR bzw. c-Met reguliert werden [Tuck *et al.*, 2000].

Außerdem sind verschiedene OPN-regulierte Mechanismen bekannt, die Tumorzellen entwickelt haben, um sich vor dem Angriff durch die Immunabwehr zu schützen [Denhardt und Chambers, 1994]. In murinen Makrophagenzellen kommt es durch OPN-Stimulation zu einer deutlichen Reduktion der Cytochrom C Oxidase- bzw. iNOS-Aktivität [Gao *et al.*, 2003; Guo *et al.*, 2001]. Kokulturversuche mit kolorektalen Tumorzellen und Makrophagen zeigen, dass eine Reduktion der *OPN*-Genexpression in den Tumorzellen zu einer gesteigerten NO-Produktion in Makrophagen führt. Infolgedessen kommt

es zu einer Hemmung der Tumorzellproliferation sowie einer erhöhten Apoptoserate [Wai *et al.*, 2006]. OPN ist durch die Hemmung der iNOS in der Lage das Überleben der Tumorzellen im lokalen Tumormikromilieu deutlich zu verbessern. Darüber hinaus kann OPN den Komplementfaktor H binden und damit den Komplement-vermittelten Zelltod und die Opsonierung der Tumorzellen inhibieren [Fedarko *et al.*, 2000].

Die Neovaskularisierung gewinnt mit zunehmender TumorgroÙe aufgrund der diffusionslimitierten Sauerstoff- und Nährstoffversorgung des Tumors an Bedeutung und ist für die Aufrechterhaltung des Tumorwachstums essentiell. Verschiedene proangiogenetische Faktoren, wie z. B. VEGF werden während der Tumorprogression verstärkt gebildet [Folkman, 2002]. VEGF stimuliert in Endothelzellen die Expression von *OPN* sowie *ITGAV* und *ITGB3* (Integrin  $\alpha_v$  und  $\beta_3$ ). Durch die verstärkte Bindung von OPN an  $\alpha_v\beta_3$ -Integrine wird die Migration der Zellen gesteigert und die Apoptose inhibiert [Khan *et al.*, 2002; Scatena *et al.*, 1998; Senger *et al.*, 1996].

### 1.3.5 OPN als prognostischer Marker und therapeutisches Zielprotein

In zahlreichen Studien konnte die Bedeutung von OPN für verschiedene tumorrelevante Prozesse nachgewiesen werden (1.3.4). Aber auch *in vivo* zeigte sich bei der Untersuchung von Patienten mit Bronchial-, Mamma-, Prostata-, Kopf-Hals- und Leberkarzinomen ein deutlicher Zusammenhang zwischen einem erhöhten mRNA- und Proteingehalt von OPN und einer schlechten Prognose sowie einem erhöhten Metastasierungspotenzial [Rittling und Chambers, 2004; Shevde *et al.*, 2010; Wai und Kuo, 2008; Weber *et al.*, 2010]. Nachdem eine Pilotstudie an lymphknotennegativen Mammakarzinomen einen erhöhten OPN-Proteingehalt im Tumor (Immunhistochemie, IHC) als unabhängigen Prognosefaktor beschrieben hat (multivariate Cox-Regression: RR = 2,97; p = 0,014) [Tuck *et al.*, 1998], wurde dies durch eine weitere Studie an Mammakarzinompatienten bestätigt (multivariate Cox-Regression: RR = 12,9; 95 % KI = 5,6-30,0; p < 0,0001) [Rudland *et al.*, 2002]. Nach einer Nachbeobachtungszeit von 19 Jahren waren noch 94 % der OPN-negativen (IHC) Patienten am Leben, allerdings nur 26 % der OPN-positiven Patienten [Rudland *et al.*, 2002]. Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe zeigen ebenfalls einen Zusammenhang zwischen einem erhöhten OPN-Proteingehalt im Tumor (IHC) und einem schlechteren Überleben bei Kopf-Hals-Tumoren (univariate Cox-Regressionsanalyse: RR = 1,6; KI = 0,8–3,6 ; p = 0,2) [Bache *et al.*, 2006]. Darüber hinaus identifizierte eine Genchip-Analyse *SPP1* als das am stärksten überexprimierte Gen (von 12.000 Genen) in Kolonkarzinomen und als Marker für die Progression von Kolonkarzinomen [Agrawal *et al.*, 2003].

Da OPN in die extrazelluläre Matrix sezerniert wird, kann die OPN-Konzentration im Blut der Patienten (Plasma oder Serum) über ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*)-Messungen sehr einfach bestimmt werden. Davon ausgehend könnten Aussagen über die Prognose der Patienten getroffen werden, die dann in ein optimiertes Therapiekonzept einfließen. Die Beobachtung solcher Marker während der Therapie kann zusätzlich Auskunft über einen möglichen Therapieerfolg geben [Bellahcene *et al.*, 2008]. Bei Mamma-, Bronchial- und Prostatakarzinompatienten konnten bereits

erhöhte OPN-Serumspiegel im Vergleich zu gesunden Patienten nachgewiesen werden [Fedarko *et al.*, 2001]. In metastasierten Mammakarzinomen wurde zudem mehrfach eine Korrelation zwischen einem ansteigenden bzw. erhöhten OPN-Plasmagehalt und einer schlechten Prognose bzw. einer kürzeren Überlebenszeit nachgewiesen (univariate Cox-Regression: RR = 4,98; 95 % KI = 2,74-9,06;  $p = 0,0001$  bzw. Kaplan-Meier-Analyse:  $p < 0,001$ ; Log-Rank-Test) [Bramwell *et al.*, 2006; Singhal *et al.*, 1997]. Der OPN-Plasmaspiegel war bei Patienten mit Leberzellkarzinomen ebenfalls signifikant höher als in der gesunden Kontrollgruppe. Außerdem korrelierte der OPN-Plasmaspiegel mit der Anzahl der Lymphknoten, dem Tumorgrad und dem TNM-Status. Ein erhöhter OPN-Plasmaspiegel erwies sich als unabhängiger prognostischer Marker für das Gesamt- und krankheitsfreie Überleben der Leberzellkarzinompatienten (multivariate Cox-Regression: RR = 2,46;  $p < 0,001$  und RR = 19,2;  $p = 0,001$ ) [Zhang *et al.*, 2006]. Eine eigene Studie an Patienten mit nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen zeigte ebenfalls eine positive Korrelation zwischen einem erhöhten OPN-Plasmaspiegel und einem schlechteren Überleben (univariate Cox-Reggressionsanalyse: RR = 2,2; KI = 1,1-4,8 ;  $p = 0,04$ ) [Ostheimer *et al.*, 2014a]. Ähnliche Zusammenhänge zeigten sich auch in weiteren Tumorentitäten wie Prostata-, Nieren-, Bronchial-, Magen-, Kopf-Hals- und Pankreaskarzinomen (Übersicht in [Bellahcene *et al.*, 2008]). Aufgrund der zahlreichen Funktionen, die OPN in wichtigen Prozessen der Tumorgenese und Metastasierung übernimmt, und seiner Bedeutung als prognostischer Marker erscheint die Inhibierung von OPN (Reduktion des *OPN*-Genexpression bzw. durch OPN-neutralisierende Antikörper) als eine vielversprechende Therapiemöglichkeit. Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* führte die Inhibierung von OPN zur einer deutlichen Reduktion der Metastasierung, im Speziellen der Migration und Invasivität in Kolonkarzinomzellen sowie einer verringerten Tumorbildung und weniger Lymphknoten- bzw. Lungenmetastasen im Mausmodell [Ito *et al.*, 2006; Wai *et al.*, 2005; Ye *et al.*, 2003].

#### 1.4 Zielstellung

Zu Beginn dieser Arbeit wurden die Effekte der Reduktion der *OPN*-Genexpression mittels siRNA in Kombination mit Bestrahlung unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen in der Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-231 untersucht. Dabei standen folgende Fragestellungen im Vordergrund:

1. Welche Effekte hat eine siRNA-vermittelte Reduktion der *OPN*-Genexpression unter normoxischen Bedingungen in Kombination mit Bestrahlung auf verschiedene zellphysiologische Parameter?
2. Welchen Effekt hat die siRNA-vermittelte Reduktion der *OPN*-Genexpression unter normoxischen bzw. hypoxischen Bedingungen auf die Radiosensitivität der Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-231?

Aufgrund der starken Genexpression der OPN-Spleißvarianten *OPN-a*, *OPN-b* und *OPN-c* (im Folgenden nur noch als OPN-Spleißvarianten bezeichnet) in verschiedenen Glioblastomzelllinien, wurden *in vitro*-Untersuchungen zur Bedeutung dieser OPN-Spleißvarianten an der Glioblastomzelllinie U251MG durchgeführt. Dabei stand vor allem die Analyse der Bedeutung der OPN-Spleißvarianten durch eine selektive Reduktion der Genexpression mittels siRNA im Fokus:

1. Welche Effekte hat die selektive siRNA-vermittelte Reduktion der Genexpression der *OPN*-Spleißvarianten in Kombination mit Bestrahlung auf verschiedene zellphysiologische Parameter?
2. Wird die Radiosensitivität durch die selektive siRNA-vermittelte Reduktion der Genexpression der *OPN*-Spleißvarianten beeinflusst?
3. Gibt es Unterschiede zwischen der gleichzeitigen siRNA-vermittelten Reduktion der Genexpression aller *OPN*-Spleißvarianten und der selektiven siRNA-vermittelten Reduktion der Genexpression einzelner *OPN*-Spleißvarianten?
4. Wo sind die *OPN*-Spleißvarianten in der Zelle lokalisiert und welche Bedeutung hat dies für die mögliche Funktion der Spleißvarianten?

Außerdem wurde in einer retrospektiven Analyse der mRNA-Gehalt von *OPN* und der *OPN*-Spleißvarianten im Normal- und Tumorgewebe von Weichteilsarkompatienten einer etablierten Weichteilsarkomdatenbank untersucht. Dabei wurden folgende Gesichtspunkte näher beleuchtet:

1. Gibt es einen Zusammenhang zwischen dem mRNA- bzw. Proteingehalt von *OPN* im Serum bzw. im Tumor? Welche Bedeutung hat die Expressionsrate für die Prognose der WTS-Patienten?
2. Wie hoch ist der mRNA-Gehalt der *OPN*-Spleißvarianten in den Tumorproben der WTS-Patienten im Vergleich zum umliegenden Normalgewebe?
3. Korreliert der mRNA-Gehalt der *OPN*-Spleißvarianten mit verschiedenen klinischen Parametern sowie Migrations- bzw. Invasionsmarkern?
4. Ist der mRNA-Gehalt der *OPN*-Spleißvarianten für die Prognose der WTS-Patienten relevant und welche Rolle spielt die Strahlentherapie dabei?

Zusätzlich wurde Tumormaterial und tumorassoziertes Normalgewebe von Glioblastompatienten (retrospektive Analyse) untersucht. In dieser *in vivo*-Analyse sollte die Untersuchung des mRNA-Gehalts von *OPN* und der *OPN*-Spleißvarianten erfolgen sowie die prognostische Bedeutung von *OPN* und der *OPN*-Spleißvarianten analysiert werden.

Neben seiner Rolle als potentieller Prognosemarker, sollte außerdem die Bedeutung von *OPN* in der Tumorphoxie untersucht werden. Dafür wurde *in vitro* zunächst die Beeinflussung der

*OPN*-Genexpression unter Hypoxie in verschiedenen Zelllinien unterschiedlicher Tumorentitäten in Kombination mit Bestrahlung untersucht. Weiterführend erfolgte die *in vivo*-Analyse des Tumormaterials von Glioblastompatienten unter dem Gesichtspunkt möglicher Korrelationen zwischen dem mRNA-Gehalt von *OPN* und der *OPN*-Spleißvarianten mit verschiedenen Hypoxiemarkern.

## 2. Ergebnisse und Diskussion

### 2.1 Bedeutung von Osteopontin als Tumor- und Hypoxiemarker *in vitro*

Neben der operativen Entfernung des Tumors ist die Strahlentherapie heute bei zahlreichen Tumorentitäten als (neo)adjuvante Therapieoption ein wichtiger Bestandteil der Standardtherapie. Zum Teil wird die Bestrahlung auch als Ersatztherapie für die operative Entfernung des Tumors eingesetzt und führt beispielsweise durch Stimmerhaltung bei Kehlkopftumoren zu einer Verbesserung der Lebensqualität der Patienten [Krengli *et al.*, 2004]. Außerdem kann durch eine Strahlentherapie oftmals eine deutliche Verbesserung der Prognose der Tumorpatienten erzielt werden. Vor allem bei hypoxischen Tumoren ist jedoch die Wirksamkeit der Bestrahlung deutlich eingeschränkt [Brown und Giaccia, 1998]. Dass OPN dabei möglicherweise eine wichtige Rolle spielt, zeigen die Untersuchungen von Overgaard und Mitarbeitern (2005) an Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren. Patienten mit einem hohen OPN-Plasmaspiegel hatten nach Bestrahlung im Vergleich zu Patienten mit einem niedrigen OPN-Plasmaspiegel ein 1,9-fach erhöhtes relatives Risiko am Tumor zu versterben (univariate Cox-Regression: 95 % KI = 1,2-3,0;  $p = 0,0002$ ) [Overgaard *et al.*, 2005]. Bei Patienten mit einem hohen OPN-Plasmaspiegel konnte durch die zusätzliche Gabe des Radiosensibilisators Nimorazol die Prognose deutlich verbessert werden (krankheitsspezifische Mortalität nach 5 Jahren: 49 % vs. 79 %;  $p = 0,01$ ). Bei Patienten mit einem niedrigen OPN-Plasmaspiegel hatte die zusätzliche Nimorazoltherapie keinen Einfluss auf das krankheitsfreie Überleben (krankheitsspezifische Mortalität nach 5 Jahren: 36 % vs. 44 %;  $p = 0,55$ ) [Overgaard *et al.*, 2005]. Weitere Untersuchungen zeigten ebenfalls eine Korrelation zwischen erhöhten OPN-Plasmaspiegeln und niedrigen Sauerstoffpartialdrücken im Tumor sowie einem schlechteren Gesamtüberleben der Patienten (multivariate Cox-Regression: RR = 6.3; 95 % KI = 1,4-68,9;  $p = 0,02$ ) [Le *et al.*, 2003]. Immunhistochemische Analysen der eigenen Arbeitsgruppe bestätigen dies. Bei Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren konnte ein Zusammenhang zwischen dem OPN-Proteingehalt, dem Hämoglobinniveau und dem Proteingehalt von HIF-1 $\alpha$  und VEGF sowie dem Sauerstoffpartialdruck im Tumorgewebe nachgewiesen werden [Bache *et al.*, 2006]. Allerdings gibt es kaum *in vitro*-Arbeiten, die die Bedeutung von OPN und der Spleißvarianten OPN-a, OPN-b und OPN-c für die Strahlentherapie unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen genauer untersucht haben.

#### 2.1.1 Bedeutung von OPN in Mammakarzinomzellen im Zusammenhang mit Bestrahlung

Die initialen Untersuchungen zur Bedeutung der Reduktion der *OPN*-Genexpression wurden an der Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-231 durchgeführt. In Mammakarzinomen und zahlreichen anderen Tumorentitäten übernimmt OPN eine zentrale Rolle bei der Regulation tumorassoziierter Prozesse, wie z. B. Schutz vor Apoptose, Förderung der Migration und Invasion sowie des klonogenen

Zellüberlebens und der Tumorangio-genese [Tuck *et al.*, 2007]. Sowohl im Tumorgewebe (mRNA/Protein/Immunhistochemie) als auch im Blut (Plasma/Serum) von Mammakarzinompatienten wurde ein erhöhter OPN-Gehalt nachgewiesen, der mit einer schlechten Patientenprognose assoziiert war (Übersicht in [Tuck *et al.*, 2007]).

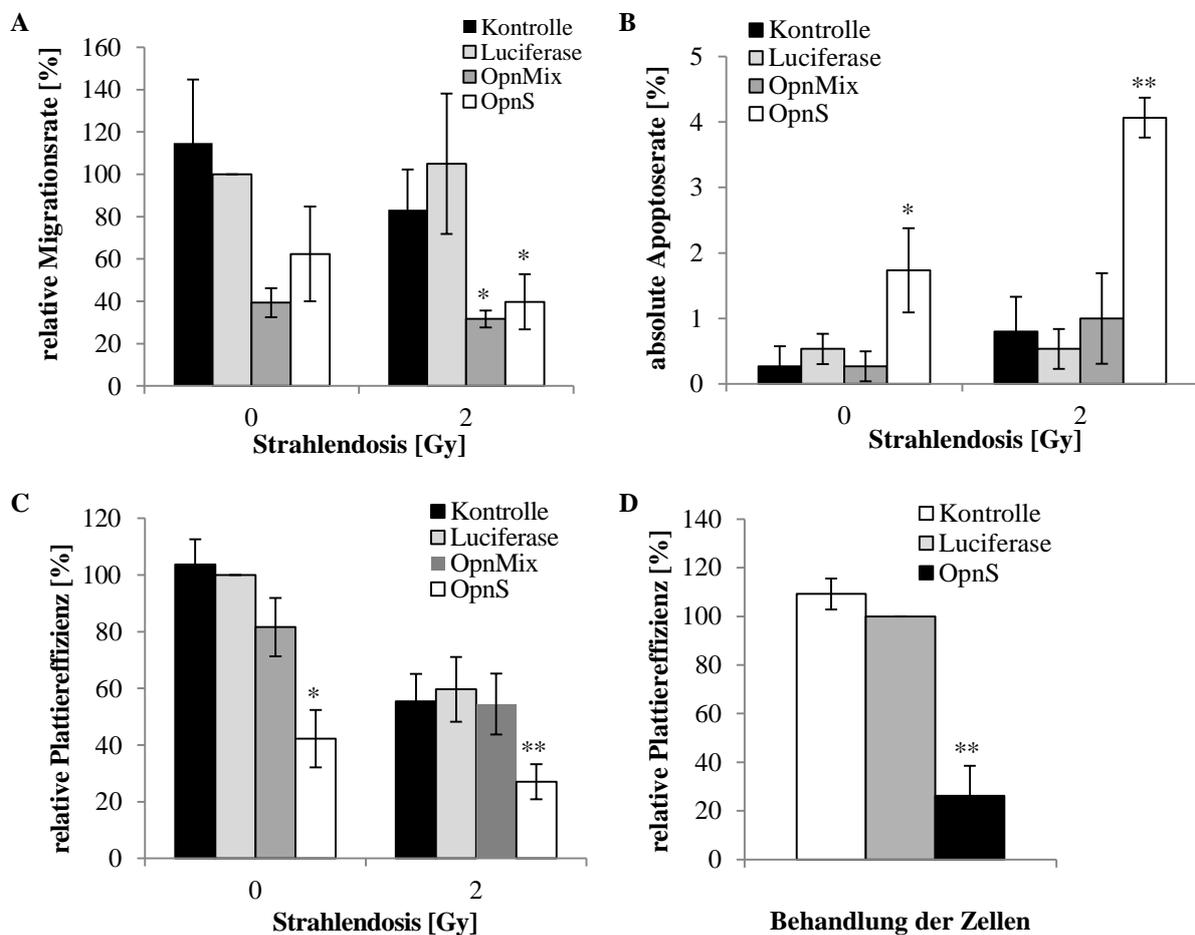
Zur Untersuchung des Einflusses von OPN auf zellphysiologische Prozesse von Tumorzellen wurde in der Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-231 die *OPN*-Genexpression durch zwei unterschiedliche OPN-spezifische siRNAs (OpnS und OpnMix) reduziert [Hahnel *et al.*, 2010]. Obwohl die Transfektion der siRNAs OpnS bzw. OpnMix zu einer gleich starken Reduktion des *OPN*-mRNA-Gehalts führte, war der OPN-Proteingehalt durch die siRNA OpnS stärker reduziert als durch die siRNA OpnMix [Hahnel *et al.*, 2010]. Besonders der extrazelluläre OPN-Proteingehalt war nach OpnS-Behandlung stark reduziert. Betrachtet man den zeitlichen Verlauf (48 h und 72 h nach Behandlung) wird deutlich, dass der OPN-Proteingehalt nach OpnMix-Behandlung langsamer abnimmt als nach OpnS-Behandlung. 72 h nach Transfektion der siRNA OpnMix erreichte der OPN-Proteingehalt allerdings ein ähnliches Niveau wie 48 h nach Transfektion der siRNA OpnS. Dies lässt vermuten, dass die Behandlung mit der siRNA OpnS schneller zu einer Reduktion des *OPN*-mRNA-Gehalts führte als die Behandlung mit der siRNA OpnMix. Aus diesem Grund war der OPN-Proteingehalt durch die siRNA OpnS nach 48 h bereits stärker reduziert als nach Behandlung mit der siRNA OpnMix. Erst im weiteren zeitlichen Verlauf (nach 72 h) sank der extrazelluläre OPN-Proteingehalt nach Transfektion der siRNA OpnMix weiter ab. Außerdem ist es möglich, dass die verbleibende *OPN*-mRNA nach Transfektion der siRNA OpnMix zunächst noch effektiv translatiert wurde. Die zellphysiologischen Untersuchungen zeigten nach siRNA-Transfektion (OpnS bzw. OpnMix) im Boyden-Kammer-Assay eine Reduktion der Migration um 40 % bzw. 60 % (Abbildung 2-1 A). Die Behandlung mit der siRNA OpnS führte zudem 72 h nach Transfektion zu einer verstärkten PARP-Spaltung (Apoptosemarker [Kaufmann *et al.*, 1993]) bzw. zu einem dreifachen Anstieg der Apoptoserate (DAPI [4',6-Diamidin-2-phenylindol]-Färbung der Zellkerne) (Abbildung 2-1 B). Das klonogene Zellüberleben der Zelllinie MDA-MB-231 war nach Transfektion der siRNA OpnS ebenfalls deutlich um 60 % reduziert (Abbildung 2-1 C). Hingegen hatte die Reduktion der *OPN*-Genexpression durch die siRNA OpnMix kaum Einfluss auf die Apoptose (PARP-Spaltung, DAPI-Färbung) und das klonogene Überleben (Abbildung 2-1 A und B) [Hahnel *et al.*, 2010]. In Übereinstimmung mit den beschriebenen Effekten der Reduktion der *OPN*-Genexpression mittels siRNA zeigten *in vitro*-Untersuchungen mit OPN-spezifischen *antisense*-Oligonukleotiden in der Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-231 ebenfalls ein stark reduziertes klonogenes Zellüberleben nach Reduktion der *OPN*-Genexpression. Auch *in vivo* war nach Reduktion der *OPN*-Genexpression die Bildung von osteolytischen Metastasen in Nacktmäusen gehemmt [Adwan *et al.*, 2004]. Zhang und Mitarbeiter (2014) beobachteten in der Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-231 nach Reduktion der *OPN*-Genexpression mittels siRNA ebenfalls eine Reduktion der Migration und Invasion sowie eine Steigerung der Apoptoserate [Zhang *et al.*, 2014]. Die mögliche Anwendung von OPN-siRNAs im

Tiermodell untersuchten Chakraborty und Mitarbeiter (2008) und beobachteten eine verringerte Tumorbildung im orthotopen Mammakarzinom-Xenograftmodell, ein reduziertes Tumorwachstum sowie eine Reduktion des Proteingehalts der Migrations- bzw. Invasionsmarker MMP-9, MMP-2 und uPA [Chakraborty *et al.*, 2008]. Dies bestätigte sich auch in einem weiteren Xenograftmodell mit MDA-MB-231-Zellen, bei dem nach siRNA-Applikation in den Tumor eine Reduktion des Tumorwachstums nachgewiesen werden konnte [Minai-Tehrani *et al.*, 2012].

Die weiterführenden Untersuchungen zum Einfluss des OPN auf die Effektivität der Bestrahlung zeigten, dass der mRNA- und Proteingehalt von OPN durch eine Bestrahlung nicht beeinflusst wird ([Hahnel *et al.*, 2010] und Daten nicht gezeigt). Die Beobachtungen, inwieweit eine Bestrahlung den mRNA- und Proteingehalt von OPN beeinflussen kann, sind sehr unterschiedlich. In Übereinstimmung mit den Beobachtungen der vorliegenden Arbeit konnte nach der Bestrahlung (10 Gy) von Osteoblasten-ähnlichen MC3T3-E1-Zellen keine Änderung des *OPN*-mRNA-Gehalts nachgewiesen werden [Matsumura *et al.*, 1998]. In einer anderen Studie an MC3T3-E1-Zellen zeigte sich dagegen 14 bzw. 21 Tage nach Bestrahlung (4 Gy bzw. 10 Gy) eine Induktion des *OPN*-mRNA-Gehalts [Gevorgyan *et al.*, 2008]. Chang und Mitarbeiter (2012) konnten in Bronchialkarzinomzellen bereits 24 h nach Bestrahlung (5 Gy) einen Anstieg des OPN-Proteingehalts nachweisen [Chang *et al.*, 2012]. In einer weiteren Studie mit verschiedenen Tumorzelllinien zeigte sich eine sehr zelllinienabhängige Beeinflussung des mRNA- und Proteingehalts von OPN durch die Bestrahlung [Wohlleben *et al.*, 2015]. In den beiden Kopf-Hals-Tumorzelllinien Cal27 und FaDu konnte 24 h nach Bestrahlung (8 Gy) keine Änderung des *OPN*-mRNA-Gehalts nachgewiesen werden. Allerdings zeigte sich in der Glioblastomzelllinie U251MG eine Reduktion und in der Glioblastomzelllinie U87MG eine Erhöhung des mRNA- und Proteingehalts von OPN nach Bestrahlung (8 Gy) [Wohlleben *et al.*, 2015].

Die Reduktion der *OPN*-Genexpression durch die siRNA *OpnS* konnte auch nach der Bestrahlung nachgewiesen werden [Hahnel *et al.*, 2010]. Weiterhin zeigten sich nach Bestrahlung der Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-231 und gleichzeitiger Transfektion der siRNA *OpnS* additive Effekte bei der Analyse verschiedener zellphysiologischer Parameter [Hahnel *et al.*, 2010]. Durch die kombinierte Behandlung wurde die Migration der Zelllinie MDA-MB-231 im Gegensatz zur alleinigen Transfektion der siRNA *OpnS* signifikant um 60 % reduziert (Abbildung 2-1 A). Auch das klonogene Zellüberleben wurde durch die zusätzliche Bestrahlung (2 Gy) nach *OpnS*-Behandlung um 70 % reduziert (Abbildung 2-1 C). Die Apoptoserate verdoppelte sich bei zusätzlicher Bestrahlung (2 Gy) im Vergleich zur alleinigen Transfektion der siRNA *OpnS* (Abbildung 2-1 B) [Hahnel *et al.*, 2010]. In Übereinstimmung dazu konnte in HT29-Zellen die proapoptotische Wirkung einer UV-Bestrahlung durch die Inkubation mit rekombinanten OPN unterdrückt werden [Lee *et al.*, 2007]. In Bronchialkarzinomzellen bewirkte die Reduktion der *OPN*-Genexpression einen Anstieg des Proteingehalts verschiedener proapoptotischer Proteine [Chang *et al.*, 2012]. Zusätzlich konnte durch Autophagieinduktion ein bestrahlungsbedingter Anstieg des OPN-Proteingehalts verhindert und somit

die OPN-vermittelte Radioresistenz der Bronchialkarzinomzellen reduziert werden [Chang *et al.*, 2012].

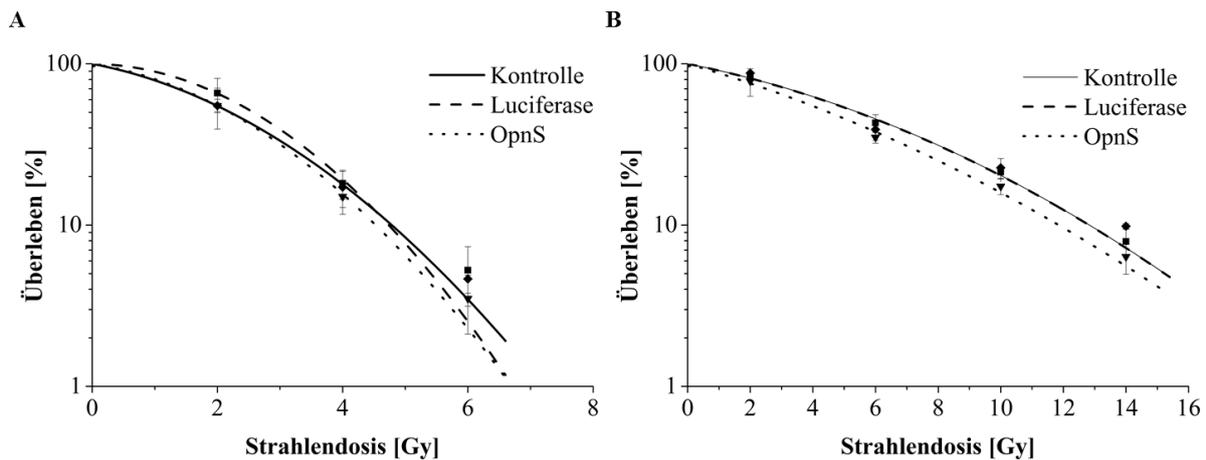


**Abbildung 2-1: Zellphysiologische Effekte der Reduktion der OPN-Genexpression (modifiziert nach [Hahnel *et al.*, 2010])**

Die Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-231 wurde mit OPN-spezifischen siRNAs (OpnS bzw. OpnMix) transfiziert und nach 24 h mit 2 Gy bestrahlt. Nach weiteren 48 h wurden das Migrationsverhalten mit Hilfe des Boyden-Kammer-Assays (A) und die Apoptose mittels DAPI-Färbung (B) untersucht. Das klonogene Zellüberleben wurde 24 h nach Transfektion bzw. 1 h nach Bestrahlung unter normoxischen Bedingungen (C) und hypoxischen (D) bestimmt. Alle Daten repräsentieren den Mittelwert ( $\pm$ Standardabweichung) aus drei voneinander unabhängigen Versuchen (\*  $p \leq 0,05$  und \*\*  $p \leq 0,001$  vs. Luciferase-siRNA transfizierte Zellen bei der entsprechenden Strahlendosis). Die Luciferase-siRNA transfizierten Zellen bei 0 Gy wurden auf 100 % gesetzt.

