

Aus der Klinik für pädiatrische Hämatologie und Onkologie
Universitätskliniken des Saarlandes, Homburg/Saar
Direktor: Prof. Dr. med. Norbert Graf

**Osteopontin im Kindesalter bei Kindern
mit und ohne Tumorerkrankung:
Erstellung altersspezifischer Referenzwerte für
Osteopontin in Liquor und Blutplasma**

**Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES**

2014

vorgelegt von Nasenien Nourkami-Tutdibi
geboren am: 10.01.1981 in Speyer

Für meine Eltern
Zahra und Parvız Nourkamí

"Ich möchte lieber eine einzige Ursache begreifen, als König
von Persien sein." – Demokrit von Abdera

Inhaltsverzeichnis

I. Inhaltsverzeichnis	3-5
II. Abbildungsverzeichnis	6-7
III. Tabellenverzeichnis	8
IV. Abkürzungsverzeichnis	9-10

I. Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	11-14
2. Einleitung	15-30
2.1 Allgemeines	15-17
2.2 Zielsetzung und Fragestellung	18
2.3 Osteopontin	19-25
2.3.1 Molekularstruktur und Funktion	19-20
2.3.2 Bindungsstellen des Osteopontin	20-21
2.3.3 Mediatoren des Osteopontin Signalweges $\alpha_v\beta$ Integrine und CD44	22-25
2.4 Biomarker	25-30
2.4.1 Allgemeines	25-26
2.4.2 Tumormarker	26
2.4.3 Osteopontin als Tumormarker	26-30
3. Material und Methodik	31-40
3.1 Patientenkollektiv	31
3.2 Kontrollkollektiv	31-32
3.2.1 Einschlusskriterien	32
3.2.2 Ausschlusskriterien	32
3.3 Studienkollektiv	32-34
3.3.1 Einschlusskriterien	33
3.3.2 Ausschlusskriterien	33
3.3.3 Patientencharakteristika Studienkollektiv	33-34
3.4 Studienablauf	34-35
3.4.1 Probengewinnung	34
3.4.2 Messung Blut- und Liquorproben	35

3.5	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	35-37
3.5.1	Sandwich ELISA	36-37
3.6	Inter- und Intra-Assay-Variabilität	37
3.7	Stabilität und Lagerung der Blutproben für die Osteopontin-Bestimmung	38-39
3.8	Statistik	40
4.	Ergebnisse	41-72
4.1	Kontrollkollektiv	41-62
4.1.1	Neugeborene	45-50
4.1.1 I	Einfluss Geschlecht auf Osteopontin-Spiegel im Nabelschnurblut	45
4.1.1 II	Einfluss Gestationsalter auf Osteopontin-Spiegel im Nabelschnurblut	45-46
4.1.1 III	Einfluss Geburtsgewicht auf Osteopontin -Spiegel im Nabelschnurblut	47-48
4.1.1 IV	Einfluss Wehentätigkeit auf Osteopontin -Spiegel im Nabelschnurblut	48-49
4.1.1 V	Einfluss des Nabelschnur-pH und APGAR auf den Osteopontin-Spiegel	50
4.1.2	Säuglinge, Kinder und Jugendliche	50-59
4.1.2 I	Einfluss des Alters auf Osteopontin-Spiegel in Blut und Liquor	50-55
4.1.2 II	Einfluss Geschlecht auf Osteopontin-Spiegel in Blut und Liquor	55-57
4.1.2 III	Einfluss der Infektion auf den Osteopontin-Spiegel in Blut und Liquor	57-59
4.1.3	Erwachsene	60
4.1.4	Zusammenfassung Kontrollkollektiv.....	61-62
4.2	Studienkollektiv	62-70
4.2.1	Einfluss des Alters auf den Osteopontin-Spiegel in Blut und Liquor	64-65
4.2.2	Einfluss der Tumorentität auf den Osteopontin-Spiegel	66
4.2.3	Einfluss des Abnahmezeitpunktes auf den Osteopontin-Spiegel in Blut und Liquor	67-70

4.2.4	Einfluss der ZNS-Beteiligung auf Osteopontin-Spiegel im Liquor bei Kindern mit akuten Leukämien	70
4.3	Vergleich Studien- und Kontrollkollektiv	71-72
5.	Diskussion	73-87
5.1	Erstellung von Referenzwerten	73-75
5.1.1	Referenzwerteproblematik im Kindesalter	73-74
5.1.2	Problematik bei der Auswahl einer Referenzpopulation	74-75
5.2	Osteopontin als potentieller Tumormarker-Allgemeines	75-77
5.3	Vergleich der Ergebnisse mit der aktuellen Literatur	77-86
5.3.1	Referenzwerte im Kindesalter	77
5.3.2	Referenzwerte für Osteopontin bei Kindern und Jugendlichen	77-79
5.3.3	Osteopontin Werte im Kontrollkollektiv – Erstellung der Referenzwerte	79-82
5.3.4	Osteopontin Werte im Studienkollektiv	82-84
5.3.5	Osteopontin Werte bei gesunden Erwachsenen	84-86
5.4	Schlussfolgerung und Ausblick	87
6.	Literaturverzeichnis	88-95
7.	Anhang	96-106
7.1	Patientencharakteristika des Kontrollkollektivs	96-97
7.2	Ethikvotum	98
7.3	Statistisches Datenblatt	99-100
7.4	Publikationen	101
7.5	Erklärung an Eides Statt.....	101