In den eigenen Untersuchungen führte die Transfektion der OpnS-siRNA zu einer leichten Radiosensitivierung der Zelllinie MDA-MB-231 (Abbildung 2-2 A). Es wurde ein Verstärkungsfaktor (EF-Wert) von  $1,50 \pm 0,09$  ( $p = 0,2$ ) bei 6 Gy sowie ein DMF10 von  $1,08 \pm 0,02$  ( $p = 0,2$ ) ermittelt (Tabelle 2-1) [Hahnel *et al.*, 2010]. Der EF-Wert berechnet sich aus dem Quotienten der Überlebensfraktion der Kontrollzellen (Luciferase-siRNA) und der behandelten Zellen (OpnS-siRNA)

bei einer definierten Strahlendosis und stellt somit ein Maß für die Radiosensitivierung einer Behandlung dar. Der DMF10 (*dose modifying factor*) ist der Quotient der Strahlendosen die aufgewendet werden müssen, um das klonogene Zellüberleben der Kontrollzellen (Luciferase-siRNA) und der behandelten Zellen (OpnS-siRNA) auf 10 % zu reduzieren. Der DMF10 gibt Auskunft darüber in welchem Maß eine Behandlung die Wirkung einer Bestrahlung beeinflusst. Ein DMF10 bzw. EF-Wert  $> 1$  zeigt eine Erhöhung der Radiosensitivität an, während ein DMF10 bzw. EF-Wert  $< 1$  eine Radioresistenz erkennen lässt.



**Abbildung 2-2: Radiosensitivität der Zelllinie MDA-MB-231 unter Normoxie (A) und Hypoxie (B)**

Die Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-231 wurden mit der OPN-spezifischen siRNA OpnS transfiziert und nach 24 h bestrahlt. Die Zellen wurden unter normoxischen Bedingungen mit 2, 4 und 6 Gy bzw. unter hypoxischen Bedingungen mit 2, 6, 10 und 14 Gy bestrahlt. Es wurde für jede „Behandlung“ eine unbestrahlte Zellpopulation als Referenz mitgeführt. Für die Bestimmung der Radiosensitivität wurde die Plattiereffizienz der jeweiligen Referenzpopulation bei 0 Gy auf 100 % gesetzt ( $\blacklozenge$  Kontrolle,  $\blacksquare$  Luciferase,  $\blacktriangledown$  OpnS). Die Kurvenanpassung erfolgte mit dem linearquadratischen Modell nach der Gleichung  $-\ln S = \alpha D + \beta D^2$  (S - Überlebensfraktion, D - Dosis,  $\alpha$  - lineare Komponente,  $\beta$  - quadratische Komponente). Alle Daten repräsentieren den Mittelwert ( $\pm$ Standardabweichung) aus drei voneinander unabhängigen Versuchen.

Obwohl die Strahlentherapie ein fester Bestandteil der Standardtherapie bei einer Vielzahl von Tumoren ist, gibt es bisher nur wenige Studien, die einen möglichen Einfluss von OPN auf die Effektivität einer Bestrahlung untersucht haben. Erste *in vivo*-Analysen zeigten, dass Rektalkarzinompatienten mit einer erfolgreichen Radiochemotherapie einen deutlich niedrigeren prätherapeutischen OPN-Proteingehalt im Blut aufweisen als Patienten, die später Metastasen entwickelten [Debucquoy *et al.*, 2006]. Aktuelle Untersuchungen bestätigen die radiosensitivierende Wirkung der Reduktion der OPN-Genexpression unter normoxischen Bedingungen. Nach stabiler Transfektion eines OPN-siRNA exprimierenden Vektors beobachteten Yang und Mitarbeiter (2012) ebenfalls eine leichte Radiosensitivierung in der Zelllinie MDA-MB-231 [Yang *et al.*, 2012b]. Dieser Effekt wurde auch in Zelllinien anderer Tumorentitäten gezeigt (Bronchial- und Kolorektalkarzinomen) [Likui *et al.*, 2011; Polat *et al.*, 2013]. Für die Bronchialkarzinomzelllinie

A549 wurde dabei nach siRNA-vermittelter Reduktion der *OPN*-Genexpression ein DMF10 von 1,26 ermittelt [Polat *et al.*, 2013].

**Tabelle 2-1: EF-Werte der Transfektion der siRNA OpnS unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen in der Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-231**

Sauerstoffversorgung	2 Gy	4 Gy	6 Gy	10 Gy	14 Gy
Normoxie	1,23 ±0,24	1,21±0,05	1,50±0,09	---	---
Hypoxie	1,10±0,25	---	1,23±0,05	1,24±0,12	1,32±0,55

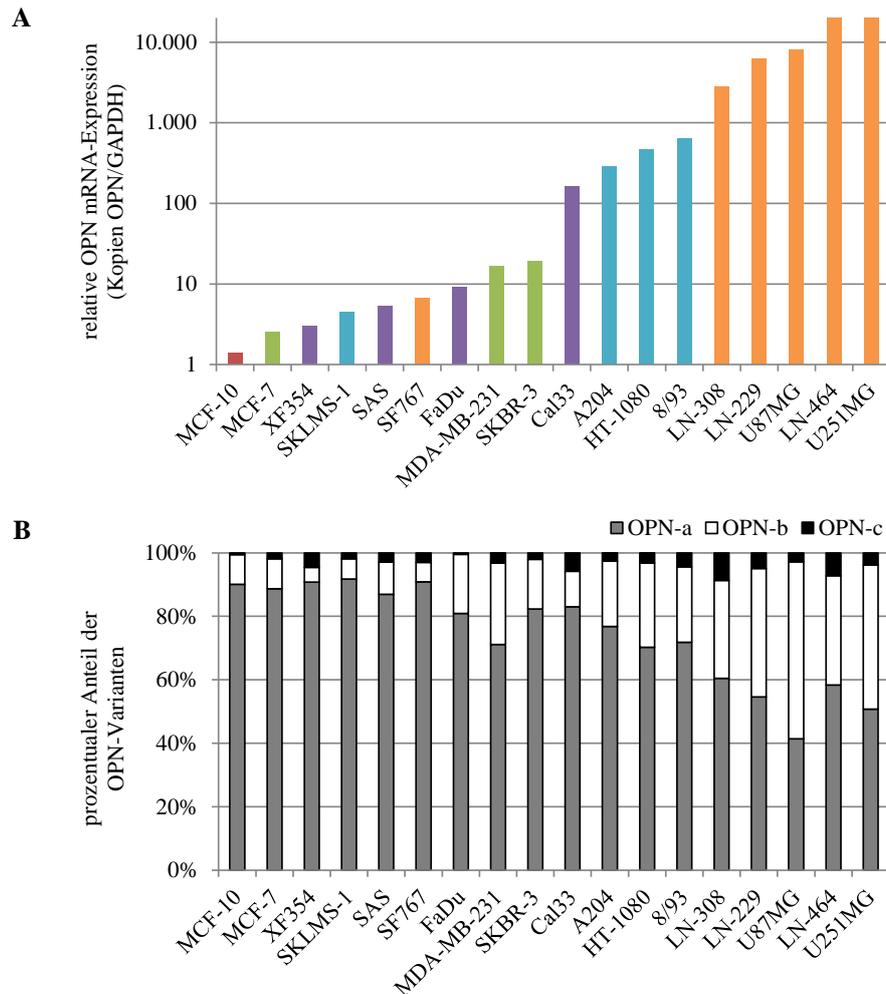
Da Hypoxie entscheidend zur Radioresistenz vieler Tumoren beiträgt, wurde in diesem Zusammenhang der Einfluss von OPN auf das klonogene Zellüberleben und die Radiosensitivität unter Hypoxie analysiert. Die eigenen Untersuchungen an der Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-231 zeigten, dass die Transfektion der siRNA OpnS auch unter hypoxischen Bedingungen unabhängig von der Bestrahlung den *OPN*-mRNA-Gehalt um mehr als 90 % reduziert (Daten nicht gezeigt). Unter hypoxischen Bedingungen wurde nach Reduktion der *OPN*-Genexpression eine deutliche Reduktion des klonogenen Zellüberlebens um 75 % beobachtet (Abbildung 2-1 D). Zudem führte die Reduktion der *OPN*-Genexpression in der Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-231 wie unter normoxischen Bedingungen auch unter hypoxischen Bedingungen mit ansteigender Strahlendosis zu einer leichten Radiosensitivierung (Abbildung 2-2). Bei einer Strahlendosis von 14 Gy wurde unter hypoxischen Bedingungen ein Verstärkungsfaktor von  $1,32 \pm 0,55$  ( $p = 0,3$ ) ermittelt (Tabelle 2-1). Außerdem wurde unter hypoxischen Bedingungen, ähnlich wie unter normoxischen Bedingungen, ein DMF10 von  $1,10 \pm 0,16$  ( $p = 0,3$ ) ermittelt.

Zusammenfassend zeigte sich, dass die Reduktion der *OPN*-Genexpression in der Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-231 unter Normoxie zu einer Reduktion der Migration und des klonogenen Zellüberlebens sowie zu einer Induktion der Apoptose führte. Auch unter hypoxischen Bedingungen wurde eine Reduktion des klonogenen Zellüberlebens nach Reduktion der *OPN*-Genexpression nachgewiesen. Sowohl unter normoxischen als auch unter hypoxischen Bedingungen führte die Reduktion der *OPN*-Genexpression in Kombination mit Bestrahlung zu einer leichten Radiosensitivierung. Daher ist OPN als therapeutisches Ziel von normoxischen, aber auch von hypoxischen Tumoren gut geeignet.

### 2.1.2 OPN und OPN-Spleißvarianten in Glioblastomzellen

In der Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-231 waren die beiden OPN-Spleißvarianten *OPN-b* und *OPN-c* aufgrund ihres geringen mRNA-Gehalts kaum nachweisbar (Daten nicht gezeigt). Deshalb wurden Zelllinien unterschiedlicher Tumorentitäten untersucht und der mRNA-Gehalt von *OPN* (alle *OPN*-Spleißvarianten) und der OPN-Spleißvarianten *OPN-a*, *OPN-b* und *OPN-c* bestimmt (Abbildung 2-3). Die Mammakarzinomzelllinien MDA-MB-231 und SKBR-3, aber auch die HNO-Zelllinien FaDu und SAS sowie die WTS-Zelllinie SKLMS-1 wiesen im Vergleich zu den Glioblastomzelllinien

U251MG, LN-464, U87MG, LN-229 und LN-308 einen deutlich geringeren *OPN*-mRNA-Gehalt auf (Abbildung 2-3 A). Die Analyse des mRNA-Gehalts der einzelnen Spleißvarianten zeigte in allen Zelllinien ein ähnliches Bild (Abbildung 2-3 B). Der mRNA-Gehalt der Variante *OPN-a* war höher als der mRNA-Gehalt der beiden Spleißvarianten *OPN-b* und *OPN-c*. Allerdings fiel auf, dass der Anteil der Spleißvariante *OPN-b* in Zelllinien mit einem hohen *OPN*-mRNA-Gehalt deutlich zugenommen hatte (Abbildung 2-3 B).

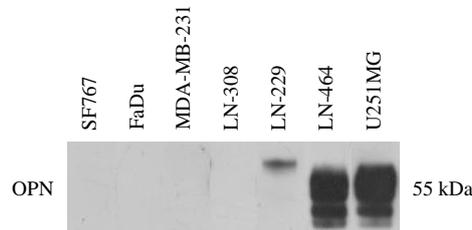


**Abbildung 2-3: mRNA-Gehalt der *OPN*-Spleißvarianten in verschiedenen Tumorzelllinien**

Der mRNA-Gehalt von *OPN* (A) und der *OPN*-Spleißvarianten (B) wurde mittels quantitativer *real-time* PCR (qPCR) bestimmt. Als Referenzgen wurde Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (*GAPDH*) verwendet. Die unterschiedlichen Zelllinien sind von links nach rechts nach ansteigendem *OPN*-mRNA-Gehalt sortiert. Die unterschiedlichen Zelllinien sind entsprechend ihrer Tumorentität farblich markiert (Glioblastom: orange; Weichteilsarkom: blau, Kopf-Hals-Tumor: violett; Mammakarzinom: grün). Um einen Vergleich zwischen Tumor- und Normalgewebe ziehen zu können, wurde zusätzlich die Brustepithelzelllinie MCF-10 (rot) untersucht.

Die Untersuchung des extrazellulären *OPN*-Proteingehalts der verschiedenen Zelllinien zeigte, dass die beiden Glioblastomzelllinien U251MG und LN-464 auch den höchsten extrazellulären

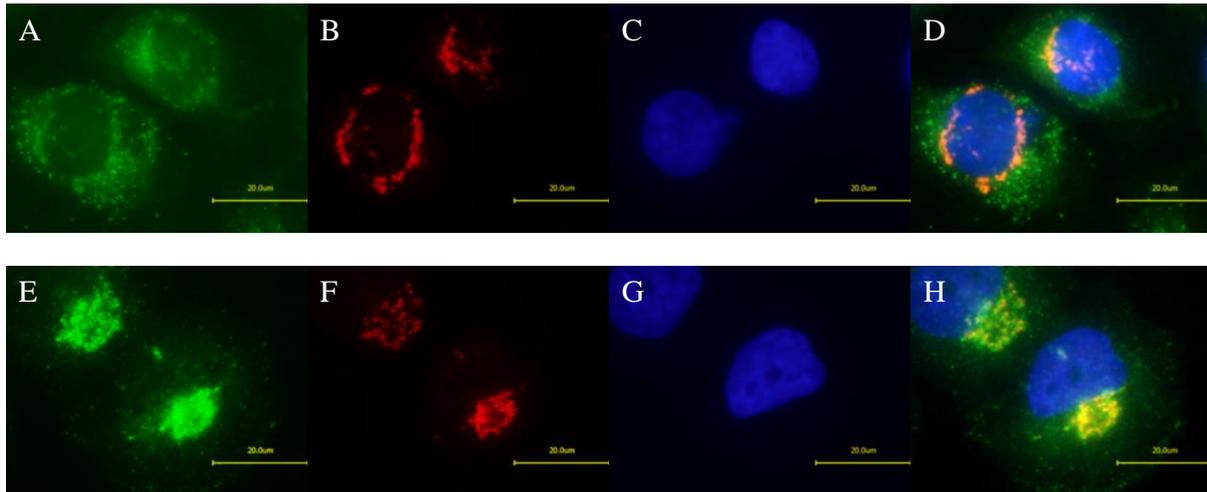
OPN-Proteingehalt (Zellüberstand) aufwiesen (Abbildung 2-4). Im Vergleich dazu war die von den anderen Zelllinien (z. B. MDA-MB-231) sezernierte OPN-Menge so gering, dass diese mittels Western Blot kaum bzw. nicht detektiert werden konnte.



**Abbildung 2-4: Extrazellulärer OPN-Proteingehalt ausgewählter Tumorzelllinien**

Die Tumorzellen wurden 24 h in serumfreien Medium kultiviert. Anschließend wurde der Zellüberstand aufkonzentriert und mittels Western Blot analysiert. Die Zelllinien sind von links nach rechts nach ansteigendem OPN-mRNA-Gehalt sortiert.

Mit Hilfe von Immunfluoreszenzfärbungen wurde deutlich, dass sich auch der intrazelluläre OPN-Proteingehalt in den Zelllinien MDA-MB-231 und U251MG stark voneinander unterscheidet. Die Intensität der OPN-Immunfluoreszenzfärbung (grün) war in MDA-MB-231-Zellen deutlich schwächer als in U251MG-Zellen (Abbildung 2-5 A und E). Außerdem war OPN in der Zelllinie MDA-MB-231 vorwiegend zytoplasmatisch granulär verteilt, während man in U251MG-Zellen eine starke OPN-Akkumulation am Zellkern bzw. am Golgi-Apparat (rot, *merge*: gelb) erkennen konnte (Abbildung 2-5 D und H). In Knochenzellen und renalen Epithelzellen zeigte sich ebenfalls eine starke perinukleäre und golgiassoziierte Lokalisation des OPN [de Oliveira *et al.*, 2003; Hampel *et al.*, 2003; Palioto *et al.*, 2011]. Teilweise konnte zusätzlich eine punktuelle Verteilung des OPN im Zytoplasma nachgewiesen werden [de Oliveira *et al.*, 2003; Palioto *et al.*, 2011]. Hampel und Mitarbeiter (2003) zeigten einen direkten Zusammenhang zwischen der Lokalisation des OPN am Golgi-Apparat und der Sezernierung des OPN in die extrazelluläre Matrix [Hampel *et al.*, 2003]. Die Hemmung der Funktion des Golgi-Apparates führte zu einer verminderten Sezernierung des OPN aus der Zelle [Hampel *et al.*, 2003]. In Übereinstimmung dazu zeigte sich in den eigenen Untersuchungen in der Zelllinie U251MG ein hoher intrazellulärer (intensive Immunfluoreszenzfärbung bzw. eine starke Akkumulation des OPN an den Golgi-Apparat) und extrazellulärer OPN-Proteingehalt (Western Blot) (Abbildung 2-4 und Abbildung 2-5 E-H).



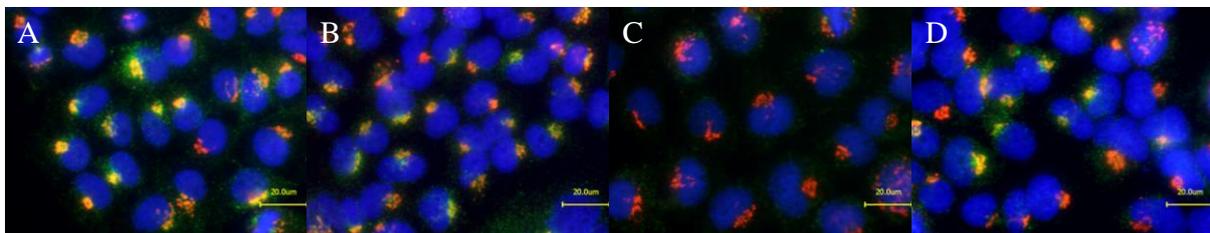
**Abbildung 2-5: Lokalisation des intrazellulären OPN in den Zelllinien MDA-MB-231 und U251MG**

Mittels Immunfluoreszenztechnik wurde in den Zelllinien MDA-MB-231 (A-D) und U251MG (E-H) OPN (grün: A und E) und der trans-Golgi (rot: B und F) angefärbt. Die Zellkerne wurden mittels DAPI-Reagenz blau gefärbt (C und G). In den Bildern D und H sind alle Färbungen übereinander gelegt (*merge*). Der Balken entspricht 20 µm.

Um die Bedeutung der OPN-Spleißvarianten zu analysieren, wurden Untersuchungen zur Reduktion der Genexpression der OPN-Spleißvarianten *OPN-a*, *OPN-b* und *OPN-c* in der Glioblastomzelllinie U251MG durchgeführt. Zunächst wurden zahlreiche siRNA-Konstrukte getestet, um die Genexpression der einzelnen OPN-Spleißvarianten selektiv zu reduzieren [Giebler, 2011]. Aufgrund der geringen Sequenzunterschiede war es nicht möglich, siRNA-Konstrukte zu entwerfen, welche nur eine Spleißvariante inhibieren. Mit dem siRNA-Konstrukt OpnAC konnte allerdings spezifisch und gleichzeitig die Genexpression der Varianten *OPN-a* und *OPN-c* reduziert werden. Der mRNA-Gehalt der Spleißvarianten *OPN-a* und *OPN-c* war nach Transfektion der siRNA OpnAC um 80 bzw. 90 % reduziert. Der mRNA-Gehalt von *OPN-b* blieb durch die siRNA OpnAC unbeeinflusst [Güttler *et al.*, 2013]. Dagegen reduzierte die siRNA OpnS den mRNA-Gehalt aller drei OPN-Spleißvarianten (*OPN-a*, *OPN-b* und *OPN-c*) um ca. 90 %. In Western-Blot-Analysen zeigte sich nach Transfektion der siRNA OpnAC eine deutliche Reduktion des intra- und extrazellulären OPN-Proteingehalts der Zelllinie U251MG. Die Reduktion der Genexpression aller Spleißvarianten mit Hilfe der siRNA OpnS führte allerdings zu einer stärkeren Reduktion des intra- und extrazellulären OPN-Proteingehalts [Güttler *et al.*, 2013].

Die siRNA OpnAC hatte auf verschiedene zellphysiologische Prozesse keinen Effekt. Die Reduktion der Genexpression von *OPN-a* und *OPN-c* war im Vergleich zur Reduktion der Genexpression aller Spleißvarianten durch OpnS nicht ausreichend um die Proliferation, Migration, Zellzyklusverteilung bzw. Apoptose zu beeinflussen [Güttler *et al.*, 2013]. Die Spleißvariante OPN-b ist möglicherweise in der Lage die gleichzeitige Reduktion der Genexpression von *OPN-a* und *OPN-c* zu kompensieren. In einer weiteren Studie an U251MG-Zellen wurde ebenfalls eine kompensatorische Wirkung der Überexpression der Spleißvariante *OPN-b* beobachtet. In dieser Studie konnte die Induktion der

Apoptose nach Reduktion der Genexpression aller Spleißvarianten mittels siRNA durch die Überexpression der Spleißvarianten *OPN-a*, *OPN-b* bzw. *OPN-c* gehemmt werden [Yan *et al.*, 2010]. Die Proliferation von Bronchialkarzinomzellen wurde dagegen einzig durch die Überexpression der Spleißvariante *OPN-b* beeinflusst [Zhao *et al.*, 2011]. Die Reduktion der Proliferationsrate von A549-Zellen nach Reduktion der Genexpression aller Spleißvarianten mit einer OPN-siRNA konnte durch gleichzeitige Überexpression von *OPN-a* bzw. *OPN-c* nicht kompensiert werden. Jedoch führte die gleichzeitige Überexpression der Spleißvariante *OPN-b* zu einer deutlichen Steigerung der Proliferation [Zhao *et al.*, 2011]. Dies bestätigten auch die Beobachtungen von He und Mitarbeitern (2006), die in MCF-7-Zellen keine Änderung der Proliferation nach Überexpression der Spleißvarianten *OPN-a* bzw. *OPN-c* nachweisen konnten [He *et al.*, 2006]. Die Spleißvariante *OPN-b* war nach Überexpression in Leberkarzinomzellen die Spleißvariante, die die Migration der Hep3B-Zellen am stärksten stimulierte [Chae *et al.*, 2009]. Aber auch in anderen Tumorentitäten, wie Magen- und Prostatakarzinomen, stimulierte die Überexpression von *OPN-b* die Proliferation, Migration und Invasion der Tumorzellen [Tang *et al.*, 2013; Tilli *et al.*, 2012]. Eigene Untersuchungen zeigten, dass OPN nach Transfektion der siRNA OpnAC stark am Zellkern lokalisiert bzw. mit dem Golgi-Apparat assoziiert war (Abbildung 2-6 D). Es lässt sich vermuten, dass es sich dabei um das nach Reduktion der Genexpression der beiden Spleißvarianten *OPN-a* und *OPN-c* noch konsistent gebildete OPN-b handelte. Nach Reduktion der Genexpression aller *OPN*-Spleißvarianten (*OPN-a*, *OPN-b* und *OPN-c*) mit Hilfe der siRNA OpnS war OPN dagegen kaum nachweisbar (Abbildung 2-6 C). Anscheinend wird das nach Reduktion der Genexpression der beiden Spleißvarianten *OPN-a* und *OPN-c* noch konsistent gebildete OPN-b am Golgi-Apparat für den Transport aus der Zelle prozessiert. Das sezernierte OPN-b ist dann in der Lage die Migration und Proliferation der benachbarten Zellen zu stimulieren bzw. den G2/M-Arrest und die Induktion der Apoptose zu unterdrücken. Auf diese Weise könnte OPN-b die Reduktion der Genexpression der beiden anderen Spleißvarianten *OPN-a* und *OPN-c* kompensieren.

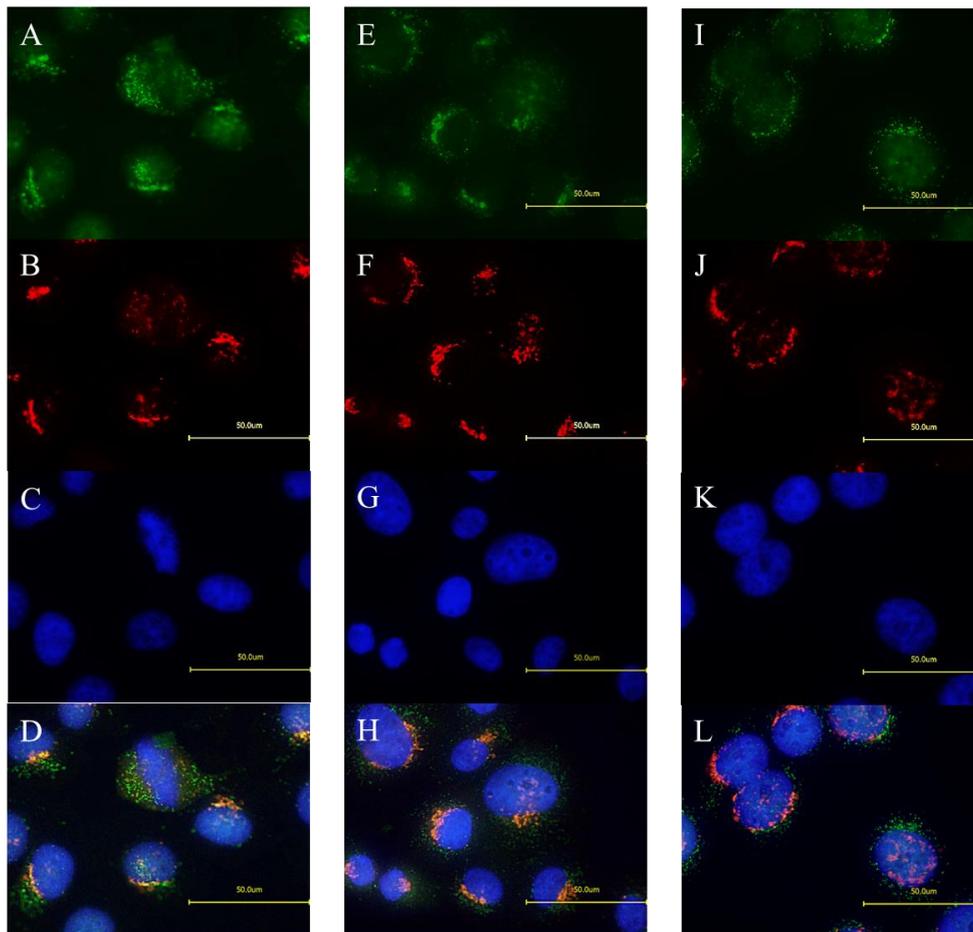


**Abbildung 2-6: Immunfluoreszenzfärbung nach siRNA-Transfektion gegen OPN [Güttler *et al.*, 2013]**

U251MG-Zellen wurden auf Deckgläschen kultiviert und mit OPN-spezifischen siRNAs transfiziert. Nach 72 h wurden die Zellen fixiert und mit spezifischen Antikörpern gegen OPN (grün) und den trans-Golgi (rot) gefärbt. Die Zellkerne wurden mittels DAPI-Reagenz gefärbt (blau). Der Balken entspricht 20 µm.

In Übereinstimmung damit zeigen eigene Überexpressionsstudien der *OPN*-Spleißvarianten in der Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-231 mit Hilfe von Immunfluoreszenzfärbungen, dass OPN bei

Überexpression von *OPN-b* diffus im Zytoplasma lokalisiert und vor allem perinukleär mit dem Golgi-Apparat assoziiert war (Abbildung 2-7 E-H). Bei Überexpression der Spleißvariante *OPN-a* war OPN ähnlich wie bei Überexpression von *OPN-b* sowohl punktuell im Zytoplasma als auch stark in Zellkernnähe lokalisiert (Abbildung 2-7 A-D). Im Gegensatz dazu ließ sich bei Überexpression der Spleißvariante *OPN-c* nur eine zytoplasmatische Lokalisation des OPN beobachten (Abbildung 2-7 I-L). Die zellphysiologischen Untersuchungen zeigten, dass die Überexpression der *OPN*-Spleißvarianten in der Zelllinie MDA-MB-231 keinen Effekt auf die Proliferation, das klonogene Zellüberleben oder die Radiosensitivität hatte (Daten nicht gezeigt).

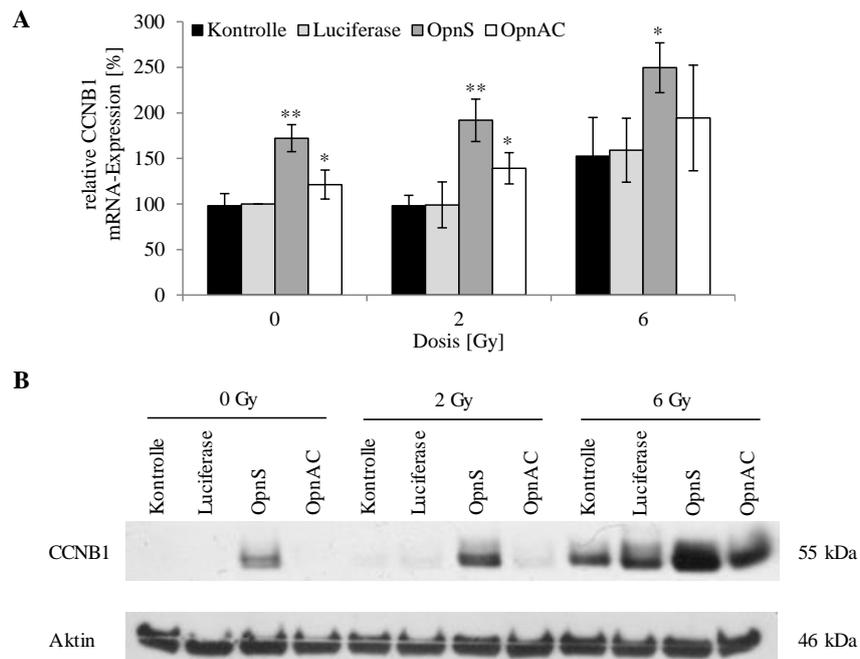


**Abbildung 2-7: Lokalisation des OPN bei Überexpression der *OPN*-Spleißvarianten**

Die Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-231 wurde mit dem Vektoren pDest490-OPNa (A-D), -OPNb (E-H) bzw. -OPNc (I-L) (Addgene Plasmid 17591 von [Takafuji *et al.*, 2007]) transfiziert und mit G418 selektiert. Nach erfolgreicher Klonierung wurden die Zellen mit spezifischen Antikörpern gegen OPN grün (A, E, I) und den trans-Golgi rot (B, E, J) gefärbt. Die Zellkerne wurden mittels DAPI-Reagenz blau gefärbt (C, G, K). Der Balken entspricht 50 µm.

Das sezernierte OPN-b ist möglicherweise für die Regulation der oben genannten Prozesse (Proliferation, Migration, Zellzyklusverteilung bzw. Apoptose) ausreichend. Denn in eigenen Untersuchungen zeigten sich, im Gegensatz zur selektiven Reduktion der Genexpression der

Spleißvarianten *OPN-a* und *OPN-c*, erst bei gleichzeitiger Reduktion der Genexpression aller *OPN*-Spleißvarianten durch die siRNA *OpnS* deutliche zellphysiologische Effekte. Nach Reduktion der *OPN*-Genexpression mittels *OpnS*-siRNA wurde auch in der Zelllinie U251MG eine Reduktion der Proliferation und der Migration sowie eine Steigerung der Apoptoserate beobachtet. Die Analyse des Zellzyklus zeigte nach Transfektion der *OpnS*-siRNA zudem eine deutliche Akkumulation der U251MG-Zellen in der G2/M-Phase [Güttler *et al.*, 2013]. Der G2/M-Arrest der U251MG-Zellen nach Reduktion der Genexpression aller *OPN*-Spleißvarianten ist möglicherweise eine Folge der Beeinflussung regulatorischer Proteine des G2/M-Kontrollpunktes. Um die Akkumulation der Zellen in der G2/M-Phase genauer zu untersuchen, wurde zusätzlich das Cyclin B1 (CCNB1) untersucht. CCNB1 ist ein wichtiges Protein der G2/M-Transition und essentiell für den Start der Mitose. Nach Transfektion der *OpnS*-siRNA wurde eine deutliche Zunahme des mRNA- und Proteingehalts von CCNB1 detektiert (Abbildung 2-8). Auch in MDA-MB-435s-Zellen führte die Reduktion des OPN-Proteingehalts durch (-)-Agelastatin A (Oroidinalkaloid mit antitumoralen Eigenschaften) zu einem Anstieg der in der G2/M-Phase befindlichen Zellen von 18 % auf 40 % und zur gleichzeitigen Erhöhung des CCNB1-Proteingehalts [Mason *et al.*, 2008]. CCNB1 bildet mit der cyclinabhängigen Kinase CDC2 (*cell division cycle protein 2*) einen Komplex, welcher durch die Dephosphorylierung der CDC2 aktiviert wird. Infolgedessen kommt es zur Initiation der G2/M-Progression. Möglicherweise führt die fehlende Komplexierung oder Aktivierung des CCNB1/CDC2-Komplexes zum Arrest der U251MG-Zellen in der G2-Phase [Daniel, 2003; Siddik, 2010]. Die U251MG-Zellen können also nicht in die Mitosephase übergehen und der CCNB1-Proteingehalt bleibt erhöht (Abbildung 2-8 B).



**Abbildung 2-8: mRNA- und Proteingehalt von CCNB1 in U251MG-Zellen nach Reduktion der OPN-Genexpression**

Die U251MG-Zellen wurden mit den siRNAs OpnS bzw. OpnAC transfiziert und nach 24 h mit 2 Gy bzw. 6 Gy bestrahlt. Nach weiteren 48 h wurden die Zellen geerntet sowie die mRNA und Proteine isoliert. Es wurde jeweils eine entsprechend behandelte unbestrahlte Kontrollpopulation mitgeführt. Der mRNA-Gehalt von *CCNB1* wurde mittels qPCR analysiert (A). Als Referenzgen wurde *GAPDH* verwendet. Die Luciferasekontrolle bei 0 Gy wurde auf 100 % gesetzt. Die Daten repräsentieren den Mittelwert ( $\pm$ Standardabweichung) aus mindestens drei voneinander unabhängigen Versuchen (\*  $p \leq 0,05$  und \*\*  $p = 0,001$  vs. Luciferase-siRNA transfizierte Zellen bei der entsprechenden Strahlendosis). Das CCNB1-Proteinniveau wurde mittels Western Blot analysiert (B). Aktin diente als interne Ladekontrolle.

Die eigenen Analysen zeigten außerdem, dass sowohl die Transfektion der OpnAC-siRNA als auch der OpnS-siRNA in U251MG-Zellen zu einer Reduktion des klonogenen Zellüberlebens um ca. 50 % führte [Güttler *et al.*, 2013]. Die Spleißvariante OPN-b ist also allein nicht in der Lage die Effekte der reduzierten Genexpression der Spleißvarianten *OPN-a* und *OPN-c* auf das klonogene Zellüberleben zu kompensieren. Die Reduktion der Genexpression der Spleißvarianten *OPN-a* und *OPN-c* ist demzufolge ausreichend, um das klonogene Zellüberleben der U251MG-Zellen zu reduzieren [Güttler *et al.*, 2013]. In Prostatakarzinom- und Mesotheliomzellen wurde eine deutliche Steigerung des klonogenen Zellüberlebens bei Überexpression der Spleißvariante *OPN-b* beobachtet [Ivanov *et al.*, 2009; Tilli *et al.*, 2012]. Allerdings zeigten sich in nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen in Abhängigkeit von der Zelllinie z. T. gegenteilige Effekte der Überexpression von *OPN-b* auf das klonogene Zellüberleben [Goparaju *et al.*, 2010].

Die zusätzliche Bestrahlung der Zellen mit 2 Gy und 6 Gy wirkte in Kombination mit der Transfektion der siRNA OpnS additiv auf die Reduktion der Proliferation und des klonogenen Zellüberlebens, die Apoptoseinduktion und den G2/M-Arrest. Die Radiosensitivität der Glioblastomzelllinie U251MG

wurde unter normoxischen Bedingungen (Hypoxie nicht analysiert) weder durch die Reduktion der Genexpression aller *OPN*-Varianten mittels *OpnS*-siRNA noch durch die gleichzeitige Reduktion der Genexpression der Spleißvarianten *OPN-a* und *OPN-c* mit Hilfe der siRNA *OpnAC* beeinflusst [Güttler *et al.*, 2013]. In der Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-231 wurde nach Reduktion der *OPN*-Genexpression durch die siRNA *OpnS* unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen eine leichte Radiosensitivierung erzielt (Abbildung 2-2) [Hahnel *et al.*, 2010]. Die unterschiedlich großen mRNA- und Proteingehalte von *OPN* in den Zelllinien U251MG und MDA-MB-231 sind eine mögliche Erklärung für die unveränderte Radiosensitivität der Zelllinie U251MG nach Reduktion der *OPN*-Genexpression. Trotz der siRNA-bedingten Reduktion ist der *OPN*-mRNA-Gehalt in der Zelllinie U251MG noch deutlich höher als in den unbehandelten MDA-MB-231-Zellen. Das noch verbleibende *OPN* verhindert womöglich eine Sensitivierung der Zelllinie U251MG gegenüber der Bestrahlung. Möglicherweise kann unter hypoxischen Bedingungen ein besserer Effekt der Reduktion der *OPN*-Genexpression auf die Radiosensitivität der U251MG-Zellen erreicht werden. In Mammakarzinomzellen führte die Reduktion der *OPN*-Genexpression unter Hypoxie zu einer Reduktion des HIF-1 $\alpha$ - und VEGF-Proteingehalts [Yang *et al.*, 2012b]. Zusätzliche Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe zeigten, dass die Reduktion der *HIF-1 $\alpha$* -Genexpression mittels siRNA unter hypoxischen Bedingungen zu einer deutlichen Radiosensitivierung in U251MG-Zellen führte [Kessler *et al.*, 2010].

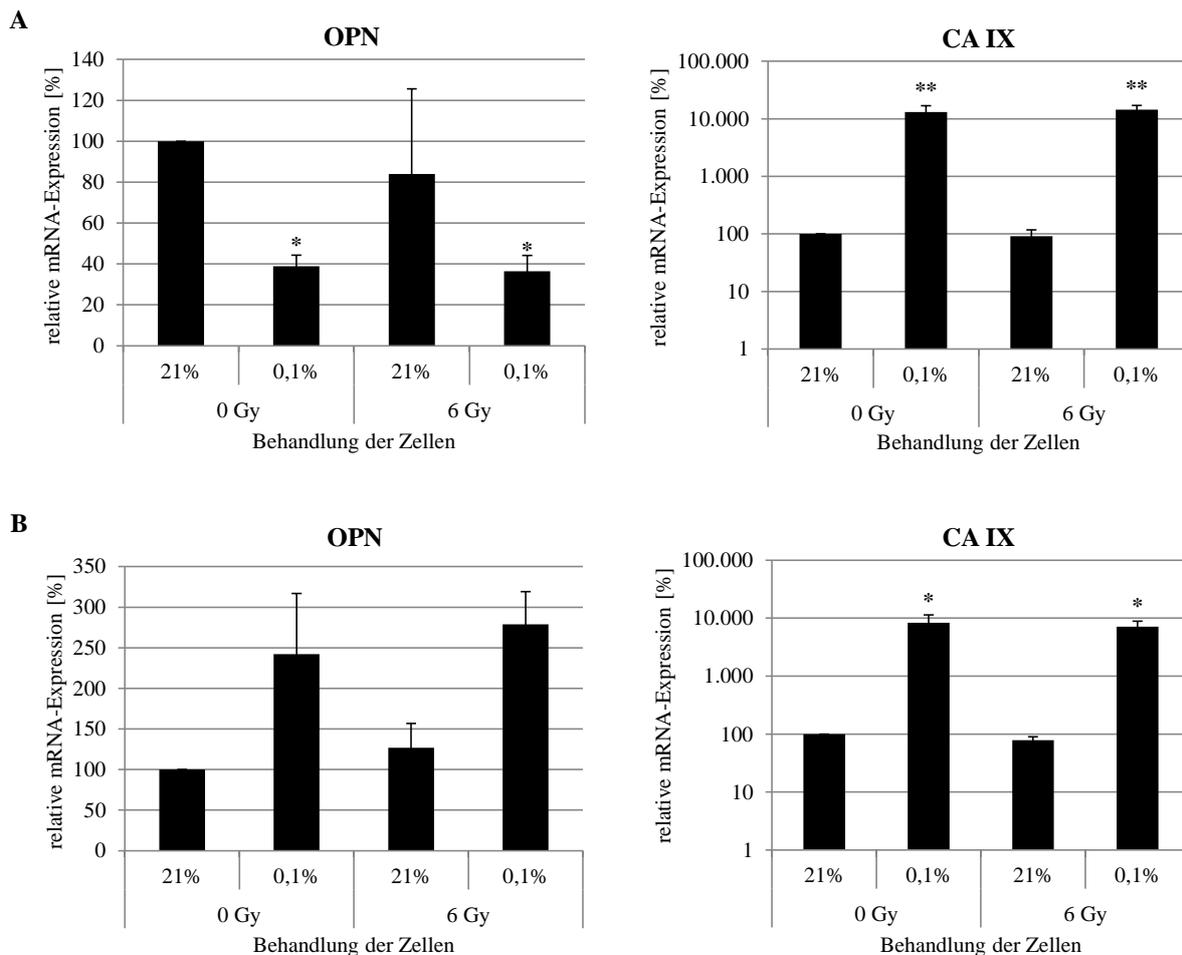
Insgesamt zeigten die Untersuchungen zur Bedeutung der *OPN*-Spleißvarianten in der Glioblastomzelllinie U251MG, dass die Reduktion der Genexpression der Spleißvarianten *OPN-a* und *OPN-c* lediglich zu einer Reduktion des klonogenen Überlebens führte. Um eine Reduktion der Proliferation und Migration sowie eine Induktion der Apoptose und einen G2M-Arrest in der Glioblastomzelllinie U251MG erzielen zu können, musste eine Reduktion der Genexpression aller *OPN*-Spleißvarianten erfolgen. Eine Radiosensitivierung der U251MG-Zellen konnte durch die Reduktion der Genexpression der *OPN*-Spleißvarianten nicht erreicht werden. Die Überexpressionsstudien zeigten, dass die einzelnen *OPN*-Spleißvarianten unterschiedlich in der Zelle lokalisiert waren und somit auch einen unterschiedlichen Einfluss auf verschiedene zellphysiologische Prozesse haben können.

### **2.1.3 *OPN*-Genexpression unter Normoxie und Hypoxie in verschiedenen Tumorzelllinien**

Die Bedeutung von Osteopontin in Gliomzellen ist im Zusammenhang mit Hypoxie bzw. als Hypoxiemarker bisher kaum untersucht. Immunhistochemische Untersuchungen von hochgradigen Gliomen zeigen, dass 72 % der *OPN*-positiven Zellen in der Nähe von perinekrotischen Gewebsarealen zu finden waren [Erpolat *et al.*, 2013]. Diese kennzeichnen schlecht durchblutete bzw. hypoxische Bereiche. Außerdem waren sowohl eine positive *OPN*-Färbung (IHC) als auch ein hoher sogenannter „Hypoxiescore“ (bestehend aus HIF-1 $\alpha$ , CA IX und *OPN*) mit einem signifikant schlechteren medianen Gesamt- und progressionsfreien Überleben assoziiert (Kaplan-Meier-Analyse:

OPN:  $p = 0,007$  und  $p = 0,047$  bzw. „Hypoxiescore“:  $p = 0,002$  und  $p = 0,047$ ; Log-Rank-Test [Erpolat *et al.*, 2013]. Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe an Glioblastompatienten zeigten eine signifikante positive Korrelation zwischen dem *OPN*-mRNA-Gehalt und dem mRNA-Gehalt der hypoxieassoziierten Gene *HIF-2A*, *CA9*, *GLUT1* und *VEGF* [Bache *et al.*, 2015]. Zudem hatten Glioblastompatienten mit einem erhöhten mRNA-Gehalt von *OPN*, *HIF-2A*, *CA9* und *GLUT1* ein 2,1-fach erhöhtes relatives Risiko am Tumor zu versterben (univariate Cox-Regression: 95 % KI = 0,95-4,79;  $p = 0,07$ ) [Bache *et al.*, 2015]. In einer weiteren Studie an Bronchialkarzinompatienten wurde aus den Plasmaspiegeln von OPN, CA IX und VEGF ein sogenannter „Hypoxiescore“ erstellt. Ein erhöhter Proteingehalt all dieser Marker im Plasma war ebenfalls mit einer schlechteren Patientenprognose assoziiert (multivariate Cox-Regression: RR = 2,9; 95 % KI = 1,6–14,4;  $p = 0,03$ ) [Ostheimer *et al.*, 2014a]. Die Bedeutung von OPN im Zusammenhang mit Tumorphoxie ist in Kopf-Hals-Tumoren gut untersucht und verschiedene Studien zeigen eine negative Korrelation zwischen dem OPN-Proteingehalt im Tumor bzw. Plasma und dem Sauerstoffpartialdruck im Tumor [Bache *et al.*, 2006; Le *et al.*, 2003], allerdings gibt es zu anderen Tumorentitäten noch sehr wenige bzw. auch widersprüchliche Daten [Bache *et al.*, 2008].

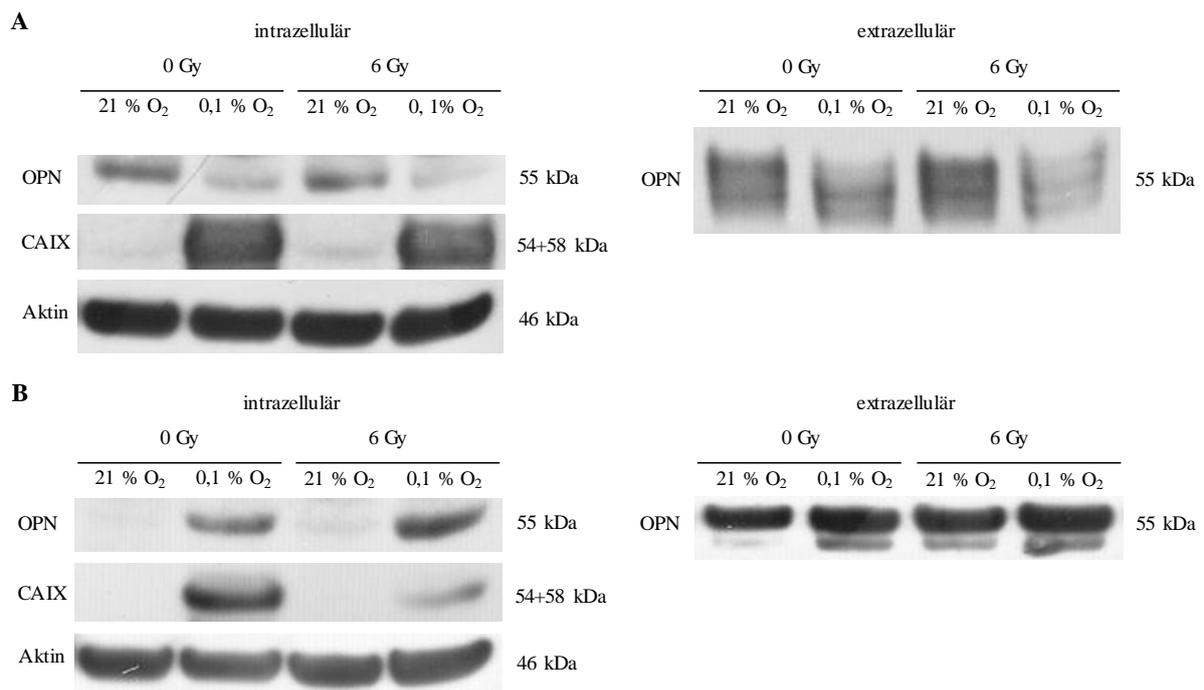
In eigenen Untersuchungen wurden elf Zelllinien unterschiedlicher Tumorentitäten nach vierstündiger Kultivierung unter normoxischen (21 % O<sub>2</sub>) bzw. hypoxischen (0,1 % O<sub>2</sub>) Bedingungen mit 6 Gy bestrahlt und nach weiteren 24 h geerntet. In den beiden Tumorzelllinien MDA-MB-231 und XF354 zeigte sich keine Änderung des *OPN*-mRNA-Gehalts nach hypoxischer Kultivierung (Tabelle 2-2). Bei einem Großteil der untersuchten Tumorzelllinien (SKLMS-1, US 8/93, HT-1080, FaDu, Cal33, U251MG und LN-229) wurde dagegen eine deutliche Reduktion des *OPN*-mRNA-Gehalts nachgewiesen. Beispielsweise wurde in der WTS-Zelllinie US 8/93 nach Hypoxieexposition eine Reduktion des *OPN*-mRNA-Gehalts um 61 % beobachtet. Die zusätzliche Bestrahlung mit 6 Gy hatte unabhängig von der Sauerstoffkonzentration keinen Effekt auf den *OPN*-mRNA-Gehalt (Abbildung 2-9 A). Lediglich in den Zelllinien SAS und SF767 führte die Kultivierung unter hypoxischen Bedingungen zu einer Steigerung des *OPN*-mRNA-Gehalts. In der HNO-Zelllinie SAS wurde unter Hypoxie sowohl bei unbestrahlten als auch bei den bestrahlten Zellen eine Steigerung des mRNA-Gehalts von *OPN* um das 2,5-fache beobachtet (Abbildung 2-9 B). Zusätzlich wurde der mRNA- und Proteingehalt der HIF-1 $\alpha$  induzierten CA IX als stabiler Hypoxiemarker untersucht. In allen Zelllinien wurde nach Kultivierung unter hypoxischen Bedingungen (0,1 % O<sub>2</sub>) unabhängig von der Bestrahlung ein starker Anstieg des mRNA-Gehalts von *CA9* nachgewiesen (Abbildung 2-9).



**Abbildung 2-9: mRNA-Gehalt von *OPN* und *CA9* in den Zelllinien US 8-93 und SAS**

Die Zelllinien US 8-93 (A) und SAS (B) wurden unter normoxischen (21 % O<sub>2</sub>) bzw. hypoxischen Bedingungen (0,1 % O<sub>2</sub>) kultiviert und bestrahlt. 24 h später wurden die Zellen geerntet und der mRNA-Gehalt von *OPN* und *CA9* mittels qPCR bestimmt. In Abhängigkeit von der Zelllinie wurden verschiedene Referenzgene verwendet. Bei der WTS-Zelllinie US 8-93 wurde *HPRT* (Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase) und bei der HNO-Zelllinie SAS *GusB* (β-Glucuronidase) verwendet. Die unbestrahlten Zellen unter Normoxie wurden auf 100 % gesetzt. Die Daten repräsentieren den Mittelwert (±Standardabweichung) aus mindestens drei voneinander unabhängigen Versuchen (\* p ≤ 0,05 und \*\* p ≤ 0,001 vs. unbestrahlte Kontrollzellen unter Normoxie).

Die Analysen zeigten eine deutliche Korrelation zwischen dem mRNA- und Proteingehalt des OPN. In sieben untersuchten Zelllinien, bei denen die hypoxische Kultivierung zu einer Reduktion des mRNA-Gehalts von *OPN* geführt hat, zeigte sich auch eine Reduktion des OPN-Proteingehalts. Sowohl der intrazelluläre (Zelllysate) als auch der extrazelluläre OPN-Proteingehalt (Zellüberstand) war nach Kultivierung der Zellen unter Hypoxie deutlich reduziert (Bsp. WTS-Zelllinie US 8/93, Abbildung 2-10 A). Im Gegensatz dazu wurde in den beiden Zelllinien SAS und SF767 ein Anstieg des intra- und extrazellulären OPN-Proteingehalts nach Hypoxieexposition beobachtet (Abbildung 2-10 B). In allen untersuchten Zelllinien wurde die Induktion des CA IX-Proteingehalts als Nachweis für die hypoxische Kultivierung verwendet (Abbildung 2-10).



**Abbildung 2-10: OPN- und CA IX-Proteingehalt in den Zelllinien US 8/93 und SAS**

Die Zelllinien US 8-93 (A) und SAS (B) wurden unter normoxischen (21 % O<sub>2</sub>) bzw. hypoxischen Bedingungen (0,1 % O<sub>2</sub>) in serumfreien Medium kultiviert und bestrahlt. Nach 24 h wurde der Zellüberstand aufkonzentriert, die Zellen geerntet und die Proteine mittels RIPA-Puffer isoliert. Die Analyse des intrazellulären Proteingehalts (OPN und CA IX) aus dem Zelllysate sowie des extrazellulären OPN-Proteingehalts aus dem Zellüberstand erfolgte mittels Western Blot (n = 4 bzw. n = 3). Aktin diente als interne Ladekontrolle.

Die eigenen Untersuchungen zeigten deutlich, dass der Einfluss der Hypoxie auf OPN sehr stark von der untersuchten Zelllinie abhängt. Aber auch in der Literatur gibt es sehr unterschiedliche Beobachtungen zum Einfluss von Hypoxie auf OPN. In renalen Epithelzellen beobachteten Hampel und Mitarbeiter (2003) einen deutlichen Anstieg des intrazellulären OPN-Proteingehalts unter hypoxischen Bedingungen [Hampel *et al.*, 2003]. Während in der Gliomzelllinie U87MG, den Kolorektalkarzinomzelllinien HAT-29 und HCT-116 sowie den HNO-Zelllinien HK1, HONE-1, C666-1 und CNE-1 keine Änderung des OPN-Proteingehalts nach Hypoxieexposition nachgewiesen wurde, zeigte sich in der Bronchialkarzinomzelllinie A549 und der HNO-Zelllinie FaDu eine Reduktion des OPN-Proteingehalts [Hui *et al.*, 2008; Said *et al.*, 2005]. In den beiden HNO-Zelllinien SCC4 und SCC22B sowie in NIH-3T3-Zellen, Osteozyten und der Zervixkarzinomzelllinie SiHa wurde hingegen eine Induktion des mRNA- bzw. Proteingehalts von OPN unter hypoxischen Bedingungen nachgewiesen [Raheja *et al.*, 2008; Sorensen *et al.*, 2007; Zhu *et al.*, 2005]. Außerdem deuten einige Studien darauf hin, dass die Regulation der *OPN*-Genexpression unter Hypoxie sowohl von der Zelllinie abhängt, als auch durch die Dauer der Hypoxieexposition beeinflusst wird. Sodhi und Mitarbeiter (2000, 2001) beobachteten in Mesangiumzellen und vaskulären glatten Muskelzellen der Ratte, dass die Regulation des mRNA- und Proteingehalts von OPN durch die Dauer der

Sauerstoffabwesenheit beeinflusst wird. Es zeigte sich eine frühe und späte Induktion des mRNA- und Proteingehalts von OPN nach 2 h und 12 h bzw. 24 h [Sodhi *et al.*, 2000; Sodhi *et al.*, 2001b]. Le und Mitarbeiter (2003) beobachteten in der HNO-Zelllinie SCC4 lediglich nach 12-stündiger Hypoxieexposition, nicht aber nach 24 h, einen deutlichen Anstieg des intrazellulären OPN-Proteingehalts im Vergleich zur normoxischen Kultivierung. Im Gegensatz dazu stieg der extrazelluläre OPN-Proteingehalt (Zellüberstand) innerhalb der 24-stündigen Hypoxieexposition stetig an [Le *et al.*, 2003]. Dies zeigt, dass die Dauer der Hypoxieexposition den intra- bzw. extrazellulären OPN-Proteingehalt unterschiedlich beeinflusst. In den elf untersuchten Zelllinien wurden ebenfalls zum Teil unterschiedliche Effekte auf den intra- bzw. extrazellulären Proteingehalt nach 24-stündiger Hypoxieexposition beobachtet (Tabelle 2-2). In den beiden Zelllinien FaDu und U251MG blieb der intrazelluläre OPN-Proteingehalt nach Hypoxieexposition unbeeinflusst. Allerdings wurde in diesen Zelllinien eine Reduktion des extrazellulären Proteingehalts im Vergleich zur normoxischen Kultivierung nachgewiesen (Tabelle 2-2). Zudem zeigten Hampel und Mitarbeiter, dass OPN nach Hypoxieexposition in renalen Epithelzellen im Vergleich zur Normoxie unterschiedlich lokalisiert war [Hampel *et al.*, 2003].

**Tabelle 2-2: Einfluss der Hypoxie (0,1 % O<sub>2</sub>) auf den mRNA- und Proteingehalt von OPN in verschiedenen Tumorzelllinien**

Tumorentität	Zelllinie	OPN-mRNA-Gehalt	OPN-Proteingehalt	
			intrazellulär	extrazellulär
Weichteilsarkome	SKLMS-1	↓ (-56 %)*	↓	→
	US 8-93	↓ (-61 %)*	↓	↓
	HT-1080	↓ (-67 %)*	n.d.	↓
Mammakarzinome	MDA-MB-231	→	→	→
Kopf-Hals-Tumore	FaDu	↓ (-40 %)*	→	↓
	Cal33	↓ (-47 %)	↓	↓
	SAS	↑ (+142 %)	↑	↑
	XF354	↓ (-32 %)	→	→
Glioblastome	U251MG	↓ (-34 %)	→	↓
	LN-229	↓ (-54 %)	↓	↓
	SF767	↑ (+164 %)*	n.d.	↑

↓: Zunahme, ↑: Abnahme, →: keine Änderung, n.d.: nicht detektierbar, \* p ≤ 0,05)

Außerdem ist es möglich, dass auch der Sauerstoffgehalt eine Rolle bei der OPN-Regulation spielt. Während mit den verwendeten „Gaspacks“ eine Sauerstoffkonzentration von ca. 0,1 % erreicht wird, wurden die Zellen in anderen Studien beispielsweise 1 % O<sub>2</sub> [Raheja *et al.*, 2008] bzw. 3 % O<sub>2</sub> [Sodhi *et al.*, 2000; Sodhi *et al.*, 2001a; Sodhi *et al.*, 2001b] kultiviert. Sorensen und Mitarbeiter (2005) konnten zeigen, dass in SiHa-Zellen erst bei 0 % O<sub>2</sub> der maximale OPN-mRNA-Gehalt erreicht wurde, während bei anderen Genen wie z. B. CA9 und GLUT1 bei Sauerstoffkonzentrationen von 1 %

bzw. 0,1 % der maximale mRNA-Gehalt erreicht wurde [Sorensen *et al.*, 2005]. Eigene Untersuchungen bestätigen dies. In vielen Zelllinien wurde erst bei einer Sauerstoffkonzentration von 0,1 %, nicht aber bei 1 % O<sub>2</sub>, eine Änderung des mRNA- bzw. Proteingehalts von OPN beobachtet (Daten nicht gezeigt).

Wie bereits mehrfach beschrieben, wird OPN unter Hypoxie unterschiedlich reguliert. Dies könnte unter anderem darauf zurückzuführen sein, dass die unzureichende Sauerstoffversorgung in den Zellen zu einer Umstellung des Zellstoffwechsels führt. Steht den Zellen kein oder nur sehr wenig Sauerstoff zur Verfügung, wird zur schnellen Energiegewinnung Pyruvat zu Laktat reduziert. Die damit verbundene Ansäuerung des Tumormikromilieus führt zu einem deutlichen Absinken des pH-Wertes. Da dieser Stoffwechselweg deutlich weniger Energie liefert, haben hypoxische Tumore einen erhöhten Zuckerbedarf (erhöhte Aufnahme und gesteigerter Verbrauch). Beide Parameter haben nachweislich ebenfalls einen Einfluss auf die *OPN*-Genexpression. Ein hohes Glukoseangebot führte unabhängig von der Sauerstoffkonzentration in vaskulären glatten Muskelzellen der Ratte und in Mesangiumzellen zu einer deutlichen Induktion des mRNA- und Proteingehalts von OPN [Sodhi *et al.*, 2001a; Sodhi *et al.*, 2001b]. Die *OPN*-Genexpression bleibt auch durch die Ansäuerung bzw. den niedrigen pH-Wert des Mediums als typische Folge hypoxischer Bedingungen nicht unbeeinflusst. Erste Untersuchungen an primären Knochenzellen der Maus zeigten nach 36-tägiger Kultivierung in normalem Medium (pH 7,5) einen deutlichen Anstieg des *OPN*-mRNA-Gehalts. Diese Induktion des *OPN*-mRNA-Gehalts wurde bei der Kultivierung im azideren Medium (pH 7,1) fast vollständig unterdrückt [Frick und Bushinsky, 1998]. Unter normoxischen Bedingungen konnte der *OPN*-mRNA-Gehalt der Zervixkarzinomzelllinie SiHa bei pH-Werten unter 7,5 nicht mehr detektiert werden [Sorensen *et al.*, 2007]. Hingegen induzierte Sauerstoffmangel, welcher in SiHa-Zellen zu einer Induktion der *OPN*-Genexpression führte, unter aziden Bedingungen (pH 6,3) eine deutliche Reduktion der *OPN*-Genexpression [Sorensen *et al.*, 2005].

Insgesamt zeigte sich, dass die Effekte der Hypoxie auf die *OPN*-Genexpression durch verschiedene Parameter beeinflusst werden. Diese spielen nicht nur *in vitro*, sondern auch *in vivo* eine wichtige Rolle. Dazu zählen die Dauer der Hypoxie, die Sauerstoffkonzentration (Definition der Hypoxie), der Zelltyp (Tumorentität), der extrazelluläre pH-Wert und die Stoffwechselaktivität (Glukoseangebot). Dass Resultate aus *in vitro*-Beobachtungen nicht einfach auf *in vivo*-Analysen übertragen werden können, zeigte eine Untersuchung von Li und Mitarbeitern. Obwohl *in vitro* nach 24-stündiger Kultivierung von glatten Muskelzellen der Lungenarterie bei 1 % O<sub>2</sub> keine Änderung des mRNA-Gehalts von *OPN* beobachtet wurde, zeigte sich in den Lungen von adulten Ratten nach zweiwöchiger Exposition bei 10 % O<sub>2</sub> ein deutlicher Anstieg des *OPN*-mRNA-Gehalts [Li *et al.*, 2004].

## 2.2 Bedeutung von Osteopontin bzw. der OPN-Spleißvarianten als Tumor-, Prognose- und Hypoxiemarker *in vivo*

*In vivo* ist die Bedeutung von OPN als Tumor- und potenzieller Hypoxiemarker vor allem bei Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren sehr gut untersucht. Zahlreiche Studien an Kopf-Hals-Tumorpatienten zeigten einen deutlichen Zusammenhang zwischen Tumorphoxie und einem erhöhten OPN-Proteingehalt. Dabei korrelierte ein erhöhter OPN-Proteingehalt im Tumor oder Plasma mit einem schlechten Ansprechen auf eine Radiotherapie, einer schlechten Prognose und mit dem Auftreten von Rezidiven [Hui *et al.*, 2008; Le *et al.*, 2003; Overgaard *et al.*, 2005]. In anderen Tumorentitäten, wie z. B. Weichteilsarkomen, Gliomen und Bronchialkarzinomen, ist die Bedeutung von OPN als Tumor- oder Prognosemarker weniger gut untersucht.

### 2.2.1 In Weichteilsarkomen

Sarkome, zu denen neben den Weichteilsarkomen auch die Osteosarkome zählen, machen nur einen sehr kleinen Teil der malignen Tumorerkrankungen (1 %) aus. Darüber hinaus gibt es nur sehr wenige Informationen über gute diagnostische oder prognostische Marker. Aufgrund fehlender typischer Tumorsymptome werden (Weichteil)sarkome oft erst sehr spät erkannt, und zumeist haben sich bei den Patienten zum Diagnosezeitpunkt schon Metastasen gebildet. Die frühzeitige Erkennung der Erkrankung mittels molekularer Marker kann dabei hilfreich sein, ein optimales Therapiekonzept zur Verbesserung der Patientenprognose zu entwickeln. Erste Anhaltspunkte deuten darauf hin, dass OPN als Prognosemarker bei (Weichteil)sarkomen eine Rolle spielen könnte. Mittels Microarray-Analysen wurde *SPPI*, welches für OPN kodiert, als eines der Gene identifiziert, dessen Expression in Osteosarkomzellen im Vergleich zu normalen Osteoblasten deutlich erhöht war (23-fach) [Sadikovic *et al.*, 2009]. Beim Vergleich des mRNA-Gehalts potenzieller Marker von 22 Osteosarkom- und 5 Osteoblastenproben stellte sich heraus, dass von allen Markern der mRNA-Gehalt von *OPN* am stärksten erhöht war (103-fach) [Sadikovic *et al.*, 2010].

Die Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe erfolgten in einem Kollektiv von 93 Patienten mit primären WTS [Bache *et al.*, 2010]. Mittels ELISA und qPCR wurde der OPN-Proteingehalt im Serum (n=86) sowie im Tumorgewebe (n=80) und der *OPN*-mRNA-Gehalt im Tumorgewebe (n=68) bestimmt. Es zeigte sich ein deutlicher Zusammenhang zwischen dem OPN-Proteingehalt und verschiedenen klinischen Parametern (Tabelle 2-3). Ein hoher OPN-Proteingehalt im Serum (> kleinstes Quartil) korrelierte signifikant mit dem Tumorstadium, dem Tumorgrad und der Tumorgroße. Es konnte allerdings keine Korrelation zum OPN-Proteingehalt des Tumors nachgewiesen werden. Dieser war seinerseits signifikant mit dem Tumorgrad sowie der Rezidivrate assoziiert und zeigte eine tendenzielle Assoziation mit dem Tumorstadium. Bisherige Untersuchungen zur Bedeutung von OPN in (Weichteil)sarkomen basieren hauptsächlich auf der immunhistochemischen Analyse des OPN-Proteingehalts. Bramwell und Mitarbeiter (2005) konnten bei WTS-Patienten eine signifikante positive Korrelation zwischen einem erhöhten OPN-Proteingehalt

(IHC) und dem Tumorstadium bzw. dem Tumorgrad nachweisen [Bramwell *et al.*, 2005]. Bei primären Sarkomen der pulmonalen Arterie zeigte sich eine starke OPN-Färbung (IHC) in den Tumorzellen, aber auch in der extrazellulären Matrix [Gaumann *et al.*, 2001]. Bei Osteoblasten aus Bereichen der Knochenneubildung konnte immunhistochemisch (fast) kein OPN nachgewiesen werden. Allerdings zeigte sich sowohl in Osteoblasten des Osteoblastoms als auch in Osteosarkomzellen eine positive OPN-Färbung [Sulzbacher *et al.*, 2002]. Weiterhin zeigten mRNA-Untersuchungen, dass ca. 90 % aller untersuchten Osteosarkome einen erhöhten *OPN*-mRNA-Gehalt aufweisen [Dalla-Torre *et al.*, 2006]. Bei WTS war der *OPN*-mRNA-Gehalt im Tumorgewebe im Vergleich zum umliegenden Gewebe ebenfalls stark erhöht [Bramwell *et al.*, 2005]. Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe konnten keinen Zusammenhang zwischen dem *OPN*-mRNA-Gehalt und klinischen Parametern bzw. der Prognose der WTS-Patienten nachweisen [Bache *et al.*, 2010].

Aber es zeigte sich, dass der OPN-Proteingehalt im Serum und im Tumor eine prognostische Relevanz bei WTS-Patienten hatte [Bache *et al.*, 2010]. In beiden Fällen korrelierte ein niedriger OPN-Proteingehalt ( $\leq$  kleinstes Quartil) mit einem signifikant besseren Überleben. Mittels Kaplan-Meier-Analyse errechnete sich für Patienten mit einem niedrigen OPN-Serumgehalt eine mittlere Überlebenszeit von 103 Monaten, während Patienten mit einem hohen OPN-Serumgehalt eine deutlich kürzere Überlebenszeit von lediglich 60 Monaten aufwiesen ( $p = 0,04$ ; Log-Rank-Test) (Tabelle 2-3). Patienten mit einem hohen OPN-Proteingehalt im Tumor zeigten im Vergleich zu Patienten mit einem niedrigen OPN-Proteingehalt im Tumor ebenfalls ein signifikant schlechteres Überleben (Kaplan-Meier-Analyse: 58 vs. 68 Monate;  $p = 0,007$ ; Log-Rank-Test). Die univariaten Cox-Regressionsanalysen zeigten, dass Patienten mit einem hohen OPN-Proteingehalt im Serum bzw. im Tumor ein 2,2- bzw. 3,7-fach erhöhtes relatives Risiko aufwiesen am Tumor zu versterben (Tabelle 2-3) [Bache *et al.*, 2010]. In Übereinstimmung damit war in einer kleineren Studie an 33 Weichteilsarkompatienten ein erhöhter OPN-Proteingehalt (IHC) im Tumor ebenso mit einem schlechteren Gesamtüberleben assoziiert (Cox-Regression:  $RR = 1,41$ ; 95 %  $KI = 1,10-1,81$ ;  $p = 0,008$ ) [Bramwell *et al.*, 2005]. Im Gegensatz dazu konnte bei Osteosarkompatienten keine Korrelation zwischen einem erhöhten OPN-Proteingehalt (IHC) im Tumor und dem krankheitsfreien bzw. Gesamtüberleben nachgewiesen werden (Kaplan-Meier-Analyse: beide  $p > 0,05$ ; Log-Rank-Test) [Sulzbacher *et al.*, 2002]. Eine weitere Studie an Osteosarkomen zeigte jedoch, dass der *OPN*-mRNA-Gehalt signifikant mit einem besseren Gesamtüberleben assoziiert war (Kaplan-Meier-Analyse:  $p = 0,001$ ; Log-Rank-Test) [Dalla-Torre *et al.*, 2006].

**Tabelle 2-3: Klinische und histopathologische Parameter des WTS-Patientenkollektivs (modifiziert nach [Bache *et al.*, 2010])**

Parameter	OPN-Proteingehalt im Serum [ng/ml]		OPN-Proteingehalt im Tumor [ng/mg]		OPN-mRNA-Gehalt im Tumor [Kopien/pg <i>HPRT</i> ]	
	≤ 516,54	< 516,54	≤ 34,34	< 34,34	≤ 0,576	< 0,576
Gesamt	21	65	20	60	17	51
Tumorstadium	<b>p = 0,004*</b>		p = 0,06		p = 0,21	
<i>I</i>	8	6	7	6	5	7
<i>II</i>	10	27	7	25	7	19
<i>III</i>	2	24	4	22	5	17
<i>IV</i>	1	8	2	7	0	8
Histologischer Subtyp	<b>p = 0,002*</b>		p = 0,07		p = 0,19	
<i>Liposarkome</i>	12	9	10	11	5	13
<i>Fibrosarkome + MFH<sup>1</sup></i>	4	20	3	17	6	11
<i>neurogene Sarkome</i>	0	8	2	5	2	1
<i>RMS + LMS</i>	3	19	4	18	3	17
<i>andere WTS</i>	2	9	1	9	1	9
Tumorgröße	<b>p = 0,03*</b>		p = 0,85		p = 0,24	
<i>T1</i>	6	6	3	8	1	9
<i>T2</i>	15	59	17	52	16	42
Wiederauftreten	p = 0,41		<b>p = 0,02*</b>		p = 0,88	
<i>R0</i>	15	40	17	34	12	35
<i>R1</i>	6	25	3	26	5	16
Kaplan-Meier-Analyse	<b>p = 0,04*</b>		<b>p = 0,007*</b>		p = 0,2	
<i>mittleres Überleben [Monate]</i>	103	60	68	58	72	65
univariate	<b>p &lt; 0,05*</b>		<b>p = 0,01*</b>		p = 0,21	
Cox-Regressionsanalyse						
<i>relatives Risiko</i>	2,2		3,7		1,7	
<i>Konfidenzintervall</i>	1,0 - 5,1		1,3 - 10,4		0,7 - 4,3	

Die Unterteilung der Patienten erfolgte in zwei Gruppen entsprechend des Medians des *OPN*-mRNA-Gehalts im Tumor bzw. des *OPN*-Proteingehalts im Serum bzw. Tumor. WTS: Weichteilsarkom; *OPN*: Osteopontin; *HPRT*: Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase; *RMS*: Rhabdomyosarkom; *LM*: Leiomyosarkom; *T1* ≤ 5 cm; *T2* > 5 cm; *R0*: Rezidiv; *R1*: Rezidiv; \* p ≤ 0,05

<sup>1</sup>Nach neuer Einteilung gehören maligne fibröse Histiocytoome (MFH) nicht mehr zur Gruppe der fibrohistiozytischen Tumore. Der Begriff MFH wird nicht mehr verwendet und wurde durch den Begriff des undifferenzierten Sarkoms ersetzt [Petersen, 2013].

Zur prognostischen Bedeutung der *OPN*-Spleißvarianten gibt es jedoch nur sehr wenige Studien. Die erste Studie wurde an Mammakarzinompatienten durchgeführt [Patani *et al.*, 2008]. Der

mRNA-Gehalt von *OPN-a* hatte keine prognostische Relevanz. Der mRNA-Gehalt der Spleißvarianten *OPN-b* bzw. *OPN-c* war hingegen signifikant mit dem Gesamtüberleben assoziiert (Kaplan-Meier-Analyse: *OPN-b*:  $p = 0,022$ ; *OPN-c*:  $p = 0,016$ ; Log-Rank-Test) [Patani *et al.*, 2008]. Courter und Mitarbeiter (2010) konnten die Spleißvarianten *OPN-a* und *OPN-b* erstmalig auch in Weichteilsarkomen nachweisen [Courter *et al.*, 2010]. Die eigenen Untersuchungen an 124 WTS-Patienten waren die zweite Studie zur prognostischen Bedeutung der *OPN*-Spleißvarianten *OPN-a*, *OPN-b* und *OPN-c* [Hahnel *et al.*, 2012]. In unserem WTS-Patientenkollektiv zeigte sich wie bei Courter und Mitarbeitern (2010), dass der mRNA-Gehalt der beiden Varianten *OPN-a* und *OPN-b* deutlich höher ist als der mRNA-Gehalt der Spleißvariante *OPN-c* (Tabelle 2-4: Mann-Whitney-U-Test: *OPNc* vs. *OPNa* bzw. *OPNb*: beide  $p \leq 0,001$ ) [Hahnel *et al.*, 2012]. Auch in Leberzell- und Mammakarzinomen bzw. Mesotheliomen war der mRNA-Gehalt von *OPN-c* von allen drei Spleißvarianten am niedrigsten [Chae *et al.*, 2009; Ivanov *et al.*, 2009; Patani *et al.*, 2008]. Obwohl die mRNA-Gehalte der *OPN*-Spleißvarianten eine mittlere bis hohe Korrelation aufwiesen ( $r = 0,84-0,95$ ;  $p < 0,01$ ), zeigte sich nur eine geringe Korrelation zum mRNA-Gehalt von Gesamt-*OPN* ( $r = 0,26-0,32$ ;  $p < 0,05$ ) [Hahnel *et al.*, 2012]. Dies ist möglicherweise auf die unterschiedlichen Patientenzahlen der beiden Untersuchungen zurückzuführen (Gesamt-*OPN*:  $n = 65$  [Bache *et al.*, 2010] vs. *OPN*-Spleißvarianten:  $n = 124$  [Hahnel *et al.*, 2012]). Beim Vergleich von 15 WTS-Gewebeproben und dem umliegenden „Normalgewebe“ war der mRNA-Gehalt der beiden Spleißvarianten *OPN-b* und *OPN-c* im Tumorgewebe um das 2,9- bzw. 3,4-fache erhöht (Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test:  $p = 0,07$  bzw.  $p = 0,06$ ) (Tabelle 2-4). Im Gegensatz dazu war der mRNA-Gehalt von *OPN-a* im Tumor im Vergleich zum umliegenden „Normalgewebe“ unverändert [Hahnel *et al.*, 2012]. In anderen Tumorentitäten, wie z. B. Leberzellkarzinomen, Mesotheliomen und Glioblastomen, zeigte sich ebenfalls ein erhöhter mRNA-Gehalt der *OPN*-Spleißvarianten im Vergleich zum Normalgewebe [Chae *et al.*, 2009; Ivanov *et al.*, 2009; Yan *et al.*, 2010]. Vor allem in Mamma-, Ovarial- und Prostatakarzinomen wurde ein erhöhter mRNA-Gehalt von *OPN-b* und *OPN-c* nachgewiesen (Übersicht in [Gimba und Tilli, 2013]). Bei Mammakarzinomen konnte mehrfach gezeigt werden, dass *OPN-c* nur im Tumorgewebe, aber nicht im Normalgewebe nachweisbar war und somit möglicherweise ein selektiver Tumormarker bei Mammakarzinomen ist [He *et al.*, 2006; Mirza *et al.*, 2008].

**Tabelle 2-4: Medianer mRNA-Gehalt der OPN-Spleißvarianten [Kopien OPN/Kopien HPRT] im Tumorgewebe und im umliegenden „Normalgewebe“ bei WTS-Patienten**

OPN-Spleißvariante	Tumorgewebe (n = 124)	Tumorgewebe (n = 15)	umliegendes „Normalgewebe“ (n = 15)
<i>OPN-a</i>	0,68 (9,30*10 <sup>-4</sup> - 85,29)	0,77 (3,73*10 <sup>-2</sup> - 16,08)	0,66 (5,80*10 <sup>-2</sup> - 30,19)
<i>OPN-b</i>	0,49 (0.00 - 17.64)	0,55 (3,32*10 <sup>-2</sup> - 10,60)	0,19 (7,2*10 <sup>-3</sup> - 3,98)
<i>OPN-c</i>	0,082 (0.00 - 4.03)	0,11 (5,66*10 <sup>-3</sup> - 4,03)	0,034 (9,55*10 <sup>-4</sup> - 0,67)

OPN: Osteopontin; HPRT: Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase; WTS: Weichteilsarkom; n: Anzahl der Patienten

Aus den bivariaten Korrelationsanalysen geht hervor, dass alle drei Spleißvarianten signifikant mit dem Tumorgrad korrelieren. Grad 3-Tumore sind mit einem erhöhten mRNA-Gehalt von *OPN-a*, *OPN-b* und *OPN-c* assoziiert [Hahnel *et al.*, 2012]. In Gliomen konnte ebenfalls ein positiver Zusammenhang zwischen dem mRNA-Gehalt aller Spleißvarianten und dem Tumorgrad nachgewiesen werden [Saitoh *et al.*, 1995; Yan *et al.*, 2010]. Bei Mammakarzinomen korrelierte lediglich der mRNA-Gehalt der Spleißvarianten *OPN-b* und *OPN-c* mit dem Tumorgrad, während der mRNA-Gehalt von *OPN-a* nicht mit dem Tumorgrad assoziiert war [Patani *et al.*, 2008].

In den eigenen Analysen wiesen WTS-Patienten mit Lymphknotenmetastasen einen erhöhten mRNA-Gehalt von *OPN-c* auf. Dies unterstützt die Vermutung, dass *OPN-c* eine besondere Rolle für die Tumorprogression spielt [Hahnel *et al.*, 2012]. Auch bei Magenkarzinomen war einzig ein erhöhter mRNA-Gehalt von *OPN-c* signifikant mit mehr Lymphknotenmetastasen assoziiert [Tang *et al.*, 2013]. Aber auch in anderen Tumorentitäten, wie Pankreas- oder Mammakarzinomen, war ein erhöhter mRNA-Gehalt von *OPN-c* mit Metastasen assoziiert [Patani *et al.*, 2008; Siddiqui *et al.*, 2014]. Die Metastasierung von Tumoren führt zu einer deutlichen Verschlechterung der Überlebensdauer von Tumorpatienten (Übersicht in [Valastyan und Weinberg, 2011]). Eine Voraussetzung für die Entstehung von Metastasen ist unter anderem das invasive Wachstum des Tumors. *OPN-c* ist in der Lage das verankerungsunabhängige Wachstum und die Invasion der Tumorzellen zu induzieren [He *et al.*, 2006; Takafuji *et al.*, 2007; Zhao *et al.*, 2011]. Das verankerungsunabhängige Wachstum stimuliert die Überwindung der Anoikis von Tumorzellen (eine Form des Zelltods nach Verlust von Zellkontakten), was eine entscheidende Voraussetzung für das Überleben von metastasierenden Tumorzellen darstellt. Die Variante *OPN-a* unterstützt dabei das verankerungsunabhängige Wachstum durch die Steigerung des zellulären Glukosegehalts [Shi *et al.*, 2014]. In Magen- Prostata-, Ovarialkarzinomen und Gliomen spielte insbesondere *OPN-c* eine zentrale Rolle bei der Regulation der Invasion durch Beeinflussung verschiedener Invasionsmarker wie den Matrixmetalloproteasen MMP-2 und MMP-9 sowie der Protease uPA [Tang *et al.*, 2013; Tilli *et al.*, 2011; Tilli *et al.*, 2012; Yan *et al.*, 2010]. Auch bei den in der vorliegenden Arbeit untersuchten WTS-Patienten zeigte sich ein schwacher Zusammenhang zwischen dem mRNA-Gehalt der *OPN*-Spleißvarianten und dem

mRNA- und Proteingehalt der Invasionsmarker uPA, uPAR (Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator Rezeptor) und PAI (Plasminogen-Aktivator-Inhibitor) (Tabelle 2-5) [Hahnel *et al.*, 2012]. Weitere Untersuchungen an nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen und Mesotheliomen wiesen dagegen keinen oder einen negativen Einfluss der Überexpression von *OPN-c* auf die Invasion der Tumorzellen nach [Goparaju *et al.*, 2010; Ivanov *et al.*, 2009].

**Tabelle 2-5: Bivariate Korrelation des mRNA-Gehalts der *OPN*-Spleißvarianten und des Protein- und mRNA-Gehalts der Invasionsmarker uPA, uPAR und PAI (nach Spearman-Rho)**

			<i>OPN-a</i>	<i>OPN-b</i>	<i>OPN-c</i>
Protein	uPA	R	0,32	0,30	0,24
		p-Wert	<b>0,006*</b>	<b>0,009*</b>	<b>0,041*</b>
		N	75	75	75
	uPAR	R	0,39	0,41	0,33
		p-Wert	<b>0,001**</b>	<b>&lt; 0,001**</b>	<b>0,004*</b>
		N	75	75	75
	PAI-1	R	0,33	0,35	0,32
		p-Wert	<b>0,004*</b>	<b>0,002*</b>	<b>0,005*</b>
		N	75	75	75
mRNA	<i>uPA</i>	R	,15	,18	,15
		p-Wert	0,22	0,12	0,21
		N	74	74	74
	<i>PAI-1</i>	R	0,32	0,38	0,31
		p-Wert	<b>0,005*</b>	<b>0,001**</b>	<b>0,007*</b>
		N	74	74	74
	<i>uPAR</i>	R	0,29	0,26	0,16
		p-Wert	<b>0,012*</b>	<b>0,025*</b>	0,18
		N	73	73	73

OPN: Osteopontin; uPA: Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator; uPAR: Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator Rezeptor; PAI: Plasminogen-Aktivator-Inhibitor; r: Korrelationskoeffizient; n: Anzahl der Patienten; \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,001$

Obwohl der Gesamt-*OPN*-mRNA-Gehalt keine Bedeutung für die Prognose der Weichteilsarkompatienten hatte [Bache *et al.*, 2010], zeigte sich ein deutlicher Zusammenhang zwischen einem erhöhten mRNA-Gehalt der *OPN*-Spleißvarianten und einer schlechten Prognose der WTS-Patienten [Hahnel *et al.*, 2012]. Bei dem in dieser Arbeit untersuchten WTS-Patientenkollektiv korrelierte ein hoher mRNA-Gehalt der Spleißvarianten *OPN-b* und *OPN-c* signifikant mit einem 2,1- bzw. 1,8-fach erhöhtem relativen Risiko am Tumor zu versterben (Tabelle 2-6). Die unterschiedliche Patientenzahl ( $n = 68$  [Bache *et al.*, 2010] vs.  $n = 124$  [Hahnel *et al.*, 2012]) und der damit verbundene unterschiedliche Anteil an verschiedenen histologischen WTS-Subtypen ist

möglicherweise für die Diskrepanz dieser beiden Studien verantwortlich [Bache *et al.*, 2010; Hahnel *et al.*, 2012]. Aus einer umfangreichen Untersuchung an 1240 WTS-Patienten ging hervor, dass der histologische Subtyp einen signifikanten Einfluss auf das metastasenfreie 5-Jahres-Überleben hatte. Während Liposarkome mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von 79,1 % eine recht gute Prognose hatten, lag die maligner fibröser Histiozytome bei 65,3 % und bei Rhabdomyosarkomen sogar nur bei 50,1 % (Kaplan-Meier-Analyse:  $p \leq 0,001$ ; Log-Rank-Test) [Coindre *et al.*, 2001]. Sowohl die Studie von Patani und Mitarbeitern (2008), als auch aktuelle Studien an Mamma- und Pankreaskarzinomen bestätigten die prognostische Bedeutung der beiden Spleißvarianten *OPN-b* und *OPN-c* für das Überleben der Patienten [Ortiz-Martinez *et al.*, 2014; Patani *et al.*, 2008; Siddiqui *et al.*, 2014]. Bei Mammakarzinomen wurde *OPN-c* sogar als unabhängiger Prognosemarker für das krankheitsfreie Überleben beschrieben (multivariate Cox-Regression: RR = 2,19; 95 % KI = 1,18-4,06;  $p = 0,012$ ) [Ortiz-Martinez *et al.*, 2014].

**Tabelle 2-6: Überlebensanalysen nach Kaplan-Meier und Cox-Regressionsanalyse (modifiziert nach [Hahnel *et al.*, 2012])**

WTS-Kollektiv	OPN-Spleißvariante	n	Median	Kaplan-Meier-Analyse		multivariate Cox-Regressionsanalyse		
				Überleben [Monate]	p-Wert	RR	p-Wert	KI
Alle	<i>OPN-a</i> niedrig <sup>#</sup>	62	0,68	90	0,07	1,7	0,06	1,0 - 3,0
	<i>OPN-a</i> hoch	62		71				
	<i>OPN-b</i> niedrig <sup>#</sup>	62	0,49	117	0,13	2,1	<b>0,02*</b>	1,2 - 3,6
	<i>OPN-b</i> hoch	62		66				
	<i>OPN-c</i> niedrig <sup>#</sup>	62	0,08	94	0,38	1,8	<b>0,04*</b>	1,0 - 3,1
	<i>OPN-c</i> hoch	62		81				
Patienten mit Radiotherapie	<i>OPN-a</i> niedrig <sup>#</sup>	26	0,65	80	<b>0,04*</b>	3,5	0,07	0,9 - 13,0
	<i>OPN-a</i> hoch	26		76				
	<i>OPN-b</i> niedrig <sup>#</sup>	26	0,42	147	<b>0,05*</b>	10,3	<b>&lt;0,01*</b>	2,0 - 53,7
	<i>OPN-b</i> hoch	26		55				
	<i>OPN-c</i> niedrig <sup>#</sup>	26	0,07	147	<b>0,05*</b>	11,4	<b>&lt;0,01*</b>	2,2 - 59,3
	<i>OPN-c</i> hoch	26		55				

Gesamtüberleben in Abhängigkeit vom mRNA-Gehalt der *OPN*-Spleißvarianten in verschiedenen WTS-Patientengruppen (alle WTS-Patienten und Radiotherapiepatienten). Die Unterteilung der Patienten erfolgte entsprechend des Medians (Einheit: Kopien *OPN*-Spleißvariante/Kopie *HPRT*) in zwei Gruppen. Die multivariate Cox-Regressionsanalyse wurde nach Tumorart, Tumorstadium und Tumorlokalisierung adjustiert. WTS: Weichteilsarkom; OPN: Osteopontin; HPRT: Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase; n: Anzahl der Patienten; RR: relatives Risiko; KI: Konfidenzintervall; <sup>#</sup> Referenzgruppe; \*  $p \leq 0,05$

In eigenen *in vitro*-Untersuchungen an der Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-231 konnte nach Reduktion der *OPN*-Genexpression mittels siRNA eine leichte Radiosensitivierung nachgewiesen werden (2.1.1) [Hahnel *et al.*, 2010]. Da auch WTS-Patienten z. T. eine Radiotherapie erhalten, wurde die prognostische Bedeutung der *OPN*-Spleißvarianten bei Patienten mit bzw. ohne Radiotherapie getrennt voneinander analysiert [Hahnel *et al.*, 2012]. Bei Patienten ohne Radiotherapie hatte der mRNA-Gehalt der *OPN*-Spleißvarianten keine prognostische Relevanz. Bei Patienten mit Radiotherapie korrelierte hingegen ein niedriger mRNA-Gehalt der Spleißvarianten *OPN-a*, *OPN-b* bzw. *OPN-c* mit einem signifikant besseren Überleben (Tabelle 2-6). Patienten mit einem hohen mRNA-Gehalt von *OPN-b* bzw. *OPN-c* verstarben deutlich eher am Tumor als Patienten mit einem niedrigen mRNA-Gehalt (55 Monate vs. 147 Monate; Kaplan-Meier-Analyse:  $p = 0,05$ ; Log-Rank-Test). Bei einem hohen mRNA-Gehalt von *OPN-a* wiesen die WTS-Patienten ein weniger deutliches, aber dennoch signifikant schlechteres Überleben auf (Kaplan-Meier-Analyse: 76 Monate vs. 80 Monate;  $p = 0,04$ ; Log-Rank-Test). Die multivariaten Cox-Regressionsanalysen ergaben für Patienten mit einem hohen mRNA-Gehalt von *OPN-b* bzw. *OPN-c* ein 10,3- bzw. 11,4-fach erhöhtes relatives Risiko am Tumor zu versterben (Tabelle 2-6). Aber auch bei Patienten mit Prostatakarzinom, die eine Radiotherapie erhielten, zeigte sich in univariaten Analysen ein signifikanter Zusammenhang zwischen einem erhöhten *OPN*-Proteingehalt und einem schlechten Therapieansprechen (univariate Cox-Regression:  $RR = 1,49$ ; 95 %  $KI = 1,15-1,94$ ;  $p = 0,003$ ) [Vergis *et al.*, 2008].

Zusammenfassend zeigten die eigenen Analysen, dass *OPN* und seine Spleißvarianten bei WTS-Patienten eine prognostische Bedeutung hatten. Sowohl der *OPN*-Proteingehalt im Serum als auch im Tumor von WTS-Patienten hatten einen prognostischen Einfluss [Bache *et al.*, 2010]. Der mRNA-Gehalt der Spleißvarianten *OPN-b* und *OPN-c* spielte insbesondere bei WTS-Patienten mit Radiotherapie eine wichtige Rolle für die Prognose [Hahnel *et al.*, 2012].

### 2.2.2 In Glioblastomen

Welche Bedeutung *OPN* und seine Spleißvarianten bei Glioblastomen spielen, soll im folgenden Abschnitt erläutert werden. Glioblastome zählen als Grad IV-Tumore zur Klasse der hochmalignen Gliome [Louis *et al.*, 2007]. Die frühzeitige Erkennung spielt keine Rolle, da sich Glioblastome innerhalb weniger Wochen entwickeln und die auftretenden Symptome, wie z. B. Kopfschmerzen oder Erbrechen, sehr universelle Ursachen haben können. Trotz multimodaler Therapieoptionen, bestehend aus Operation, Bestrahlung und Chemotherapie (1.1.2), liegt die 5-Jahres-Überlebensrate bei Glioblastompatienten lediglich bei 5 % [Dolecek *et al.*, 2012]. Deshalb ist es zur Verbesserung der Therapieoptionen von Patienten mit Gliomen, im Speziellen mit Glioblastomen, essentiell prognostische Marker zu charakterisieren. Jang und Mitarbeiter (2006) beschrieben *OPN* als das am stärksten überexprimierte Gen in N-Ethyl-N-Nitrosoharnstoff (ENU)-induzierten Gliomen bei Ratten [Jang *et al.*, 2006]. Zudem war *OPN* (IHC) weder im (stark proliferierenden) Normalgewebe noch in ENU-exponierten Hirnen vor der Bildung von Kleinsttumoren ( $< 300 \mu\text{m}$ ) oder in Regionen, die als potenzielle Vorstufen von Tumornestern identifiziert wurden, nachweisbar. Die Autoren vermuteten,

dass die Nachweisbarkeit von OPN im Tumorgewebe (IHC) mit dem Erwerb eines etablierten Glioms einhergeht [Jang *et al.*, 2006]. Microarray-Analysen zeigten, dass *OPN* auch beim Vergleich von Grad II/III-Astrozytomen und Glioblastomen das am stärksten überexprimierte Gen war [Sreekanthreddy *et al.*, 2010].

Die eigenen Untersuchungen an verschiedenen Zelllinien machten deutlich, dass Glioblastomzelllinien im Vergleich zu beispielsweise HNO- oder Mammakarzinomzelllinien den höchsten mRNA- und Proteingehalt von OPN aufwiesen (Abbildung 2-3 A und Abbildung 2-4). Außerdem war auffällig, dass der mRNA-Gehalt der Variante *OPN-b* bei einem sehr hohen Gesamt-*OPN*-mRNA-Gehalt anteilig deutlich zunahm, der Anteil der Spleißvariante *OPN-a* dagegen abgenommen hatte (Abbildung 2-3 B). In einer anderen Studie zeigte der Vergleich des mRNA-Gehalts der *OPN*-Spleißvarianten, dass lediglich der mRNA-Gehalt der Variante *OPN-b* in allen untersuchten Glioblastomzelllinien im Vergleich zum Normalgewebe erhöht war [Sreekanthreddy *et al.*, 2010]. Eigene retrospektive Untersuchungen an 41 Glioblastompatienten bestätigten diese Beobachtungen [Güttler *et al.*, 2013]. Der mRNA-Gehalt von *OPN* war im Tumorgewebe im Vergleich zum Normalgewebe signifikant erhöht. Für die *OPN*-Spleißvarianten war ebenfalls ein Anstieg des mRNA-Gehalts im Tumorgewebe im Vergleich zum Normalgewebe nachweisbar. Allerdings war dieser Unterschied nicht signifikant. Außerdem war der mRNA-Gehalt der Spleißvariante *OPN-a*, ähnlich wie bei den Weichteilsarkompatienten, signifikant höher als der mRNA-Gehalt von *OPN-b* und *OPN-c* [Güttler *et al.*, 2013]. *In vivo* zeigte sich in Abhängigkeit vom Tumorgrad bei Gliompatienten eine deutliche Zunahme des mRNA-Gehalts aller *OPN*-Spleißvarianten [Sreekanthreddy *et al.*, 2010; Yan *et al.*, 2010]. Außerdem zeigten zahlreiche Studien an Gliompatienten eine positive Korrelation zwischen dem *OPN*-mRNA-Gehalt und dem histologischen Tumorgrad [Cairncross *et al.*, 2013; Said *et al.*, 2007; Saitoh *et al.*, 1995]. Zusätzlich zeigte die eigene retrospektive Analyse des Tumormaterials von 41 Glioblastompatienten keine Korrelation des mRNA-Gehalts von *OPN* und der *OPN*-Spleißvarianten mit dem Gesamtüberleben [Güttler *et al.*, 2013]. Ein erhöhter OPN-Proteingehalt (IHC) war dagegen mit einem signifikant schlechteren Gesamtüberleben von Patienten mit Grad III- und IV-Gliomen assoziiert (Kaplan-Meier-Analyse:  $p = 0,007$  bzw.  $p = 0,012$ ; Log-Rank-Test) [Erpolat *et al.*, 2013; Matusan-Ilijas *et al.*, 2008]. Glioblastompatienten mit einem hohen OPN-Serumspiegel zeigten im Vergleich zu Patienten mit einem niedrigen OPN-Serumspiegel ebenfalls ein signifikant schlechteres Überleben (9 Monate vs. 21 Monate; Kaplan-Meier-Analyse:  $p \leq 0,0001$ ; Log-Rank-Test) [Sreekanthreddy *et al.*, 2010]. In einer multivariaten Cox-Regressionsanalyse wurde der präoperative OPN-Serumspiegel zudem als unabhängiger Prognosemarker bei Glioblastompatienten identifiziert ( $p \leq 0,0001$ ) [Sreekanthreddy *et al.*, 2010]. In einer Pilotstudie der eigenen Arbeitsgruppe wurde an einem Patientenkollektiv mit malignen Gliomen (Grad III und IV) der OPN-Proteingehalt im Plasma zu verschiedenen Therapiezeitpunkten ( $t_0$  – vor der OP;  $t_1$  – nach der OP, vor der Radiotherapie;  $t_2$  – nach der Radiotherapie;  $t_3$  – vier-acht Wochen nach der Radiotherapie) prospektiv untersucht [Cuno, 2013; Güttler *et al.*, 2013]. Zu allen

Therapiezeitpunkten wurde in den Glioblastomen (Grad IV) im Vergleich zu den Grad III-Gliomen ein erhöhter OPN-Plasmagehalt nachgewiesen. In Übereinstimmung dazu beobachteten verschiedene Studien eine positive Korrelation zwischen dem OPN-Proteingehalt im Tumor oder Serum und dem Tumorgrad bei Gliompatienten [Saitoh *et al.*, 1995; Sreekanthreddy *et al.*, 2010; Toy *et al.*, 2009; Tsai *et al.*, 2012]. Die OPN-Plasmaspiegel der Gliompatienten stiegen darüber hinaus im Therapieverlauf kontinuierlich an [Cuno, 2013; Güttler *et al.*, 2013]. Ein erhöhter OPN-Plasmagehalt war unabhängig vom Entnahmezeitpunkt mit einem schlechteren Überleben der Gliompatienten assoziiert. Patienten mit einem hohen OPN-Plasmaspiegel am Ende der Radiotherapie (t2) hatten im Vergleich zu Patienten mit einem niedrigen OPN-Plasmaspiegel eine signifikant kürzere Überlebenszeit (7,3 Monate vs. 18,9 Monate; Kaplan-Meier-Analyse:  $p = 0,02$ ; Log-Rank-Test). Dies galt auch, wenn man die Glioblastompatienten allein betrachtete. Die prognostische Bedeutung des OPN-Plasmaspiegels zeigte sich auch im Verlauf der Therapie. So war ein verstärkter Anstieg des OPN-Plasmaspiegels im Therapieverlauf (zwischen den Zeitpunkten t1 und t2) mit einem signifikant schlechteren Überleben der Patienten assoziiert (7,3 Monate vs. 20,6 Monate; Kaplan-Meier-Analyse:  $p = 0,02$ ; Log-Rank-Test) [Cuno, 2013; Güttler *et al.*, 2013]. Übereinstimmend dazu war in einer eigenen Studie an Bronchialkarzinompatienten ein ansteigender OPN-Plasmagehalt nach Therapieende im Vergleich zu einem unveränderten oder abfallenden OPN-Plasmagehalt nach Therapieende mit einem signifikant schlechten Gesamtüberleben der Patienten assoziiert (multivariate Cox-Regression:  $RR = 3,6$ ; 95 % KI = 1,6-8,0;  $p = 0,002$ ) [Ostheimer *et al.*, 2014b].

Insgesamt zeigte sich in Glioblastomen ein deutlich erhöhter mRNA-Gehalt von *OPN* und der *OPN*-Spleißvarianten im Vergleich zum Normalgewebe, jedoch konnte keine prognostische Relevanz des mRNA-Gehalts für das Überleben von Glioblastompatienten nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu war ein erhöhter OPN-Plasmaspiegel mit einer kürzeren Überlebenszeit von Glioblastompatienten assoziiert. Der Plasmamarker OPN kann möglicher Weise als prognostischer Verlaufsparemeter Anwendung finden, denn Patienten mit einem starken Anstieg des OPN-Plasmaspiegels im Therapieverlauf hatten eine signifikant kürzere Überlebenszeit.

### 2.2.3 OPN als Hypoxiemarker

Die eigenen Untersuchungen deuten darauf hin, dass es auch in Gliomen, ähnlich wie in Kopf-Hals-Tumoren, einen Zusammenhang zwischen Hypoxie und OPN gibt. In Tumoren kann andauernde Hypoxie zur Ausbildung von nekrotischen Bereichen führen [Brown, 2007]. Zudem kann die Ausdehnung der Tumornekrosen zur Bestimmung hypoxischer Tumorareale herangezogen werden [Cuno, 2013]. In der eigenen prospektiven Studie an Gliompatienten waren erhöhte OPN-Plasmaspiegel mit einem größeren Anteil an nekrotischen Tumorarealen assoziiert [Cuno, 2013; Güttler *et al.*, 2013]. Darüber hinaus konnte in eigenen retrospektiven Analysen des Tumorgewebes von Glioblastompatienten eine signifikante positive Korrelation zwischen dem mRNA-Gehalt des *OPN* bzw. der *OPN*-Spleißvarianten und dem mRNA-Gehalt der Hypoxiemarker *CA9*, *HIF-2 $\alpha$* , *GLUT1* bzw. *VEGF* nachgewiesen werden [Bache *et al.*, 2015; Güttler *et al.*, 2013]. Aus dem

mRNA-Gehalt von *OPN* und der Hypoxiemarker *CA9*, *HIF-2 $\alpha$*  und *GLUT1* wurde ein sogenannter „Hypoxiescore“ gebildet. Die Glioblastompatienten mit einem hohen „Hypoxiescore“ (der mRNA-Gehalt aller vier Gene ist erhöht) zeigten in Kaplan-Meier-Analysen eine mediane Überlebenszeit von 1,8 Monaten. Glioblastompatienten mit einem niedrigen „Hypoxiescore“ (der mRNA-Gehalt aller vier Gene ist reduziert) wiesen dagegen eine mediane Überlebenszeit von 10,1 Monaten auf und überlebten somit deutlich länger ( $p = 0,06$ ; Log-Rank-Test). Zudem wiesen Glioblastompatienten mit einem hohen mRNA-Gehalt von *CA9*, *HIF-2 $\alpha$* , *GLUT-1* und *OPN* ein 2,1-fach erhöhtes relatives Risiko auf am Tumor zu versterben (univariate Cox-Regression: 95 % KI = 0,95-4,79;  $p = 0,07$ ) [Bache *et al.*, 2015]. In Übereinstimmung damit fanden Erpolat und Mitarbeiter (2013) bei der Untersuchung von malignen Gliomen (Grad III und IV) 72 % aller OPN-positiven immunhistochemischen Färbungen in perinekrotischen Tumorbereichen [Erpolat *et al.*, 2013]. Allerdings zeigte sich keine Korrelation zwischen dem Proteingehalt (IHC) von OPN und dem Proteingehalt der Hypoxiemarker HIF-1 $\alpha$ , CA IX und GLUT1. Aus den Überlebensanalysen dieser Studie ging jedoch hervor, dass sowohl ein erhöhter OPN-Proteingehalt als auch ein erhöhter „Hypoxiescore“ (bestehend aus HIF-1 $\alpha$ , CA IX und OPN) mit einem signifikant schlechteren progressionsfreien Überleben und Gesamtüberleben assoziiert waren (Kaplan-Meier-Analyse: OPN:  $p = 0,047$  und  $p = 0,007$ ; „Hypoxiescore“:  $p = 0,047$  und  $p = 0,002$ ; Log-Rank-Test). Ein erhöhter „Hypoxiescore“ erwies sich in multivariaten Analysen zudem als unabhängiger negativer Prognosemarker für das Gesamtüberleben der Gliompatienten (Cox-Regression: RR = 3,76; 95 % KI = 1,06-3,33;  $p = 0,03$ ) [Erpolat *et al.*, 2013]. Ein ähnlicher Zusammenhang bestätigte sich auch in einer Studie zur Bedeutung von Hypoxiemarkern in Glioblastomen [Irshad *et al.*, 2015]. Der mRNA-Gehalt von *OPN* korrelierte mit dem mRNA-Gehalt zahlreicher hypoxieregulierter Gene, wie *HIF-1 $\alpha$* , *CA9*, *VEGF* und *GLUT-1*. Obwohl in dieser Studie der Zusammenhang zwischen OPN und den Hypoxiemarkern *in vivo* eindeutig war, zeigten sich *in vitro* in Abhängigkeit von der Zelllinie starke Unterschiede in der Regulation des *OPN*-mRNA-Gehalts nach hypoxischer Kultivierung. Während in der Zelllinie U87MG eine Zunahme des *OPN*-mRNA-Gehalts zu beobachten war, wurde in der Zelllinie A172 eine deutliche Abnahme nach Kultivierung unter hypoxischen Bedingungen nachgewiesen [Irshad *et al.*, 2015].

In der eigenen Arbeitsgruppe wurde außerdem die Bedeutung von OPN als Hypoxie- und Prognosemarker in 55 Bronchialkarzinompatienten, die eine kurative Therapie erhalten hatten (M0-Patienten, d.h. keine Fernmetastasen), untersucht [Ostheimer *et al.*, 2014a]. Die OPN-Plasmaspiegel der Bronchialkarzinompatienten korrelierten signifikant mit dem Plasmaspiegel der HIF-1 $\alpha$ -regulierten und damit hypoxieassoziierten Proteine CA IX und VEGF. Dies zeigte auch für Bronchialkarzinome eine deutliche Beziehung zwischen OPN und hypoxieregulierten Proteinen. 2006 konnten Le und Mitarbeiter in einer kleinen Studie an nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen ( $n = 20$ ) zeigen, dass hohe OPN-Plasmaspiegel mit niedrigen Sauerstoffpartialdrücken in der Lunge und mit dem Wiederauftreten der Erkrankung korrelierten (rezidivfreie 2-Jahresüberlebensrate: 17 %

vs. 81 %; Kaplan-Meier-Analyse:  $p = 0,001$ ; Log-Rank-Test) [Le *et al.*, 2006]. Im Rahmen der eigenen Untersuchungen ergab die Überlebensanalyse nach Kaplan-Meier für Bronchialkarzinompatienten mit einem hohen OPN-Plasmaspiegel eine signifikant kürzere Überlebenszeit im Vergleich zu Patienten mit einem niedrigen OPN-Plasmaspiegel (9,5 Monate vs. 23,4 Monate;  $p = 0,03$ ; Log-Rank-Test). In der univariaten Cox-Regressionsanalyse wiesen Bronchialkarzinompatienten mit einem hohen OPN-Plasmaspiegel ein 2,2-fach signifikant erhöhtes relatives Risiko auf zu versterben (95 % KI = 1,1–4,8;  $p = 0,04$ ) [Ostheimer *et al.*, 2014a]. Die Kombination von OPN mit den Hypoxiemarkern CA IX und/oder VEGF (OPN/VEGF, OPN/CA IX bzw. OPN/VEGF/CA IX) zeigte additive prognostische Effekte. Das heißt Patienten, die erhöhte Plasmaspiegel aller drei Marker aufwiesen, hatten ein additiv erhöhtes relatives Risiko am Tumor zu versterben (univariate Cox-Regression: RR = 5; 95 % KI = 1,5–17,2;  $p = 0,009$ ). In der multivariaten Cox-Regressionsanalyse erwies sich der „Hypoxiescore“ bestehend aus OPN, VEGF und CA IX als unabhängiger Prognosemarker für das Gesamtüberleben der Bronchialkarzinompatienten (RR = 2,9; 95 % KI = 1,6–14,4;  $p = 0,03$ ) [Ostheimer *et al.*, 2014a]. Diese Ergebnisse fügen sich gut in die bisher in der Literatur beschriebenen Beobachtungen vor allem für Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren ein. In verschiedenen Studien konnte für diese Tumorentität bereits ein deutlicher Zusammenhang zwischen einem erhöhten OPN-Plasmaspiegel und niedrigen Sauerstoffpartialdrücken im Tumor nachgewiesen werden [Le *et al.*, 2003; Nordmark *et al.*, 2007]. Außerdem war der erhöhte OPN-Plasmaspiegel mit einer deutlich schlechteren lokoregionalen Tumorkontrolle und einem schlechteren Gesamtüberleben assoziiert [Le *et al.*, 2003; Nordmark *et al.*, 2007; Overgaard *et al.*, 2005]. In eigenen und weiteren Untersuchungen an Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren korrelierte der OPN-Proteingehalt im Tumor (IHC) mit dem Sauerstoffpartialdruck im Tumor sowie mit dem Proteingehalt verschiedener hypoxieregulierter Proteine wie HIF-1 $\alpha$ , VEGF bzw. CA IX [Bache *et al.*, 2006; Le *et al.*, 2007].

Zusammenfassend zeigten die verschiedenen *in vitro*-Studien, dass die sauerstoffabhängige Regulation der *OPN*-Genexpression sehr heterogen ist (2.1.3). Im Gegensatz dazu zeigte sich *in vivo* eine relativ deutliche Assoziation zwischen dem OPN-Gehalt im Tumor (mRNA/Protein), Serum oder Plasma und Hypoxie. Bei Sauerstoffmangel konnte in verschiedenen Tumorentitäten eine Erhöhung des mRNA- und Proteingehalts von OPN im Tumor und/oder im Plasma/Serum und eine signifikante positive Korrelation mit anderen hypoxieregulierten Proteinen (HIF-1 $\alpha$ , CA IX, GLUT-1) nachgewiesen werden [Bache *et al.*, 2008; Bache *et al.*, 2015; Güttler *et al.*, 2013; Le *et al.*, 2003; Nordmark *et al.*, 2007; Ostheimer *et al.*, 2014a]. Der durch den Zusammenschluss verschiedener hypoxieregulierter Proteine (HIF-1 $\alpha$ , VEGF, GLUT-1 oder CA IX mit OPN) gebildete „Hypoxiescore“ scheint zudem ein geeigneter Parameter zur Analyse der Patientenprognose und zur Identifikation hypoxischer Tumoren zu sein. Dieser „Hypoxiescore“ könnte zur zielgerichteten Selektion von Therapieoptionen herangezogen werden um die Prognose und die Überlebenszeit der Patienten zu verbessern.

### 3. Zusammenfassung und Ausblick

Innerhalb dieser Arbeit sollte die Bedeutung des extrazellulären Matrixproteins Osteopontin als endogener Hypoxiemarker und als therapeutisches Target in der Strahlentherapie untersucht werden. Die *in vitro*-Untersuchungen in der Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-231 zeigten, dass die Reduktion der *OPN*-Genexpression allein bzw. in Kombination mit Bestrahlung zu einer Hemmung tumorrelevanter Prozesse wie Proliferation, Migration und klonogenes Zellüberleben sowie zur Induktion der Apoptose führt. Hervorzuheben ist, dass sowohl unter normoxischen als auch unter hypoxischen Bedingungen durch Reduktion der *OPN*-Genexpression eine Radiosensitivierung der MDA-MB-231-Mammakarzinomzellen erzielt wurde.

Die Untersuchungen zu den *OPN*-Spleißvarianten an der Glioblastomzelllinie U251MG zeigten, dass die selektive Reduktion der Genexpression der beiden Spleißvarianten *OPN-a* und *OPN-c* zu einer Reduktion des klonogenen Überlebens führte. Allerdings war die gleichzeitige Reduktion der Genexpression aller *OPN*-Spleißvarianten erforderlich, um eine Reduktion der Proliferation und Migration sowie Apoptoseinduktion und einen G2/M-Arrest in den U251MG-Zellen zu erzielen. Die kombinierte Behandlung aus Bestrahlung und Transfektion der *OPN*-siRNAs (*OpnS* bzw. *OpnAC*) führte in der Zelllinie U251MG zu einer additiven Reduktion der Proliferation, Migration und des klonogenen Überlebens sowie Induktion der Apoptose und G2/M-Arrest. Jedoch konnte durch die Reduktion der Genexpression der *OPN*-Spleißvarianten (alle gleichzeitig bzw. *OPN-a* und *OPN-c*) in der Glioblastomzelllinie U251MG keine Radiosensitivierung erreicht werden. Die Immunfluoreszenzfärbungen zeigten, dass *OPN* nach Überexpression der *OPN*-Spleißvarianten unterschiedlich in der Zelle lokalisiert ist. Dies könnte eine mögliche Erklärung dafür sein, dass die einzelnen *OPN*-Spleißvarianten unterschiedliche Prozesse in der Zelle beeinflussen und z. T. die Reduktion der Genexpression anderer *OPN*-Spleißvarianten kompensieren können.

Die *in vivo*-Analysen an Glioblastom- und WTS-Patienten zeigten einen deutlich erhöhten mRNA-Gehalt von *OPN* und der *OPN*-Spleißvarianten im Tumor im Vergleich zum Normalgewebe. Zudem zeigte sich, dass Gliompatienten mit einem erhöhten *OPN*-Plasmaspiegel nach der Therapie im Vergleich zu Patienten mit einem niedrigen *OPN*-Plasmaspiegel ein deutlich verkürztes Überleben aufweisen. Darüber hinaus wurden sowohl *OPN* als auch die *OPN*-Spleißvarianten als Prognosemarker für Weichteilsarkompatienten identifiziert. WTS-Patienten mit einem hohen *OPN*-Proteingehalt im Serum bzw. Tumor zeigten im Vergleich zu Patienten mit einem niedrigen *OPN*-Proteingehalt ein signifikant schlechteres Überleben. Ein hoher mRNA-Gehalt der *OPN*-Spleißvarianten korrelierte ebenfalls mit einer schlechten Prognose der WTS-Patienten. Insbesondere bei WTS-Patienten, die eine Radiotherapie erhalten hatten, zeigte sich, dass Patienten mit einem hohen mRNA-Gehalt der Spleißvarianten *OPN-b* und *OPN-c* ein 10,3- bzw. 11,4-fach erhöhtes relatives Risiko aufweisen am Tumor zu versterben. Im Gegensatz dazu hatte der mRNA-Gehalt der *OPN*-Spleißvarianten bei WTS-Patienten, die keine Radiotherapie erhalten hatten,

keine prognostische Bedeutung. Außerdem konnte bei WTS-Patienten eine positive Korrelation zwischen dem mRNA-Gehalt der *OPN*-Spleißvarianten im Tumorgewebe mit dem Tumorgrad, dem Auftreten von Lungenmetastasen (*OPN-c*) sowie mit dem mRNA- und Proteingehalt von uPA, uPAR und PAI-1 nachgewiesen werden.

Aus den *in vitro*-Untersuchungen zur Bedeutung des OPN als Hypoxiemarker geht hervor, dass die hypoxische Kultivierung in Abhängigkeit von der Zelllinie zu einem Anstieg bzw. einer Reduktion des mRNA- und Proteingehalts von OPN führte. Die Analyse des Tumormaterials und Plasmas bzw. Serums von Patienten mit Tumoren unterschiedlicher Entitäten zeigte, dass es *in vivo* eine signifikante positive Korrelation zwischen OPN und hypoxieinduzierten Proteinen/Parametern gibt. In Gliompatienten korrelierte der mRNA-Gehalt von *OPN* bzw. der *OPN*-Spleißvarianten beispielsweise mit dem mRNA-Gehalt der hypoxieassoziierten Gene *HIF-2 $\alpha$* , *GLUT1*, *CA9* und *VEGF*. Die Kombination von OPN mit verschiedenen hypoxieassoziierten Genen wie *HIF-2 $\alpha$* , *GLUT1* und *CA IX* zu einem „Hypoxiescore“ zeigte einen prognostischen Einfluss auf das Überleben der Gliompatienten. Gliompatienten mit einem hohen „Hypoxiescore“ (d. h. mRNA-Gehalt aller Marker ist erhöht) hatten ein 2,13-fach erhöhtes relatives Risiko am Tumor zu versterben. Bei Patienten mit nicht-metastasiertem nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinomen erwies sich ein erhöhter Plasmaspiegel aller drei Marker des „Hypoxiescores“ bestehend aus OPN, CA IX und VEGF sogar als unabhängiger negativer Prognosemarker (RR = 2,9; p = 0,03). Zusammenfassend kann gesagt werden, dass OPN hypoxieassoziiert exprimiert wird. Allerdings muss noch genauer geklärt werden, durch welche Mechanismen die Regulation erfolgt bzw. welche Faktoren dazu führen, dass es keine einheitliche Beeinflussung des OPN-Gehalts in verschiedenen Tumorentitäten und -zelllinien gibt. In Kombination mit anderen Hypoxiemarkern stellt OPN einen wichtigen Prognosefaktor dar.

Insgesamt wurde in dieser Arbeit somit vor allem die prognostische Bedeutung von OPN und seinen Spleißvarianten in verschiedenen Tumorentitäten belegt. Allerdings sollten die Ergebnisse zur prognostischen Bedeutung der Genexpression von *OPN* und der *OPN*-Spleißvarianten in größeren Patientenkohorten mit Weichteilsarkomen und vor allem mit Gliomen bzw. Glioblastomen verifiziert werden.

Um die *in vitro*-Analysen zu verifizieren sollten die Untersuchungen zur Beeinflussung der Radiosensitivität durch die Reduktion der *OPN*-Genexpression auf andere Mamma- und Glioblastomzelllinien oder auch Zelllinien weiterer Tumorentitäten ausgeweitet werden. Um zu klären welche Mechanismen hinter der erhöhten Radiosensitivität der Mammakarzinomzellen nach Reduktion der *OPN*-Genexpression stehen, könnte die Analyse der reaktiven Sauerstoffspezies und die Bildung von  $\gamma$ H2AX-Foci erfolgen. Zusätzlich könnten zur weiteren Analyse der funktionellen Bedeutung der einzelnen *OPN*-Spleißvarianten andere *OPN*-überexprimierende Zelllinien etabliert und weiterführend im Mausmodell untersucht werden.

## 4. Literaturverzeichnis

- DGHO Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie e.V. (2011). Leitlinie Weichteilsarkome 2011. <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/weichteilsarkome/@@view/html/index.html>. [letzter Zugriff am 12.8.2013].
- Leitlinienprogramm Onkologie der AWMF, Deutschen Krebsgesellschaft e.V. und Deutschen Krebshilfe e. V. (2012). Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms Kurzversion 3.0. [http://www.awmf.org/uploads/tx\\_szleitlinien/032-045OL\\_k\\_S3\\_Brustkrebs\\_Mammakarzinom\\_Diagnostik\\_Therapie\\_Nachsorge\\_2012-07.pdf](http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/032-045OL_k_S3_Brustkrebs_Mammakarzinom_Diagnostik_Therapie_Nachsorge_2012-07.pdf). [letzter Zugriff am 12.5.2016].
- Robert Koch-Institut und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V. (2013). Krebs in Deutschland 2009/2010. [http://www.rki.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs\\_in\\_Deutschland/kid\\_2013/krebs\\_in\\_deutschland\\_2013.pdf?\\_\\_blob=publicationFile](http://www.rki.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2013/krebs_in_deutschland_2013.pdf?__blob=publicationFile). [letzter Zugriff am 8.8.2015].
- Statistisches Bundesamt (2014). Gesundheit. Todesursachen in Deutschland. [https://www.destatis.de/DE/Publikationen/Thematisch/Gesundheit/Todesursachen/Todesursachen2120400137004.pdf?\\_\\_blob=publicationFile](https://www.destatis.de/DE/Publikationen/Thematisch/Gesundheit/Todesursachen/Todesursachen2120400137004.pdf?__blob=publicationFile). [letzter Zugriff am 13.5.2015].
- Kommission Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Neurologie (2014). Gliome – Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie. <http://www.dgn.org/leitlinien/2977-II-76-gliome>. [letzter Zugriff am 29.5.2015].
- Adwan, H., Bauerle, T., Najajreh, Y., Elazer, V., Golomb, G. & Berger, M.R. (2004). Decreased levels of osteopontin and bone sialoprotein II are correlated with reduced proliferation, colony formation, and migration of GFP-MDA-MB-231 cells. *Int.J.Oncol.*, **24**, 1235-1244.
- Agrawal, D., Chen, T., Irby, R., Quackenbush, J., Chambers, A.F., Szabo, M., Cantor, A., Coppola, D. & Yeatman, T.J. (2003). Osteopontin identified as colon cancer tumor progression marker. *C.R.Biol.*, **326**, 1041-1043.
- An, W.G., Kanekal, M., Simon, M.C., Maltepe, E., Blagosklonny, M.V. & Neckers, L.M. (1998). Stabilization of wild-type p53 by hypoxia-inducible factor 1alpha. *Nature*, **392**, 405-408.
- Angelucci, A., Festuccia, C., Gravina, G.L., Muzi, P., Bonghi, L., Vicentini, C. & Bologna, M. (2004). Osteopontin enhances the cell proliferation induced by the epidermal growth factor in human prostate cancer cells. *Prostate*, **59**, 157-166.
- Antoniou, A., Pharoah, P.D., Narod, S., Risch, H.A., Eyfjord, J.E., Hopper, J.L., Loman, N., Olsson, H., Johannsson, O., Borg, A., Pasini, B., Radice, P., Manoukian, S., Eccles, D.M., Tang, N., Olah, E., Anton-Culver, H., Warner, E., Lubinski, J., Gronwald, J., Gorski, B., Tulinius, H., Thorlacius, S., Eerola, H., Nevanlinna, H., Syrjäkoski, K., Kallioniemi, O.P., Thompson, D., Evans, C., Peto, J., Lalloo, F., Evans, D.G. & Easton, D.F. (2003). Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case Series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies. *Am.J.Hum.Genet.*, **72**, 1117-1130.
- Armstrong, K., Eisen, A. & Weber, B. (2000). Assessing the risk of breast cancer. *N.Engl.J.Med.*, **342**, 564-571.
- Ashkar, S., Weber, G.F., Panoutsakopoulou, V., Sanchirico, M.E., Jansson, M., Zawaideh, S., Rittling, S.R., Denhardt, D.T., Glimcher, M.J. & Cantor, H. (2000). Eta-1 (osteopontin): an early component of type-1 (cell-mediated) immunity. *Science*, **287**, 860-864.

- Asplin, J.R., Arsenault, D., Parks, J.H., Coe, F.L. & Hoyer, J.R. (1998). Contribution of human uropontin to inhibition of calcium oxalate crystallization. *Kidney Int.*, **53**, 194-199.
- Autier, P., Boniol, M., Gavin, A. & Vatten, L.J. (2011). Breast cancer mortality in neighbouring European countries with different levels of screening but similar access to treatment: trend analysis of WHO mortality database. *BMJ*, **343**, d4411.
- Autier, P., Koechlin, A., Smans, M., Vatten, L. & Boniol, M. (2012). Mammography screening and breast cancer mortality in Sweden. *J.Natl.Cancer Inst.*, **104**, 1080-1093.
- Bache, M., Kappler, M., Said, H.M., Staab, A. & Vordermark, D. (2008). Detection and specific targeting of hypoxic regions within solid tumors: current preclinical and clinical strategies. *Curr.Med.Chem.*, **15**, 322-338.
- Bache, M., Kappler, M., Wichmann, H., Rot, S., Hahnel, A., Greither, T., Said, H.M., Kotzsch, M., Wurl, P., Taubert, H. & Vordermark, D. (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.
- Bache, M., Reddemann, R., Said, H.M., Holzhausen, H.J., Taubert, H., Becker, A., Kuhnt, T., Hansgen, G., Dunst, J. & Vordermark, D. (2006). Immunohistochemical detection of osteopontin in advanced head-and-neck cancer: prognostic role and correlation with oxygen electrode measurements, hypoxia-inducible-factor-1alpha-related markers, and hemoglobin levels. *Int.J.Radiat.Oncol.Biol.Phys.*, **66**, 1481-1487.
- Bache, M., Rot, S., Kessler, J., Güttler, A., Wichmann, H., Greither, T., Wach, S., Taubert, H., Soling, A., Bilkenroth, U., Kappler, M. & Vordermark, D. (2015). mRNA expression levels of hypoxia-induced and stem cell-associated genes in human glioblastoma. *Oncol.Rep.*, **33**, 3155-3161.
- Bannasch, H., Eisenhardt, S.U., Grosu, A.L., Heinz, J., Momeni, A. & Stark, G.B. (2011). The diagnosis and treatment of soft tissue sarcomas of the limbs. *Dtsch.Arztbl.Int.*, **108**, 32-38.
- Bellahcene, A., Castronovo, V., Ogbureke, K.U., Fisher, L.W. & Fedarko, N.S. (2008). Small integrin-binding ligand N-linked glycoproteins (SIBLINGs): multifunctional proteins in cancer. *Nat.Rev.Cancer*, **8**, 212-226.
- Bondy, M.L., Scheurer, M.E., Malmer, B., Barnholtz-Sloan, J.S., Davis, F.G., Il'yasova, D., Kruchko, C., McCarthy, B.J., Rajaraman, P., Schwartzbaum, J.A., Sadetzki, S., Schlehofer, B., Tihan, T., Wiemels, J.L., Wrensch, M. & Buffler, P.A. (2008). Brain tumor epidemiology: consensus from the Brain Tumor Epidemiology Consortium. *Cancer*, **113**, 1953-1968.
- Boyle, P. & Boffetta, P. (2009). Alcohol consumption and breast cancer risk. *Breast Cancer Res.*, **11 Suppl 3**, S3.
- Brahimi-Horn, C. & Pouyssegur, J. (2006). The role of the hypoxia-inducible factor in tumor metabolism growth and invasion. *Bull.Cancer*, **93**, E73-E80.
- Bramwell, V.H., Doig, G.S., Tuck, A.B., Wilson, S.M., Tonkin, K.S., Tomiak, A., Perera, F., Vandenberg, T.A. & Chambers, A.F. (2006). Serial plasma osteopontin levels have prognostic value in metastatic breast cancer. *Clin.Cancer Res.*, **12**, 3337-3343.
- Bramwell, V.H., Tuck, A.B., Wilson, S.M., Stitt, L.W., Cherian, A.K., Rorke, S.C., Al Katib, W., Postenka, C.O. & Chambers, A.F. (2005). Expression of osteopontin and HGF/met in adult soft tissue tumors. *Cancer Biol.Ther.*, **4**, 1336-1341.

- Brennan, M.F., Casper, E.S. & Harrison, L.B. (1997). Soft tissue sarcoma. In: De Vita , V.T.J., Hellman, S. & Rosenberg, S.A. (eds) *Cancer: Principles and Practice of Oncology*. 5th. Philadelphia, PA: Lippincott-Raven Publishers, 1738-1788.
- Brown, J.M. (2007). Tumor hypoxia in cancer therapy. *Methods Enzymol.*, **435**, 297-321.
- Brown, J.M. & Giaccia, A.J. (1998). The unique physiology of solid tumors: opportunities (and problems) for cancer therapy. *Cancer Res.*, **58**, 1408-1416.
- Brown, J.M. & Wilson, W.R. (2004). Exploiting tumour hypoxia in cancer treatment. *Nat.Rev.Cancer*, **4**, 437-447.
- Buback, F., Renkl, A.C., Schulz, G. & Weiss, J.M. (2009). Osteopontin and the skin: multiple emerging roles in cutaneous biology and pathology. *Exp.Dermatol.*, **18**, 750-759.
- Bussink, J., Kaanders, J.H. & van der Kogel, A.J. (2003). Tumor hypoxia at the micro-regional level: clinical relevance and predictive value of exogenous and endogenous hypoxic cell markers. *Radiother.Oncol.*, **67**, 3-15.
- Cairncross, G., Berkey, B., Shaw, E., Jenkins, R., Scheithauer, B., Brachman, D., Buckner, J., Fink, K., Souhami, L., Laperriere, N., Mehta, M. & Curran, W. (2006). Phase III trial of chemotherapy plus radiotherapy compared with radiotherapy alone for pure and mixed anaplastic oligodendroglioma: Intergroup Radiation Therapy Oncology Group Trial 9402. *J.Clin.Oncol.*, **24**, 2707-2714.
- Cairncross, G., Wang, M., Shaw, E., Jenkins, R., Brachman, D., Buckner, J., Fink, K., Souhami, L., Laperriere, N., Curran, W. & Mehta, M. (2013). Phase III trial of chemoradiotherapy for anaplastic oligodendroglioma: long-term results of RTOG 9402. *J.Clin.Oncol.*, **31**, 337-343.
- Carmeliet, P., Dor, Y., Herbert, J.M., Fukumura, D., Brusselmans, K., Dewerchin, M., Neeman, M., Bono, F., Abramovitch, R., Maxwell, P., Koch, C.J., Ratcliffe, P., Moons, L., Jain, R.K., Collen, D. & Keshert, E. (1998). Role of HIF-1alpha in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature*, **394**, 485-490.
- Carroll, V.A. & Ashcroft, M. (2005). Targeting the molecular basis for tumour hypoxia. *Expert.Rev.Mol.Med.*, **7**, 1-16.
- Chae, S., Jun, H.O., Lee, E.G., Yang, S.J., Lee, D.C., Jung, J.K., Park, K.C., Yeom, Y.I. & Kim, K.W. (2009). Osteopontin splice variants differentially modulate the migratory activity of hepatocellular carcinoma cell lines. *Int.J.Oncol.*, **35**, 1409-1416.
- Chakraborty, G., Jain, S., Patil, T.V. & Kundu, G.C. (2008). Down-regulation of osteopontin attenuates breast tumour progression in vivo. *J.Cell Mol.Med.*, **12**, 2305-2318.
- Chang, S.H., Minai-Tehrani, A., Shin, J.Y., Park, S., Kim, J.E., Yu, K.N., Hong, S.H., Hong, C.M., Lee, K.H., Beck, G.R., Jr. & Cho, M.H. (2012). Beclin1-induced autophagy abrogates radioresistance of lung cancer cells by suppressing osteopontin. *J.Radiat.Res.*, **53**, 422-432.
- Chellaiah, M.A. & Hruska, K.A. (2003). The integrin alpha(v)beta(3) and CD44 regulate the actions of osteopontin on osteoclast motility. *Calcif.Tissue Int.*, **72**, 197-205.
- Chia, S.K., Wykoff, C.C., Watson, P.H., Han, C., Leek, R.D., Pastorek, J., Gatter, K.C., Ratcliffe, P. & Harris, A.L. (2001). Prognostic significance of a novel hypoxia-regulated marker, carbonic anhydrase IX, in invasive breast carcinoma. *J.Clin.Oncol.*, **19**, 3660-3668.
- Christensen, B., Nielsen, M.S., Haselmann, K.F., Petersen, T.E. & Sorensen, E.S. (2005). Post-translationally modified residues of native human osteopontin are located in clusters: identification

- of 36 phosphorylation and five O-glycosylation sites and their biological implications. *Biochem.J.*, **390**, 285-292.
- Coindre, J.M., Terrier, P., Guillou, L., Le, D., V, Collin, F., Ranchere, D., Sastre, X., Vilain, M.O., Bonichon, F. & N'Guyen, B.B. (2001). Predictive value of grade for metastasis development in the main histologic types of adult soft tissue sarcomas: a study of 1240 patients from the French Federation of Cancer Centers Sarcoma Group. *Cancer*, **91**, 1914-1926.
- Courter, D., Cao, H., Kwok, S., Kong, C., Banh, A., Kuo, P., Bouley, D.M., Vice, C., Brustugun, O.T., Denko, N.C., Koong, A.C., Giaccia, A. & Le, Q.T. (2010). The RGD domain of human osteopontin promotes tumor growth and metastasis through activation of survival pathways. *PLoS.One.*, **5**, e9633.
- Cuno, P. (2013). Osteopontin als Plasmamarker der Tumorphoxie bei Patienten mit malignen Gliomen [Dissertation]. Halle: Medizinische Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Dalla-Torre, C.A., Yoshimoto, M., Lee, C.H., Joshua, A.M., de Toledo, S.R., Petrilli, A.S., Andrade, J.A., Chilton-MacNeill, S., Zielenska, M. & Squire, J.A. (2006). Effects of THBS3, SPARC and SPP1 expression on biological behavior and survival in patients with osteosarcoma. *BMC.Cancer*, **6**, 237.
- Daniel, P. (2003). Zellzyklus und Apoptose. In: Ganten, D., Ruckpaul, K., Schlegelberger, B. & Fonatsch, C. (eds) *Molekularmedizinische Grundlagen von hämatologischen Neoplasien*. 1st. Berlin: Springer-Verlag, 130-184.
- Das, R., Mahabeleshwar, G.H. & Kundu, G.C. (2004). Osteopontin induces AP-1-mediated secretion of urokinase-type plasminogen activator through c-Src-dependent epidermal growth factor receptor transactivation in breast cancer cells. *J.Biol.Chem.*, **279**, 11051-11064.
- de Oliveira, P.T., Zalzal, S.F., Irie, K. & Nanci, A. (2003). Early expression of bone matrix proteins in osteogenic cell cultures. *J.Histochem.Cytochem.*, **51**, 633-641.
- Debucquoy, A., Goethals, L., Geboes, K., Roels, S., Mc Bride, W.H. & Haustermans, K. (2006). Molecular responses of rectal cancer to preoperative chemoradiation. *Radiother.Oncol.*, **80**, 172-177.
- Denhardt, D.T. & Chambers, A.F. (1994). Overcoming obstacles to metastasis--defenses against host defenses: osteopontin (OPN) as a shield against attack by cytotoxic host cells. *J.Cell Biochem.*, **56**, 48-51.
- Denhardt, D.T. & Guo, X. (1993). Osteopontin: a protein with diverse functions. *FASEB J.*, **7**, 1475-1482.
- Dolecek, T.A., Propp, J.M., Stroup, N.E. & Kruchko, C. (2012). CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2005-2009. *Neuro.Oncol.*, **14 Suppl 5**, v1-49.
- Ebert, B.L., Gleadle, J.M., O'Rourke, J.F., Bartlett, S.M., Poulton, J. & Ratcliffe, P.J. (1996). Isoenzyme-specific regulation of genes involved in energy metabolism by hypoxia: similarities with the regulation of erythropoietin. *Biochem.J.*, **313 ( Pt 3)**, 809-814.
- Eggermont, A.M., de Wilt, J.H. & Ten Hagen, T.L. (2003). Current uses of isolated limb perfusion in the clinic and a model system for new strategies. *Lancet Oncol.*, **4**, 429-437.

- Erpolat, O.P., Gocun, P.U., Akmansu, M., Ozgun, G. & Akyol, G. (2013). Hypoxia-related molecules HIF-1alpha, CA9, and osteopontin : predictors of survival in patients with high-grade glioma. *Strahlenther.Onkol.*, **189**, 147-154.
- Esteller, M., Garcia-Foncillas, J., Andion, E., Goodman, S.N., Hidalgo, O.F., Vanaclocha, V., Baylin, S.B. & Herman, J.G. (2000). Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *N.Engl.J.Med.*, **343**, 1350-1354.
- Falk, H., Herbert, J., Crowley, S., Ishak, K.G., Thomas, L.B., Popper, H. & Caldwell, G.G. (1981). Epidemiology of hepatic angiosarcoma in the United States: 1964-1974. *Environ.Health Perspect.*, **41**, 107-113.
- Fedarko, N.S., Fohr, B., Robey, P.G., Young, M.F. & Fisher, L.W. (2000). Factor H binding to bone sialoprotein and osteopontin enables tumor cell evasion of complement-mediated attack. *J.Biol.Chem.*, **275**, 16666-16672.
- Fedarko, N.S., Jain, A., Karadag, A., Van Eman, M.R. & Fisher, L.W. (2001). Elevated serum bone sialoprotein and osteopontin in colon, breast, prostate, and lung cancer. *Clin.Cancer Res.*, **7**, 4060-4066.
- Feldser, D., Agani, F., Iyer, N.V., Pak, B., Ferreira, G. & Semenza, G.L. (1999). Reciprocal positive regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha and insulin-like growth factor 2. *Cancer Res.*, **59**, 3915-3918.
- Fisher, B., Anderson, S., Bryant, J., Margolese, R.G., Deutsch, M., Fisher, E.R., Jeong, J.H. & Wolmark, N. (2002). Twenty-year follow-up of a randomized trial comparing total mastectomy, lumpectomy, and lumpectomy plus irradiation for the treatment of invasive breast cancer. *N.Engl.J.Med.*, **347**, 1233-1241.
- Fletcher, C.D.M., Unni, K.K., Mertens, F., World Health Organization & International Academy of Pathology (2002). Pathology and Genetics of Tumours of Soft Tissue and Bone. Fletcher, C.D.M., Unni, K.K. & Mertens, F. (eds.) Lyon: IARC Press.
- Folkman, J. (1990). What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J.Natl.Cancer Inst.*, **82**, 4-6.
- Folkman, J. (2002). Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Semin.Oncol.*, **29**, 15-18.
- Forsythe, J.A., Jiang, B.H., Iyer, N.V., Agani, F., Leung, S.W., Koos, R.D. & Semenza, G.L. (1996). Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol.Cell Biol.*, **16**, 4604-4613.
- Frick, K.K. & Bushinsky, D.A. (1998). Chronic metabolic acidosis reversibly inhibits extracellular matrix gene expression in mouse osteoblasts. *Am.J.Physiol.*, **275**, F840-F847.
- Gao, C., Guo, H., Wei, J. & Kuo, P.C. (2003). Osteopontin inhibits expression of cytochrome c oxidase in RAW 264.7 murine macrophages. *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, **309**, 120-125.
- Gaumann, A., Petrow, P., Mentzel, T., Mayer, E., Dahm, M., Otto, M., Kirkpatrick, C.J. & Kriegsmann, J. (2001). Osteopontin expression in primary sarcomas of the pulmonary artery. *Virchows Arch.*, **439**, 668-674.
- Gevorgyan, A., Sukhu, B., Alman, B.A., Bristow, R.G., Pang, C.Y. & Forrest, C.R. (2008). Radiation effects and radioprotection in MC3T3-E1 mouse calvarial osteoblastic cells. *Plast.Reconstr.Surg.*, **122**, 1025-1035.

- Giebler, M. (2011). Molekular- und strahlenbiologische Untersuchungen von Osteopontin bzw. Osteopontinspleißvarianten als therapeutische Targets in humanen Glioblastomen [Diplomarbeit]. Halle: Naturwissenschaftliche Fakultät I der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Gimba, E.R. & Tilli, T.M. (2013). Human osteopontin splicing isoforms: known roles, potential clinical applications and activated signaling pathways. *Cancer Lett.*, **331**, 11-17.
- Goodenberger, M.L. & Jenkins, R.B. (2012). Genetics of adult glioma. *Cancer Genet.*, **205**, 613-621.
- Goparaju, C.M., Pass, H.I., Blasberg, J.D., Hirsch, N. & Donington, J.S. (2010). Functional heterogeneity of osteopontin isoforms in non-small cell lung cancer. *J.Thorac.Oncol.*, **5**, 1516-1523.
- Graeber, T.G., Osmanian, C., Jacks, T., Housman, D.E., Koch, C.J., Lowe, S.W. & Giaccia, A.J. (1996). Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours. *Nature*, **379**, 88-91.
- Gray, L.H., Conger, A.D., Ebert, M., Hornsey, S. & Scott, O.C. (1953). The concentration of oxygen dissolved in tissues at the time of irradiation as a factor in radiotherapy. *Br.J.Radiol.*, **26**, 638-648.
- Guo, H., Cai, C.Q., Schroeder, R.A. & Kuo, P.C. (2001). Osteopontin is a negative feedback regulator of nitric oxide synthesis in murine macrophages. *J.Immunol.*, **166**, 1079-1086.
- Guo, W. & Giancotti, F.G. (2004). Integrin signalling during tumour progression. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.*, **5**, 816-826.
- Gupta, M.K. & Qin, R.Y. (2003). Mechanism and its regulation of tumor-induced angiogenesis. *World J.Gastroenterol.*, **9**, 1144-1155.
- Güttler, A., Giebler, M., Cuno, P., Wichmann, H., Kessler, J., Ostheimer, C., Soling, A., Strauss, C., Illert, J., Kappler, M., Vordermark, D. & Bache, M. (2013). Osteopontin and splice variant expression level in human malignant glioma: Radiobiologic effects and prognosis after radiotherapy. *Radiother.Oncol.*, **108**, 535-540.
- Hahnel, A., Wichmann, H., Greither, T., Kappler, M., Wurl, P., Kotzsch, M., Taubert, H., Vordermark, D. & Bache, M. (2012). Prognostic impact of mRNA levels of osteopontin splice variants in soft tissue sarcoma patients. *BMC.Cancer*, **12**, 131.
- Hahnel, A., Wichmann, H., Kappler, M., Kotzsch, M., Vordermark, D., Taubert, H. & Bache, M. (2010). Effects of osteopontin inhibition on radiosensitivity of MDA-MB-231 breast cancer cells. *Radiat.Oncol.*, **5**, 82.
- Hall, E.J. & Giaccia, A.J. (2006). Radiobiology for the Radiologist. Hall, E.J. & Giaccia, A.J. (eds.) Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins.
- Hampel, D.J., Sansome, C., Romanov, V.I., Kowalski, A.J., Denhardt, D.T. & Goligorsky, M.S. (2003). Osteopontin traffic in hypoxic renal epithelial cells. *Nephron Exp.Nephrol.*, **94**, e66-e76.
- Hanahan, D. & Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, **100**, 57-70.
- Hanahan, D. & Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, **144**, 646-674.
- He, B., Mirza, M. & Weber, G.F. (2006). An osteopontin splice variant induces anchorage independence in human breast cancer cells. *Oncogene*, **25**, 2192-2202.
- Higashikawa, F., Eboshida, A. & Yokosaki, Y. (2007). Enhanced biological activity of polymeric osteopontin. *FEBS Lett.*, **581**, 2697-2701.

- Hockel, M. & Vaupel, P. (2001). Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. *J.Natl.Cancer Inst.*, **93**, 266-276.
- Houshmandi, S.S. & Gutmann, D.H. (2007). All in the family: using inherited cancer syndromes to understand de-regulated cell signaling in brain tumors. *J.Cell Biochem.*, **102**, 811-819.
- Hui, E.P., Sung, F.L., Yu, B.K., Wong, C.S., Ma, B.B., Lin, X., Chan, A., Wong, W.L. & Chan, A.T. (2008). Plasma osteopontin, hypoxia, and response to radiotherapy in nasopharyngeal cancer. *Clin.Cancer Res.*, **14**, 7080-7087.
- Irshad, K., Mohapatra, S.K., Srivastava, C., Garg, H., Mishra, S., Dikshit, B., Sarkar, C., Gupta, D., Chandra, P.S., Chattopadhyay, P., Sinha, S. & Chosdol, K. (2015). A combined gene signature of hypoxia and notch pathway in human glioblastoma and its prognostic relevance. *PLoS.One.*, **10**, e0118201.
- Issels, R.D., Lindner, L.H., Verweij, J., Wust, P., Reichardt, P., Schem, B.C., Abdel-Rahman, S., Daugaard, S., Salat, C., Wendtner, C.M., Vujaskovic, Z., Wessalowski, R., Jauch, K.W., Durr, H.R., Ploner, F., Baur-Melnyk, A., Mansmann, U., Hiddemann, W., Blay, J.Y. & Hohenberger, P. (2010). Neo-adjuvant chemotherapy alone or with regional hyperthermia for localised high-risk soft-tissue sarcoma: a randomised phase 3 multicentre study. *Lancet Oncol.*, **11**, 561-570.
- Ito, T., Hashimoto, Y., Tanaka, E., Kan, T., Tsunoda, S., Sato, F., Higashiyama, M., Okumura, T. & Shimada, Y. (2006). An inducible short-hairpin RNA vector against osteopontin reduces metastatic potential of human esophageal squamous cell carcinoma in vitro and in vivo. *Clin.Cancer Res.*, **12**, 1308-1316.
- Ivanov, S.V., Ivanova, A.V., Goparaju, C.M., Chen, Y., Beck, A. & Pass, H.I. (2009). Tumorigenic properties of alternative osteopontin isoforms in mesothelioma. *Biochem.Biophys.Res.Communic.*, **382**, 514-518.
- Jang, T., Savarese, T., Low, H.P., Kim, S., Vogel, H., Lapointe, D., Duong, T., Litofsky, N.S., Weimann, J.M., Ross, A.H. & Recht, L. (2006). Osteopontin expression in intratumoral astrocytes marks tumor progression in gliomas induced by prenatal exposure to N-ethyl-N-nitrosourea. *Am.J.Pathol.*, **168**, 1676-1685.
- Johnson, K.C., Miller, A.B., Collishaw, N.E., Palmer, J.R., Hammond, S.K., Salmon, A.G., Cantor, K.P., Miller, M.D., Boyd, N.F., Millar, J. & Turcotte, F. (2011). Active smoking and secondhand smoke increase breast cancer risk: the report of the Canadian Expert Panel on Tobacco Smoke and Breast Cancer Risk (2009). *Tob.Control*, **20**, e2.
- Kaanders, J.H., Bussink, J. & van der Kogel, A.J. (2002). ARCON: a novel biology-based approach in radiotherapy. *Lancet Oncol.*, **3**, 728-737.
- Katagiri, Y.U., Sleeman, J., Fujii, H., Herrlich, P., Hotta, H., Tanaka, K., Chikuma, S., Yagita, H., Okumura, K., Murakami, M., Saiki, I., Chambers, A.F. & Uede, T. (1999). CD44 variants but not CD44s cooperate with beta1-containing integrins to permit cells to bind to osteopontin independently of arginine-glycine-aspartic acid, thereby stimulating cell motility and chemotaxis. *Cancer Res.*, **59**, 219-226.
- Kaufmann, S.H., Desnoyers, S., Ottaviano, Y., Davidson, N.E. & Poirier, G.G. (1993). Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res.*, **53**, 3976-3985.
- Kessler, J., Hahnel, A., Wichmann, H., Rot, S., Kappler, M., Bache, M. & Vordermark, D. (2010). HIF-1alpha inhibition by siRNA or chetomin in human malignant glioma cells: effects on hypoxic radioresistance and monitoring via CA9 expression. *BMC.Cancer*, **10**, 605.

- Khan, S.A., Lopez-Chua, C.A., Zhang, J., Fisher, L.W., Sorensen, E.S. & Denhardt, D.T. (2002). Soluble osteopontin inhibits apoptosis of adherent endothelial cells deprived of growth factors. *J.Cell Biochem.*, **85**, 728-736.
- Kinzler, K.W. & Vogelstein, B. (1996). Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell*, **87**, 159-170.
- Kobayashi, S., Sugiura, H., Ando, Y., Shiraki, N., Yanagi, T., Yamashita, H. & Toyama, T. (2012). Reproductive history and breast cancer risk. *Breast Cancer*, **19**, 302-308.
- Krengli, M., Policarpo, M., Manfreda, I., Aluffi, P., Gambaro, G., Panella, M. & Pia, F. (2004). Voice quality after treatment for T1a glottic carcinoma--radiotherapy versus laser cordectomy. *Acta Oncol.*, **43**, 284-289.
- Le, Q.T., Chen, E., Salim, A., Cao, H., Kong, C.S., Whyte, R., Donington, J., Cannon, W., Wakelee, H., Tibshirani, R., Mitchell, J.D., Richardson, D., O'Byrne, K.J., Koong, A.C. & Giaccia, A.J. (2006). An evaluation of tumor oxygenation and gene expression in patients with early stage non-small cell lung cancers. *Clin.Cancer Res.*, **12**, 1507-1514.
- Le, Q.T., Kong, C., Lavori, P.W., O'byrne, K., Erler, J.T., Huang, X., Chen, Y., Cao, H., Tibshirani, R., Denko, N., Giaccia, A.J. & Koong, A.C. (2007). Expression and prognostic significance of a panel of tissue hypoxia markers in head-and-neck squamous cell carcinomas. *Int.J.Radiat.Oncol.Biol.Phys.*, **69**, 167-175.
- Le, Q.T., Sutphin, P.D., Raychaudhuri, S., Yu, S.C., Terris, D.J., Lin, H.S., Lum, B., Pinto, H.A., Koong, A.C. & Giaccia, A.J. (2003). Identification of osteopontin as a prognostic plasma marker for head and neck squamous cell carcinomas. *Clin.Cancer Res.*, **9**, 59-67.
- Lee, J.L., Wang, M.J., Sudhir, P.R., Chen, G.D., Chi, C.W. & Chen, J.Y. (2007). Osteopontin promotes integrin activation through outside-in and inside-out mechanisms: OPN-CD44V interaction enhances survival in gastrointestinal cancer cells. *Cancer Res.*, **67**, 2089-2097.
- Lee, S.A., Ross, R.K. & Pike, M.C. (2005). An overview of menopausal oestrogen-progestin hormone therapy and breast cancer risk. *Br.J.Cancer*, **92**, 2049-2058.
- Li, P., Oparil, S., Feng, W. & Chen, Y.F. (2004). Hypoxia-responsive growth factors upregulate periostin and osteopontin expression via distinct signaling pathways in rat pulmonary arterial smooth muscle cells. *J.Appl.Physiol (1985.)*, **97**, 1550-1558.
- Liao, S.Y., Aurelio, O.N., Jan, K., Zavada, J. & Stanbridge, E.J. (1997). Identification of the MN/CA9 protein as a reliable diagnostic biomarker of clear cell carcinoma of the kidney. *Cancer Res.*, **57**, 2827-2831.
- Likui, W., Hong, W., Shuwen, Z., Yuangang, Y. & Yan, W. (2011). The potential of osteopontin as a therapeutic target for human colorectal cancer. *J.Gastrointest.Surg.*, **15**, 652-659.
- Lin, J., Myers, A.L., Wang, Z., Nancarrow, D.J., Ferrer-Torres, D., Handlogten, A., Leverenz, K., Bao, J., Thomas, D.G., Wang, T.D., Orringer, M.B., Reddy, R.M., Chang, A.C., Beer, D.G. & Lin, L. (2015). Osteopontin (OPN/SPP1) isoforms collectively enhance tumor cell invasion and dissemination in esophageal adenocarcinoma. *Oncotarget.*, **6**, 22239-22257.
- Lin, Y.H. & Yang-Yen, H.F. (2001). The osteopontin-CD44 survival signal involves activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway. *J.Biol.Chem.*, **276**, 46024-46030.
- Lippman, M.E., Dickson, R.B., Bates, S., Knabbe, C., Huff, K., Swain, S., McManaway, M., Bronzert, D., Kasid, A. & Gelmann, E.P. (1986). 8th San Antonio Breast Cancer Symposium--Plenary lecture. Autocrine and paracrine growth regulation of human breast cancer. *Breast Cancer Res.Treat.*, **7**, 59-70.

- Louis, D.N., Ohgaki, H., Wiestler, O.D., Cavenee, W.K., Burger, P.C., Jouvet, A., Scheithauer, B.W. & Kleihues, P. (2007). The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol.*, **114**, 97-109.
- Manalo, D.J., Rowan, A., Lavoie, T., Natarajan, L., Kelly, B.D., Ye, S.Q., Garcia, J.G. & Semenza, G.L. (2005). Transcriptional regulation of vascular endothelial cell responses to hypoxia by HIF-1. *Blood*, **105**, 659-669.
- Marcu, L. & Olver, I. (2006). Tirapazamine: from bench to clinical trials. *Curr.Clin.Pharmacol.*, **1**, 71-79.
- Mason, C.K., McFarlane, S., Johnston, P.G., Crowe, P., Erwin, P.J., Domostoj, M.M., Campbell, F.C., Manaviyar, S., Hale, K.J. & El Tanani, M. (2008). Agelastatin A: a novel inhibitor of osteopontin-mediated adhesion, invasion, and colony formation. *Mol.Cancer Ther.*, **7**, 548-558.
- Matsumura, S., Hiranuma, H., Deguchi, A., Maeda, T., Jikko, A. & Fuchihata, H. (1998). Changes in phenotypic expression of osteoblasts after X irradiation. *Radiat.Res.*, **149**, 463-471.
- Matusan-Ilijas, K., Behrem, S., Jonjic, N., Zarkovic, K. & Lucin, K. (2008). Osteopontin expression correlates with angiogenesis and survival in malignant astrocytoma. *Pathol.Oncol.Res.*, **14**, 293-298.
- Min, W., Shiraga, H., Chalko, C., Goldfarb, S., Krishna, G.G. & Hoyer, J.R. (1998). Quantitative studies of human urinary excretion of uropontin. *Kidney Int.*, **53**, 189-193.
- Minai-Tehrani, A., Jiang, H.L., Kim, Y.K., Chung, Y.S., Yu, K.N., Kim, J.E., Shin, J.Y., Hong, S.H., Lee, J.H., Kim, H.J., Chang, S.H., Park, S., Kang, B.N., Cho, C.S. & Cho, M.H. (2012). Suppression of tumor growth in xenograft model mice by small interfering RNA targeting osteopontin delivery using biocompatible poly(amino ester). *Int.J.Pharm.*, **431**, 197-203.
- Mirza, M., Shaughnessy, E., Hurley, J.K., Vanpatten, K.A., Pestano, G.A., He, B. & Weber, G.F. (2008). Osteopontin-c is a selective marker of breast cancer. *Int.J.Cancer*, **122**, 889-897.
- Moroz, E., Carlin, S., Dyomina, K., Burke, S., Thaler, H.T., Blasberg, R. & Serganova, I. (2009). Real-time imaging of HIF-1alpha stabilization and degradation. *PLoS.One.*, **4**, e5077.
- Nishio, S., Hatanaka, M., Takeda, H., Aoki, K., Iseda, T., Iwata, H. & Yokoyama, M. (2000). Calcium phosphate crystal-associated proteins: alpha2-HS-glycoprotein, prothrombin F1, and osteopontin. *Mol.Urol.*, **4**, 383-390.
- Nishio, S., Hatanaka, M., Takeda, H., Iseda, T., Iwata, H. & Yokoyama, M. (1999). Analysis of urinary concentrations of calcium phosphate crystal-associated proteins: alpha2-HS-glycoprotein, prothrombin F1, and osteopontin. *J.Am.Soc.Nephrol.*, **10 Suppl 14**, S394-S396.
- Nizet, V. & Johnson, R.S. (2009). Interdependence of hypoxic and innate immune responses. *Nat.Rev.Immunol.*, **9**, 609-617.
- Nordmark, M., Alsner, J., Keller, J., Nielsen, O.S., Jensen, O.M., Horsman, M.R. & Overgaard, J. (2001). Hypoxia in human soft tissue sarcomas: adverse impact on survival and no association with p53 mutations. *Br.J.Cancer*, **84**, 1070-1075.
- Nordmark, M., Bentzen, S.M. & Overgaard, J. (1994). Measurement of human tumour oxygenation status by a polarographic needle electrode. An analysis of inter- and intratumour heterogeneity. *Acta Oncol.*, **33**, 383-389.
- Nordmark, M., Eriksen, J.G., Gebiski, V., Alsner, J., Horsman, M.R. & Overgaard, J. (2007). Differential risk assessments from five hypoxia specific assays: The basis for biologically adapted

- individualized radiotherapy in advanced head and neck cancer patients. *Radiother.Oncol.*, **83**, 389-397.
- O'Regan, A. & Berman, J.S. (2000). Osteopontin: a key cytokine in cell-mediated and granulomatous inflammation. *Int.J.Exp.Pathol.*, **81**, 373-390.
- O'Regan, A.W., Chupp, G.L., Lowry, J.A., Goetschkes, M., Mulligan, N. & Berman, J.S. (1999). Osteopontin is associated with T cells in sarcoid granulomas and has T cell adhesive and cytokine-like properties in vitro. *J.Immunol.*, **162**, 1024-1031.
- Oldberg, A., Franzen, A. & Heinegard, D. (1986). Cloning and sequence analysis of rat bone sialoprotein (osteopontin) cDNA reveals an Arg-Gly-Asp cell-binding sequence. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **83**, 8819-8823.
- Ortiz-Martinez, F., Perez-Balaguer, A., Ciprian, D., Andres, L., Ponce, J., Adrover, E., Sanchez-Paya, J., Aranda, F.I., Lerma, E. & Peiro, G. (2014). Association of increased osteopontin and splice variant-c mRNA expression with HER2 and triple-negative/basal-like breast carcinomas subtypes and recurrence. *Hum.Pathol.*, **45**, 504-512.
- Ostheimer, C., Bache, M., Güttler, A., Kotzsch, M. & Vordermark, D. (2014a). A pilot study on potential plasma hypoxia markers in the radiotherapy of non-small cell lung cancer : Osteopontin, carbonic anhydrase IX and vascular endothelial growth factor. *Strahlenther.Onkol.*, **190**, 276-282.
- Ostheimer, C., Bache, M., Güttler, A., Reese, T. & Vordermark, D. (2014b). Prognostic information of serial plasma osteopontin measurement in radiotherapy of non-small-cell lung cancer. *BMC.Cancer*, **14**, 858.
- Overgaard, J. (2007). Hypoxic radiosensitization: adored and ignored. *J.Clin.Oncol.*, **25**, 4066-4074.
- Overgaard, J., Eriksen, J.G., Nordmark, M., Alsner, J. & Horsman, M.R. (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**, 757-764.
- Overgaard, M., Jensen, M.B., Overgaard, J., Hansen, P.S., Rose, C., Andersson, M., Kamby, C., Kjaer, M., Gadeberg, C.C., Rasmussen, B.B., Blichert-Toft, M. & Mouridsen, H.T. (1999). Postoperative radiotherapy in high-risk postmenopausal breast-cancer patients given adjuvant tamoxifen: Danish Breast Cancer Cooperative Group DBCG 82c randomised trial. *Lancet*, **353**, 1641-1648.
- Palioto, D.B., Rodrigues, T.L., Marchesan, J.T., Beloti, M.M., de Oliveira, P.T. & Rosa, A.L. (2011). Effects of enamel matrix derivative and transforming growth factor-beta1 on human osteoblastic cells. *Head Face.Med.*, **7**, 13.
- Parsa, P. & Parsa, B. (2009). Effects of reproductive factors on risk of breast cancer: a literature review. *Asian Pac.J.Cancer Prev.*, **10**, 545-550.
- Patani, N., Jouhra, F., Jiang, W. & Mokbel, K. (2008). Osteopontin expression profiles predict pathological and clinical outcome in breast cancer. *Anticancer Res.*, **28**, 4105-4110.
- Patiar, S. & Harris, A.L. (2006). Role of hypoxia-inducible factor-1alpha as a cancer therapy target. *Endocr.Relat Cancer*, **13 Suppl 1**, S61-S75.
- Pervaiz, N., Colterjohn, N., Farrokhyar, F., Tozer, R., Figueredo, A. & Ghert, M. (2008). A systematic meta-analysis of randomized controlled trials of adjuvant chemotherapy for localized resectable soft-tissue sarcoma. *Cancer*, **113**, 573-581.

- Petersen, I. (2013). [The new WHO classification and recent results in soft tissue tumor pathology]. *Pathologe*, **34**, 436-448.
- Philip, S. & Kundu, G.C. (2003). Osteopontin induces nuclear factor kappa B-mediated promatrix metalloproteinase-2 activation through I kappa B alpha /IKK signaling pathways, and curcumin (diferuloylmethane) down-regulates these pathways. *J.Biol.Chem.*, **278**, 14487-14497.
- Polat, B., Wohlleben, G., Katzer, A., Djuzenova, C.S., Technau, A. & Flentje, M. (2013). Influence of osteopontin silencing on survival and migration of lung cancer cells. *Strahlenther.Onkol.*, **189**, 62-67.
- Pritzker, L.B., Scatena, M. & Giachelli, C.M. (2004). The role of osteoprotegerin and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in human microvascular endothelial cell survival. *Mol.Biol.Cell*, **15**, 2834-2841.
- Raheja, L.F., Genetos, D.C. & Yellowley, C.E. (2008). Hypoxic osteocytes recruit human MSCs through an OPN/CD44-mediated pathway. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, **366**, 1061-1066.
- Ramplung, R., Cruickshank, G., Lewis, A.D., Fitzsimmons, S.A. & Workman, P. (1994). Direct measurement of pO<sub>2</sub> distribution and bioreductive enzymes in human malignant brain tumors. *Int.J.Radiat.Oncol.Biol.Phys.*, **29**, 427-431.
- Rangaswami, H., Bulbule, A. & Kundu, G.C. (2004). Nuclear factor-inducing kinase plays a crucial role in osteopontin-induced MAPK/IkappaBalpha kinase-dependent nuclear factor kappaB-mediated promatrix metalloproteinase-9 activation. *J.Biol.Chem.*, **279**, 38921-38935.
- Rangaswami, H., Bulbule, A. & Kundu, G.C. (2006). Osteopontin: role in cell signaling and cancer progression. *Trends Cell Biol.*, **16**, 79-87.
- Reeves, G.K., Pirie, K., Beral, V., Green, J., Spencer, E. & Bull, D. (2007). Cancer incidence and mortality in relation to body mass index in the Million Women Study: cohort study. *BMJ*, **335**, 1134.
- Reynolds, T.Y., Rockwell, S. & Glazer, P.M. (1996). Genetic instability induced by the tumor microenvironment. *Cancer Res.*, **56**, 5754-5757.
- Riad, S., Biau, D., Holt, G.E., Werier, J., Turcotte, R.E., Ferguson, P.C., Griffin, A.M., Dickie, C.I., Chung, P.W., Catton, C.N., O'sullivan, B. & Wunder, J.S. (2012). The clinical and functional outcome for patients with radiation-induced soft tissue sarcoma. *Cancer*, **118**, 2682-2692.
- Richter, E. & Feyerabend, T. (2002). Grundlagen der Strahlentherapie. Richter, E. & Feyerabend, T. (eds.) Berlin: Springer-Verlag.
- Rittling, S.R. & Chambers, A.F. (2004). Role of osteopontin in tumour progression. *Br.J.Cancer*, **90**, 1877-1881.
- Roberts, M.M., Alexander, F.E., Anderson, T.J., Chetty, U., Donnan, P.T., Forrest, P., Hepburn, W., Huggins, A., Kirkpatrick, A.E., Lamb, J. & . (1990). Edinburgh trial of screening for breast cancer: mortality at seven years. *Lancet*, **335**, 241-246.
- Rollo, E.E., Laskin, D.L. & Denhardt, D.T. (1996). Osteopontin inhibits nitric oxide production and cytotoxicity by activated RAW264.7 macrophages. *J.Leukoc.Biol.*, **60**, 397-404.
- Romond, E.H., Perez, E.A., Bryant, J., Suman, V.J., Geyer, C.E., Jr., Davidson, N.E., Tan-Chiu, E., Martino, S., Paik, S., Kaufman, P.A., Swain, S.M., Pisansky, T.M., Fehrenbacher, L., Kutteh, L.A., Vogel, V.G., Visscher, D.W., Yothers, G., Jenkins, R.B., Brown, A.M., Dakhil, S.R., Mamounas,

- E.P., Lingle, W.L., Klein, P.M., Ingle, J.N. & Wolmark, N. (2005). Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *N.Engl.J.Med.*, **353**, 1673-1684.
- Ronckers, C.M., Erdmann, C.A. & Land, C.E. (2005). Radiation and breast cancer: a review of current evidence. *Breast Cancer Res.*, **7**, 21-32.
- Rudland, P.S., Platt-Higgins, A., El Tanani, M., De Silva, R.S., Barraclough, R., Winstanley, J.H., Howitt, R. & West, C.R. (2002). Prognostic significance of the metastasis-associated protein osteopontin in human breast cancer. *Cancer Res.*, **62**, 3417-3427.
- Rundqvist, H. & Johnson, R.S. (2013). Tumour oxygenation: implications for breast cancer prognosis. *J.Intern.Med.*, **274**, 105-112.
- Saarnio, J., Parkkila, S., Parkkila, A.K., Haukipuro, K., Pastorekova, S., Pastorek, J., Kairaluoma, M.I. & Karttunen, T.J. (1998). Immunohistochemical study of colorectal tumors for expression of a novel transmembrane carbonic anhydrase, MN/CA IX, with potential value as a marker of cell proliferation. *Am.J.Pathol.*, **153**, 279-285.
- Sadikovic, B., Thorner, P., Chilton-MacNeill, S., Martin, J.W., Cervigne, N.K., Squire, J. & Zielenska, M. (2010). Expression analysis of genes associated with human osteosarcoma tumors shows correlation of RUNX2 overexpression with poor response to chemotherapy. *BMC.Cancer*, **10**, 202.
- Sadikovic, B., Yoshimoto, M., Chilton-MacNeill, S., Thorner, P., Squire, J.A. & Zielenska, M. (2009). Identification of interactive networks of gene expression associated with osteosarcoma oncogenesis by integrated molecular profiling. *Hum.Mol.Genet.*, **18**, 1962-1975.
- Said, H.M., Hagemann, C., Staab, A., Stojic, J., Kuhnel, S., Vince, G.H., Flentje, M., Roosen, K. & Vordermark, D. (2007). Expression patterns of the hypoxia-related genes osteopontin, CA9, erythropoietin, VEGF and HIF-1alpha in human glioma in vitro and in vivo. *Radiother.Oncol.*, **83**, 398-405.
- Said, H.M., Katzer, A., Flentje, M. & Vordermark, D. (2005). Response of the plasma hypoxia marker osteopontin to in vitro hypoxia in human tumor cells. *Radiother.Oncol.*, **76**, 200-205.
- Saitoh, Y., Kuratsu, J., Takeshima, H., Yamamoto, S. & Ushio, Y. (1995). Expression of osteopontin in human glioma. Its correlation with the malignancy. *Lab Invest*, **72**, 55-63.
- Samartzis, D., Nishi, N., Cologne, J., Funamoto, S., Hayashi, M., Kodama, K., Miles, E.F., Suyama, A., Soda, M. & Kasagi, F. (2013). Ionizing radiation exposure and the development of soft-tissue sarcomas in atomic-bomb survivors. *J.Bone Joint Surg.Am.*, **95**, 222-229.
- Scatena, M., Almeida, M., Chaisson, M.L., Fausto, N., Nicosia, R.F. & Giachelli, C.M. (1998). NF-kappaB mediates alphavbeta3 integrin-induced endothelial cell survival. *J.Cell Biol.*, **141**, 1083-1093.
- Selikoff, I.J., Hammond, E.C. & Seidman, H. (1979). Mortality experience of insulation workers in the United States and Canada, 1943--1976. *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, **330**, 91-116.
- Senger, D.R., Ledbetter, S.R., Claffey, K.P., Papadopoulos-Sergiou, A., Peruzzi, C.A. & Detmar, M. (1996). Stimulation of endothelial cell migration by vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor through cooperative mechanisms involving the alphavbeta3 integrin, osteopontin, and thrombin. *Am.J.Pathol.*, **149**, 293-305.
- Senger, D.R., Perruzzi, C.A., Papadopoulos-Sergiou, A. & Van de, W.L. (1994). Adhesive properties of osteopontin: regulation by a naturally occurring thrombin-cleavage in close proximity to the GRGDS cell-binding domain. *Mol.Biol.Cell*, **5**, 565-574.

- Senger, D.R., Wirth, D.F. & Hynes, R.O. (1979). Transformed mammalian cells secrete specific proteins and phosphoproteins. *Cell*, **16**, 885-893.
- Shevde, L.A., Das, S., Clark, D.W. & Samant, R.S. (2010). Osteopontin: an effector and an effect of tumor metastasis. *Curr.Mol.Med.*, **10**, 71-81.
- Shi, Z., Mirza, M., Wang, B., Kennedy, M.A. & Weber, G.F. (2014). Osteopontin-a alters glucose homeostasis in anchorage-independent breast cancer cells. *Cancer Lett.*, **344**, 47-53.
- Shinohara, M.L., Kim, H.J., Kim, J.H., Garcia, V.A. & Cantor, H. (2008). Alternative translation of osteopontin generates intracellular and secreted isoforms that mediate distinct biological activities in dendritic cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **105**, 7235-7239.
- Shiraga, H., Min, W., VanDusen, W.J., Clayman, M.D., Miner, D., Terrell, C.H., Sherbotie, J.R., Foreman, J.W., Przysiecki, C., Neilson, E.G. & . (1992). Inhibition of calcium oxalate crystal growth in vitro by uropontin: another member of the aspartic acid-rich protein superfamily. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **89**, 426-430.
- Siddik, Z.H. (2010). Checkpoint Controls and Targets in Cancer Therapy. Siddik, Z.H. (ed) Humana.
- Siddiqui, A.A., Jones, E., Andrade, D., Shah, A., Kowalski, T.E., Loren, D.E., Chipitsyna, G. & Arafat, H.A. (2014). Osteopontin splice variant as a potential marker for metastatic disease in pancreatic adenocarcinoma. *J.Gastroenterol.Hepatol.*, **29**, 1321-1327.
- Singhal, H., Bautista, D.S., Tonkin, K.S., O'Malley, F.P., Tuck, A.B., Chambers, A.F. & Harris, J.F. (1997). Elevated plasma osteopontin in metastatic breast cancer associated with increased tumor burden and decreased survival. *Clin.Cancer Res.*, **3**, 605-611.
- Slamon, D.J., Clark, G.M., Wong, S.G., Levin, W.J., Ullrich, A. & McGuire, W.L. (1987). Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science*, **235**, 177-182.
- Smith, I., Procter, M., Gelber, R.D., Guillaume, S., Feyereislova, A., Dowsett, M., Goldhirsch, A., Untch, M., Mariani, G., Baselga, J., Kaufmann, M., Cameron, D., Bell, R., Bergh, J., Coleman, R., Wardley, A., Harbeck, N., Lopez, R.I., Mallmann, P., Gelmon, K., Wilcken, N., Wist, E., Sanchez, R.P. & Piccart-Gebhart, M.J. (2007). 2-year follow-up of trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer: a randomised controlled trial. *Lancet*, **369**, 29-36.
- Sodhi, C.P., Battle, D. & Sahai, A. (2000). Osteopontin mediates hypoxia-induced proliferation of cultured mesangial cells: role of PKC and p38 MAPK. *Kidney Int.*, **58**, 691-700.
- Sodhi, C.P., Phadke, S.A., Battle, D. & Sahai, A. (2001a). Hypoxia and high glucose cause exaggerated mesangial cell growth and collagen synthesis: role of osteopontin. *Am.J.Physiol Renal Physiol*, **280**, F667-F674.
- Sodhi, C.P., Phadke, S.A., Battle, D. & Sahai, A. (2001b). Hypoxia stimulates osteopontin expression and proliferation of cultured vascular smooth muscle cells: potentiation by high glucose. *Diabetes*, **50**, 1482-1490.
- Sorensen, B.S., Alsner, J., Overgaard, J. & Horsman, M.R. (2007). Hypoxia induced expression of endogenous markers in vitro is highly influenced by pH. *Radiother.Oncol.*, **83**, 362-366.
- Sorensen, B.S., Hao, J., Overgaard, J., Vorum, H., Honore, B., Alsner, J. & Horsman, M.R. (2005). Influence of oxygen concentration and pH on expression of hypoxia induced genes. *Radiother.Oncol.*, **76**, 187-193.

- Sreeranthreddy, P., Srinivasan, H., Kumar, D.M., Nijaguna, M.B., Sridevi, S., Vrinda, M., Arivazhagan, A., Balasubramaniam, A., Hegde, A.S., Chandramouli, B.A., Santosh, V., Rao, M.R., Kondaiah, P. & Somasundaram, K. (2010). Identification of potential serum biomarkers of glioblastoma: serum osteopontin levels correlate with poor prognosis. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.*, **19**, 1409-1422.
- Standal, T., Borset, M. & Sundan, A. (2004). Role of osteopontin in adhesion, migration, cell survival and bone remodeling. *Exp.Oncol.*, **26**, 179-184.
- Stupp, R., Mason, W.P., van den Bent, M.J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M.J., Belanger, K., Brandes, A.A., Marosi, C., Bogdahn, U., Curschmann, J., Janzer, R.C., Ludwin, S.K., Gorlia, T., Allgeier, A., Lacombe, D., Cairncross, J.G., Eisenhauer, E. & Mirimanoff, R.O. (2005). Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N.Engl.J.Med.*, **352**, 987-996.
- Sulzbacher, I., Birner, P., Trieb, K., Lang, S. & Chott, A. (2002). Expression of osteopontin and vascular endothelial growth factor in benign and malignant bone tumors. *Virchows Arch.*, **441**, 345-349.
- Suzuki, K., Zhu, B., Rittling, S.R., Denhardt, D.T., Goldberg, H.A., McCulloch, C.A. & Sodek, J. (2002). Colocalization of intracellular osteopontin with CD44 is associated with migration, cell fusion, and resorption in osteoclasts. *J.Bone Miner.Res.*, **17**, 1486-1497.
- Tabar, L., Fagerberg, G., Duffy, S.W. & Day, N.E. (1989). The Swedish two county trial of mammographic screening for breast cancer: recent results and calculation of benefit. *J.Epidemiol.Community Health*, **43**, 107-114.
- Takafuji, V., Forgues, M., Unsworth, E., Goldsmith, P. & Wang, X.W. (2007). An osteopontin fragment is essential for tumor cell invasion in hepatocellular carcinoma. *Oncogene*, **26**, 6361-6371.
- Takahashi, F., Takahashi, K., Maeda, K., Tominaga, S. & Fukuchi, Y. (2000). Osteopontin is induced by nitric oxide in RAW 264.7 cells. *IUBMB.Life*, **49**, 217-221.
- Tang, X., Li, J., Yu, B., Su, L., Yu, Y., Yan, M., Liu, B. & Zhu, Z. (2013). Osteopontin splice variants differentially exert clinicopathological features and biological functions in gastric cancer. *Int.J.Biol.Sci.*, **9**, 55-66.
- Tavassoli, F.A., Devilee, P., International Agency for Research on Cancer & World Health Organization (2003). Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs. Tavassoli, F.A. & Devilee, P. (eds.) Lyon: IARC Press.
- Tilli, T.M., Franco, V.F., Robbs, B.K., Wanderley, J.L., da Silva, F.R., de Mello, K.D., Viola, J.P., Weber, G.F. & Gimba, E.R. (2011). Osteopontin-c splicing isoform contributes to ovarian cancer progression. *Mol.Cancer Res.*, **9**, 280-293.
- Tilli, T.M., Mello, K.D., Ferreira, L.B., Matos, A.R., Accioly, M.T., Faria, P.A., Bellahcene, A., Castronovo, V. & Gimba, E.R. (2012). Both osteopontin-c and osteopontin-b splicing isoforms exert pro-tumorigenic roles in prostate cancer cells. *Prostate*, **72**, 1688-1699.
- Toy, H., Yavas, O., Eren, O., Genc, M. & Yavas, C. (2009). Correlation between osteopontin protein expression and histological grade of astrocytomas. *Pathol.Oncol.Res.*, **15**, 203-207.
- Trojani, M., Contesso, G., Coindre, J.M., Rouesse, J., Bui, N.B., de Mascarel, A., Goussot, J.F., David, M., Bonichon, F. & Lagarde, C. (1984). Soft-tissue sarcomas of adults; study of pathological prognostic variables and definition of a histopathological grading system. *Int.J.Cancer*, **33**, 37-42.

- Tsai, W.C., Lee, H.S., Lin, C.K., Chen, A., Nieh, S. & Ma, H.I. (2012). The association of osteopontin and LMX1A expression with World Health Organization grade in meningiomas and gliomas. *Histopathology*, **61**, 844-856.
- Tuck, A.B., Arsenault, D.M., O'Malley, F.P., Hota, C., Ling, M.C., Wilson, S.M. & Chambers, A.F. (1999). Osteopontin induces increased invasiveness and plasminogen activator expression of human mammary epithelial cells. *Oncogene*, **18**, 4237-4246.
- Tuck, A.B., Chambers, A.F. & Allan, A.L. (2007). Osteopontin overexpression in breast cancer: knowledge gained and possible implications for clinical management. *J.Cell Biochem.*, **102**, 859-868.
- Tuck, A.B., Elliott, B.E., Hota, C., Tremblay, E. & Chambers, A.F. (2000). Osteopontin-induced, integrin-dependent migration of human mammary epithelial cells involves activation of the hepatocyte growth factor receptor (Met). *J.Cell Biochem.*, **78**, 465-475.
- Tuck, A.B., Hota, C., Wilson, S.M. & Chambers, A.F. (2003). Osteopontin-induced migration of human mammary epithelial cells involves activation of EGF receptor and multiple signal transduction pathways. *Oncogene*, **22**, 1198-1205.
- Tuck, A.B., O'Malley, F.P., Singhal, H., Harris, J.F., Tonkin, K.S., Kerkvliet, N., Saad, Z., Doig, G.S. & Chambers, A.F. (1998). Osteopontin expression in a group of lymph node negative breast cancer patients. *Int.J.Cancer*, **79**, 502-508.
- Turner, J.R., Odze, R.D., Crum, C.P. & Resnick, M.B. (1997). MN antigen expression in normal, preneoplastic, and neoplastic esophagus: a clinicopathological study of a new cancer-associated biomarker. *Hum.Pathol.*, **28**, 740-744.
- Valastyan, S. & Weinberg, R.A. (2011). Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. *Cell*, **147**, 275-292.
- van den Bent, M.J., Brandes, A.A., Taphoorn, M.J., Kros, J.M., Kouwenhoven, M.C., Delattre, J.Y., Bernsen, H.J., Frenay, M., Tijssen, C.C., Grisold, W., Sipos, L., Enting, R.H., French, P.J., Dinjens, W.N., Vecht, C.J., Allgeier, A., Lacombe, D., Gorlia, T. & Hoang-Xuan, K. (2013). Adjuvant procarbazine, lomustine, and vincristine chemotherapy in newly diagnosed anaplastic oligodendroglioma: long-term follow-up of EORTC brain tumor group study 26951. *J.Clin.Oncol.*, **31**, 344-350.
- Vaupel, P., Briest, S. & Hockel, M. (2002). Hypoxia in breast cancer: pathogenesis, characterization and biological/therapeutic implications. *Wien.Med.Wochenschr.*, **152**, 334-342.
- Vaupel, P. & Mayer, A. (2005). Hypoxia and anemia: effects on tumor biology and treatment resistance. *Transfus.Clin.Biol.*, **12**, 5-10.
- Vaupel, P., Schlenger, K., Knoop, C. & Hockel, M. (1991). Oxygenation of human tumors: evaluation of tissue oxygen distribution in breast cancers by computerized O<sub>2</sub> tension measurements. *Cancer Res.*, **51**, 3316-3322.
- Vergis, R., Corbishley, C.M., Norman, A.R., Bartlett, J., Jhavar, S., Borre, M., Heeboll, S., Horwich, A., Huddart, R., Khoo, V., Eeles, R., Cooper, C., Sydes, M., Dearnaley, D. & Parker, C. (2008). Intrinsic markers of tumour hypoxia and angiogenesis in localised prostate cancer and outcome of radical treatment: a retrospective analysis of two randomised radiotherapy trials and one surgical cohort study. *Lancet Oncol.*, **9**, 342-351.
- Vermylen, P., Roufousse, C., Burny, A., Verhest, A., Bosschaerts, T., Pastorekova, S., Ninane, V. & Sculier, J.P. (1999). Carbonic anhydrase IX antigen differentiates between preneoplastic malignant lesions in non-small cell lung carcinoma. *Eur.Respir.J.*, **14**, 806-811.

- von Sonntag, C. (2006). Free-radical-induced DNA damage and its repair: A chemical perspective. von Sonntag, C. (ed) Berlin: Springer-Verlag.
- Vordermark, D. & Brown, J.M. (2003). Endogenous markers of tumor hypoxia predictors of clinical radiation resistance? *Strahlenther.Onkol.*, **179**, 801-811.
- Vordermark, D., Kaffer, A., Riedl, S., Katzer, A. & Flentje, M. (2005). Characterization of carbonic anhydrase IX (CA IX) as an endogenous marker of chronic hypoxia in live human tumor cells. *Int.J.Radiat.Oncol.Biol.Phys.*, **61**, 1197-1207.
- Wai, P.Y., Guo, L., Gao, C., Mi, Z., Guo, H. & Kuo, P.C. (2006). Osteopontin inhibits macrophage nitric oxide synthesis to enhance tumor proliferation. *Surgery*, **140**, 132-140.
- Wai, P.Y. & Kuo, P.C. (2008). Osteopontin: regulation in tumor metastasis. *Cancer Metastasis Rev.*, **27**, 103-118.
- Wai, P.Y., Mi, Z., Guo, H., Sarraf-Yazdi, S., Gao, C., Wei, J., Marroquin, C.E., Clary, B. & Kuo, P.C. (2005). Osteopontin silencing by small interfering RNA suppresses in vitro and in vivo CT26 murine colon adenocarcinoma metastasis. *Carcinogenesis*, **26**, 741-751.
- Weber, G.F., Lett, G.S. & Haubein, N.C. (2010). Osteopontin is a marker for cancer aggressiveness and patient survival. *Br.J.Cancer*, **103**, 861-869.
- Weiss, S.W. & Goldblum, J.R. (2007). Enzinger and Weiss's Soft tissue tumors. Weiss, S.W. & Goldblum, J.R. (eds.) St. Louis, MO: Mosby.
- Wohlleben, G., Scherzad, A., Guttler, A., Vordermark, D., Kuger, S., Flentje, M. & Polat, B. (2015). Influence of hypoxia and irradiation on osteopontin expression in head and neck cancer and glioblastoma cell lines. *Radiat.Oncol.*, **10**, 167.
- Woll, P.J., Reichardt, P., Le Cesne, A., Bonvalot, S., Azzarelli, A., Hoekstra, H.J., Leahy, M., Van Coevorden, F., Verweij, J., Hogendoorn, P.C., Ouali, M., Marreaud, S., Bramwell, V.H. & Hohenberger, P. (2012). Adjuvant chemotherapy with doxorubicin, ifosfamide, and lenograstim for resected soft-tissue sarcoma (EORTC 62931): a multicentre randomised controlled trial. *Lancet Oncol.*, **13**, 1045-1054.
- Wykoff, C.C., Beasley, N.J., Watson, P.H., Turner, K.J., Pastorek, J., Sibtain, A., Wilson, G.D., Turley, H., Talks, K.L., Maxwell, P.H., Pugh, C.W., Ratcliffe, P.J. & Harris, A.L. (2000). Hypoxia-inducible expression of tumor-associated carbonic anhydrases. *Cancer Res.*, **60**, 7075-7083.
- Yan, H., Parsons, D.W., Jin, G., McLendon, R., Rasheed, B.A., Yuan, W., Kos, I., Batinic-Haberle, I., Jones, S., Riggins, G.J., Friedman, H., Friedman, A., Reardon, D., Herndon, J., Kinzler, K.W., Velculescu, V.E., Vogelstein, B. & Bigner, D.D. (2009). IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *N.Engl.J.Med.*, **360**, 765-773.
- Yan, W., Qian, C., Zhao, P., Zhang, J., Shi, L., Qian, J., Liu, N., Fu, Z., Kang, C., Pu, P. & You, Y. (2010). Expression pattern of osteopontin splice variants and its functions on cell apoptosis and invasion in glioma cells. *Neuro.Oncol.*, **12**, 765-775.
- Yang, L., Lin, C., Wang, L., Guo, H. & Wang, X. (2012a). Hypoxia and hypoxia-inducible factors in glioblastoma multiforme progression and therapeutic implications. *Exp.Cell Res.*, **318**, 2417-2426.
- Yang, L., Zhao, W., Zuo, W.S., Wei, L., Song, X.R., Wang, X.W., Zheng, G. & Zheng, M.Z. (2012b). Silencing of osteopontin promotes the radiosensitivity of breast cancer cells by reducing the expression of hypoxia inducible factor 1 and vascular endothelial growth factor. *Chin Med.J.(Engl.)*, **125**, 293-299.

- Ye, Q.H., Qin, L.X., Forgues, M., He, P., Kim, J.W., Peng, A.C., Simon, R., Li, Y., Robles, A.I., Chen, Y., Ma, Z.C., Wu, Z.Q., Ye, S.L., Liu, Y.K., Tang, Z.Y. & Wang, X.W. (2003). Predicting hepatitis B virus-positive metastatic hepatocellular carcinomas using gene expression profiling and supervised machine learning. *Nat.Med.*, **9**, 416-423.
- Yokosaki, Y., Matsuura, N., Sasaki, T., Murakami, I., Schneider, H., Higashiyama, S., Saitoh, Y., Yamakido, M., Taooka, Y. & Sheppard, D. (1999). The integrin alpha(9)beta(1) binds to a novel recognition sequence (SVVYGLR) in the thrombin-cleaved amino-terminal fragment of osteopontin. *J.Biol.Chem.*, **274**, 36328-36334.
- Zhang, H., Guo, M., Chen, J.H., Wang, Z., Du, X.F., Liu, P.X. & Li, W.H. (2014). Osteopontin knockdown inhibits alpha<sub>v</sub>beta<sub>3</sub> integrin-induced cell migration and invasion and promotes apoptosis of breast cancer cells by inducing autophagy and inactivating the PI3K/Akt/mTOR pathway. *Cell Physiol Biochem.*, **33**, 991-1002.
- Zhang, H., Ye, Q.H., Ren, N., Zhao, L., Wang, Y.F., Wu, X., Sun, H.C., Wang, L., Zhang, B.H., Liu, Y.K., Tang, Z.Y. & Qin, L.X. (2006). The prognostic significance of preoperative plasma levels of osteopontin in patients with hepatocellular carcinoma. *J.Cancer Res.Clin.Oncol.*, **132**, 709-717.
- Zhao, B., Sun, T., Meng, F., Qu, A., Li, C., Shen, H., Jin, Y. & Li, W. (2011). Osteopontin as a potential biomarker of proliferation and invasiveness for lung cancer. *J.Cancer Res.Clin.Oncol.*, **137**, 1061-1070.
- Zhu, B., Suzuki, K., Goldberg, H.A., Rittling, S.R., Denhardt, D.T., McCulloch, C.A. & Sodek, J. (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**, 155-167.
- Zhu, Y., Denhardt, D.T., Cao, H., Sutphin, P.D., Koong, A.C., Giaccia, A.J. & Le, Q.T. (2005). Hypoxia upregulates osteopontin expression in NIH-3T3 cells via a Ras-activated enhancer. *Oncogene*, **24**, 6555-6563.
- Zohar, R., Lee, W., Arora, P., Cheifetz, S., McCulloch, C. & Sodek, J. (1997). Single cell analysis of intracellular osteopontin in osteogenic cultures of fetal rat calvarial cells. *J.Cell Physiol*, **170**, 88-100.
- Zohar, R., Suzuki, N., Suzuki, K., Arora, P., Glogauer, M., McCulloch, C.A. & Sodek, J. (2000). Intracellular osteopontin is an integral component of the CD44-ERM complex involved in cell migration. *J.Cell Physiol*, **184**, 118-130.

## 5. Publikationen, die die Grundlage für die Dissertation bilden

**Hahnel, A.,** Wichmann, H., Kappler, M., Kotzsch, M., Vordermark, D., Taubert, H., and Bache, M. (2010). Effects of osteopontin inhibition on radiosensitivity of MDA-MB-231 breast cancer cells. *Radiat.Oncol.* **5**, 82.

<http://www.ro-journal.com/content/5/1/82>

Eigenanteil: Planung, Durchführung und Analyse der Experimente, Verfassen des Manuskripts (90 %)

**Hahnel, A.,** Wichmann, H., Greither, T., Kappler, M., Wurl, P., Kotzsch, M., Taubert, H., Vordermark, D., and Bache, M. (2012). Prognostic impact of mRNA levels of osteopontin splice variants in soft tissue sarcoma patients. *BMC.Cancer* **12**, 131.

<http://www.biomedcentral.com/1471-2407/12/131>

Eigenanteil: Durchführung der qPCR, Datenanalyse und statistische Auswertung, Verfassen des Manuskripts (90 %)

**Güttler, A.,** Giebler, M., Cuno, P., Wichmann, H., Kessler, J., Ostheimer, C., Soling, A., Strauss, C., Illert, J., Kappler, M., Vordermark, D., and Bache, M. (2013). Osteopontin and splice variant expression level in human malignant glioma: Radiobiologic effects and prognosis after radiotherapy. *Radiother.Oncol.* **108**, 535-540.

<http://www.thegreenjournal.com/article/S0167-8140%2813%2900315-0/abstract>

Eigenanteil: Planung, Durchführung und Analyse der *in vitro*-Experimente, Durchführung und Analyse der qPCR der retrospektiven Daten, Verfassen des Manuskripts (90 %)

Bestätigung der Darlegung des Eigenanteils durch einen Koautor:

---

Antje Güttler

---

Prof. Dr. med. Dirk Vordermark

Auf den Seiten 74-97 folgen die Publikationen mit Erstautorenschaft von Antje Güttler (geb. Hahnel), die die Grundlage für die Dissertation bilden.

## 6. Anhang

### 6.1 Publikationen

- Bache, M., Kappler, M., Wichmann, H., Rot, S., **Hahnel, A.**, Greither, T., Said, H.M., Kotzsch, M., Wurl, P., Taubert, H. & Vordermark, D. (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.
- Bache, M., Rot, S., Kessler, J., **Güttler, A.**, Wichmann, H., Greither, T., Wach, S., Taubert, H., Soling, A., Bilkenroth, U., Kappler, M. & Vordermark, D. (2015). mRNA expression levels of hypoxia-induced and stem cell-associated genes in human glioblastoma. *Oncol.Rep.* **33**, 3155-3161.
- Güttler, A.**, Giebler, M., Cuno, P., Wichmann, H., Kessler, J., Ostheimer, C., Soling, A., Strauss, C., Illert, J., Kappler, M., Vordermark, D. & Bache, M. (2013). Osteopontin and splice variant expression level in human malignant glioma: Radiobiologic effects and prognosis after radiotherapy. *Radiother.Oncol.* **108**, 535-540.
- Hahnel, A.**, Wichmann, H., Kappler, M., Kotzsch, M., Vordermark, D., Taubert, H. & Bache, M. (2010). Effects of osteopontin inhibition on radiosensitivity of MDA-MB-231 breast cancer cells. *Radiat.Oncol.* **5**, 82.
- Hahnel, A.**, Wichmann, H., Greither, T., Kappler, M., Wurl, P., Kotzsch, M., Taubert, H., Vordermark, D. & Bache, M. (2012). Prognostic impact of mRNA levels of osteopontin splice variants in soft tissue sarcoma patients. *BMC.Cancer* **12**, 131.
- Kessler, J., **Hahnel, A.**, Wichmann, H., Rot, S., Kappler, M., Bache, M. & Vordermark, D. (2010). HIF-1alpha inhibition by siRNA or chetomin in human malignant glioma cells: effects on hypoxic radioresistance and monitoring via CA9 expression. *BMC.Cancer* **10**, 605.
- Ostheimer, C., Bache, M., **Güttler, A.**, Kotzsch, M. & Vordermark, D. (2014). A pilot study on potential plasma hypoxia markers in the radiotherapy of non-small cell lung cancer. Osteopontin, carbonic anhydrase IX and vascular endothelial growth factor. *Strahlenther.Onkol.* **190**, 276-282.
- Ostheimer, C., Bache, M., **Güttler, A.**, Reese, T. & Vordermark, D. (2014). Prognostic information of serial plasma osteopontin measurement in radiotherapy of non-small-cell lung cancer. *BMC.Cancer* **14**, 858.
- Wichmann, H., **Güttler, A.**, Bache, M., Taubert, H., Vetter, M., Wurl, P., Holzhausen, H.J., Eckert, A.W., Kappler, M. & Vordermark, D. (2014). Inverse prognostic impact of ErbB2 mRNA and protein expression level in tumors of soft tissue sarcoma patients. *Strahlenther.Onkol.* **190**, 912-918.

Wichmann, H., **Güttler, A.**, Bache, M., Taubert, H., Rot, S., Kessler, J., Eckert, A.W., Kappler, M. & Vordermark, D. (2015). Targeting of EGFR and HER2 with therapeutic antibodies and siRNA: a comparative study in glioblastoma cells. *Strahlenther Onkol.* **191**, 180-191.

Wohlleben, G., Scherzad, A., **Güttler, A.**, Vordermark, D., Kuger, S., Flentje, M. & Polat, B. (2015). Influence of hypoxia and irradiation on osteopontin expression in head and neck cancer and glioblastoma cell lines. *Radiat.Oncol.* **10**, 167.

## 6.2 Poster

Juni 2009	15. Jahreskongress der Deutschen Gesellschaft für Radioonkologie, Bremen
März 2010	19. Symposium „Experimentelle Strahlentherapie und Klinische Strahlenbiologie“, Dresden
Februar 2012	21. Symposium „Experimentelle Strahlentherapie und Klinische Strahlenbiologie“, Hamburg
Oktober 2012	2. Forschungstag der Medizinischen Fakultät der MLU Halle-Wittenberg, Halle
Februar 2013	22. Symposium „Experimentelle Strahlentherapie und Klinische Strahlenbiologie“, Dresden
Juni 2013	19. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Radioonkologie, Berlin
Juni 2013	13 <sup>th</sup> International Wolfsberg Meeting 2013, Ermatingen (Schweiz)
Februar 2015	24. Symposium „Experimentelle Strahlentherapie und Klinische Strahlenbiologie“, Hamburg
April 2015	10th International Carbonic Anhydrase Conference, Masstricht (Niederlande)
Februar 2016	25. Symposium „Experimentelle Strahlentherapie und Klinische Strahlenbiologie“, Dresden

### 6.3 Vorträge

- Februar 2009 18. Symposium „Experimentelle Strahlentherapie und Klinische Strahlenbiologie“, Dresden
- November 2012 Vortrag beim Workshop des DEGRO-Netzwerktreffens „Tumormikromilieu“, Frankfurt
- November 2015 Vortrag beim Workshop des DEGRO-Netzwerktreffens „Tumormikromilieu“, Frankfurt

### 6.4 Auszeichnungen

- Februar 2009 Nachwuchsstipendium für den Beitrag „Einfluss des Osteopontin auf die Strahlenresistenz der humanen Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-231“ beim 18. Symposium „Experimentelle Strahlentherapie und Klinische Strahlenbiologie“, Dresden
- März 2010 Posterpreis für den Beitrag „Prognostische Relevanz der Osteopontin-Spleißvarianten bei Weichteilsarkompatienten mit postoperativer Radiochemo- oder Chemotherapie“ beim 19. Symposium „Experimentelle Strahlentherapie und Klinische Strahlenbiologie“, Dresden

## **Danksagung**

Zuerst möchte ich mich herzlich bei Dr. rer. nat. Matthias Bache und Prof. Dr. med. Dirk Vordermark für die Überlassung des spannenden Themas meiner Promotionsarbeit, die wissenschaftliche Unterstützung, die Diskussionsbereitschaft und die Möglichkeit in der Universitätsklinik und Poliklinik für Strahlentherapie zu arbeiten und meine Promotionsarbeit anfertigen zu dürfen bedanken.

PD Dr. rer. nat. Ralph Golbik danke ich für die Begutachtung der Arbeit und die interne Betreuung, die mir die Möglichkeit gab, an der Naturwissenschaftlichen Fakultät zu promovieren.

Für die Bereitstellung der Tumorproben der WTS- und Gliompatienten und der dazugehörigen Datenbanken bedanke ich mich bei Prof. Dr. med. Peter Würfl, Prof. Dr. rer. nat. Helge Taubert sowie PD Dr. med. Ariane Söling.

Prof. Dr. Wolfgang Ch. Marsch und seinen Mitarbeiterinnen in der Universitätsklinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie danke ich für die Möglichkeit das Durchflusszytometer zur Messung der Zellzyklusanalysen nutzen zu können.

Für die Möglichkeit zur Nutzung des CASY®-Zellzählmessgerätes zur Quantifizierung meiner Migrationsmessungen danke ich den Mitarbeitern des Forschungslabors der Universitätsklinik und Poliklinik für Herz- und Thoraxchirurgie.

Ich bedanke mich bei Dr. rer. nat. Grit Rehbein für die Einweisung am Fluoreszenzmikroskop und der Universitätsklinik und Poliklinik für Innere Medizin I für die Möglichkeit das Fluoreszenzmikroskop für meine Untersuchungen nutzen zu dürfen.

Für die Durchführung der ELISA-Messungen (uPA, uPAR und PAI) bedanke ich mich bei Dr. rer. nat. Matthias Kotzsch und seiner Arbeitsgruppe in Dresden.

Ganz herzlich möchte ich mich auch bei Gabriele Thomas und Kathrin Spröte bedanken, die durch ihre vielen kleinen Arbeiten einen normalen Laboralltag überhaupt erst ermöglicht haben. Außerdem standen sie mir immer mit ihrer Hilfe und Unterstützung zur Seite, wenn mal wieder Not am Mann war, weil eines der Kinder krank wurde/war oder ich selbst aufgrund meiner Schwangerschaften nicht alle Arbeiten erledigen durfte. Vielen Dank, ohne euch wäre das alles nicht möglich gewesen.

Ich danke den Mitarbeitern des Forschungslabors der Universitätsklinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und plastische Gesichtschirurgie Dr. rer. nat. Matthias Kappler und Swetlana Rot für die angenehme Arbeitsatmosphäre, die vielen inspirierenden wissenschaftlichen und auch privaten Gespräche und Diskussionen.

Bei Henri und Katharina bedanke ich mich ganz herzlich für die tolle gemeinsame Zeit im Labor. Mit euch als Schreibtischnachbarn war es um vieles leichter auch die schweren Zeiten der Promotion zu überstehen. Vielen Dank für die vielen Gespräche und Diskussionen und vor allem die praktische Hilfe, wenn es spontan mal wieder nötig war.

Aber auch allen anderen aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern der AG Molekulare Strahlentherapie und des „MKG-Labors“ danke ich recht herzlich für die schöne Zeit und die vielen gemeinsamen Stunden. Ein besonderer Dank geht an Jacqueline, ohne dich wäre es nur halb so lustig gewesen, und Maria, die mit ihrer Arbeit wichtige Daten für das gesamte Projekt erhoben hat.

Meinen Freunden und meiner Familie, besonders meinen Eltern und meiner Schwester Theresa, danke ich von Herzen für die jahrelange Unterstützung und Ermunterung während meiner gesamten Promotionszeit. Ihr habt immer an mich geglaubt.

Der größte Dank geht an meinen Mann Bert und meine beiden Söhne Oskar und Michel. Ihr habt mich immer ertragen (müssen), egal wie es gerade bei der Arbeit lief. Danke, Bert, dass du mich immer unterstützt und ermuntert hast weiter zu machen. Oskar und Michel, euch danke ich, dass ich selbst den deprimierendsten Tag im Labor immer sofort vergessen habe, wenn ich den Kindergarten betreten habe, um euch freudestrahlend abzuholen. Ich liebe euch drei.

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende wissenschaftliche Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe angefertigt habe. Ich erkläre weiterhin, dass ich keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe und die den Werken wörtlich und inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Mit dieser Arbeit bewerbe ich mich erstmals um die Erlangung des Doktorgrades. Diese Arbeit wurde an keiner anderen Fakultät oder Universität zur Begutachtung eingereicht.

Halle (Saale), den

Antje Güttler

## *Curriculum Vitae*

### **Persönliche Daten**

Familienname                      Güttler, geb. Hahnel  
Akademischer Grad                Diplom Biochemie  
Vorname                              Antje  
Geburtsdatum                        28.November 1983  
Geburtsort                          Halle/Saale, Sachsen-Anhalt, Deutschland  
Geschlecht                           weiblich  
Familienstand                        verheiratet, 2 Söhne (6 Jahre, 2 Jahre)  
Anschrift                             Goethestr. 23, 06114 Halle (Saale)  
Staatsangehörigkeit                deutsch

Fachgebiet der Promotion:      Biochemie

### **Ausbildung**

seit 10/2008                        Wissenschaftliche Mitarbeiterin der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Universitätsklinik und Poliklinik für Strahlentherapie, AG Molekulare Strahlentherapie  
11/2013 – 10/2014                Elternzeit  
04/2010 – 01/2011                Elternzeit  
seit 10/2008                        Promotionsarbeit in der Universitätsklinik und Poliklinik für Strahlentherapie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg in der AG Molekulare Strahlenbiologie unter der Leitung von Prof. Dr. Dirk Vordermark  
Thema: „Osteopontin als endogener Marker der Tumorphoxie und therapeutisches Target in der Strahlentherapie“  
10/2007 – 09/2008                Diplomarbeit in der Universitätsklinik und Poliklinik für Strahlentherapie bei Prof. Dr. Helge Taubert  
Thema: „Bedeutung von Osteopontin für die Strahlenresistenz in humanen Tumorzelllinien“  
10/2003 – 09/2008                Studium der Biochemie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
09/1994 – 07/2003                Landesgymnasium Latina August Hermann Francke in Halle, Abschluss: Abitur

Halle (Saale), den

Antje Güttler