II. Abbildungsverzeichnis

2.3.1a	Molekulare Struktur von Osteopontin	20
2.3.2a	Struktur von Osteopontin	21
2.3.2b	Osteopontin und seine Bindungsstellen	21
2.3.3a	Interaktion und Einfluss von Osteopontin auf verschiedene Signaltransduktionswege	24
2.4.3a	Einfluss von Osteopontin auf die Tumorprogression und Metastasierung	29
3.7a	Osteopontin Messwerte im Blut nach Lagerungstemperatur und -dauer	38
3.7b	Verlauf der Osteopontin Werte in Blutproben von 10 Probanden in In Abhängigkeit von der Lagerungsdauer bei -80°C	39
4.1a	Probenverteilung im Kontrollkollektiv	41
4.1b	Verteilung der Blut- und Liquorproben des Kontrollkollektives nach Altersklassen	42
4.1c	Verteilung der Blutproben nach Altersklassen	43
4.1.1a	Osteopontin-Spiegel im Blut von Neugeborenen	45
4.1.1b	Neugeborene nach Gestationsalter	46
4.1.1c	Einfluss des Gestationsalters auf den Osteopontin-Wert im Blutplasma	46
4.1.1d	Verteilung der Neugeborenen entsprechend ihrer Gewichtsklassen..	47
4.1.1e	Osteopontin-Spiegel nach Gewichtsklassen	47
4.1.1f	Einfluss des Geburtsgewichtes auf den OPN-Spiegel im Blut	48
4.1.1g	Vergleich der Osteopontin-Spiegel im Nabelschnurblut nach Wehentätigkeit (primäre Sectio vs. sekundäre Sectio und Spontangeburt)	49
4.1.2a	Verteilung der Blut- und Liquorproben nach Altersklassen	51
4.1.2b	Zusammenhang zwischen OPN-Spiegel im Blut nach Alter	52
4.1.2c	Zusammenhang zwischen OPN-Spiegel im Liquor nach Alter	52
4.1.2d	Osteopontin-Spiegel im Blut entsprechend der Altersklassen	54
4.1.2e	Osteopontin-Spiegel im Liquor entsprechend der Altersklassen	55
4.1.2f	Zusammenhang zwischen Osteopontin-Spiegel im Blut und Alter für Mädchen und Jungen	56

4.1.2g	Zusammenhang zwischen Osteopontin-Spiegel im Blut und Alter für Mädchen und Jungen	57
4.1.2h	Verteilung der Blutproben nach Altersklasse in Abhängigkeit einer Infektion	58
4.1.2i	Verteilung der Liquorproben nach Altersklasse in Abhängigkeit einer Infektion	58
4.1.2j	Osteopontin-Spiegel im Blut bei Kindern mit und ohne Infektion entsprechend der Altersklassen	59
4.1.2k	Osteopontin-Spiegel im Liquor bei Kindern mit und ohne Infektion entsprechend der Altersklassen	59
4.1.3a	Mittlerer Osteopontin-Wert im Blut bei gesunden Erwachsenen	60
4.1.4a	Osteopontin-Spiegel im Blut bei Erwachsenen im Vergleich zur Kontrollgruppe des pädiatrischen Kollektives	61
4.2a	Probenverteilung im Studienkollektiv	62
4.2b	Verteilung der Blutproben nach Alter	63
4.2c	Verteilung der Liquorproben nach Alter	63
4.2.1a	Verteilung der Blut- und Liquorproben nach Altersklassen	64
4.2.1b	Zusammenhang zwischen OPN-Spiegel im Blut und Alter	65
4.2.1c	Zusammenhang zwischen OPN-Spiegel in Liquor und Alter	65
4.2.2a	Verteilung der Tumorentitäten im Studienkollektiv	66
4.2.2b	Verteilung der Proben nach Tumorgruppen	66
4.2.3a	OPN-Spiegel in Blut entsprechend dem Remissionsstatus ohne Remission vs. Remission	68
4.2.3b	OPN-Spiegel im Blut entsprechend dem Remissionsstatus ohne Remission vs. Remission und nach Tumorentität	68
4.2.3c	OPN-Spiegel in Liquor entsprechend dem Remissionsstatus ohne Remission vs. Remission.....	69
4.2.4a	Korrelation zwischen Osteopontin-Spiegel im Blut und Liquor bei Kindern mit akuten Leukämien	70
4.3a	OPN-Spiegel im Blut nach Altersklassen	71
4.3b	OPN-Spiegel im Liquor nach Altersklassen	72

III. Tabellenverzeichnis

3.3.3a	Patienten mit akuten Leukämien	33
3.3.3b	Patienten mit Hirntumoren	34
3.3.3c	Patienten mit Lymphom	34
3.3.3d	Patienten mit sonstigen soliden Tumoren	34
3.4.2a	Geräteverzeichnis	35
3.4.2b	Chemikalienverzeichnis	35
4.1a	Hauptdiagnosen des Kontrollkollektives	44
4.1.1a	Osteopontin-Spiegel im Nabelschnurblut von Neugeborenen	45
4.1.1b	Geburtsmodus und Indikationen für die Sectio-Entbindungen	49
4.1.1c	Nabelschnur-pH und APGAR Werte	50
4.1.2a	Mittelwerte, Standardabweichung, Median, Minimum und Maximum der OPN-Spiegel in Blutplasma und Liquor entsprechend der Altersklassen im Studienkollektiv	53-54
4.1.4a	Referenzwerte für Osteopontin in Blut [ng/ml]	62
4.1.4b	Referenzwerte für Osteopontin in Liquor [ng/ml]	62
4.2.3a	Verteilung der Abnahmezeitpunkte der Blutproben im Studienkollektiv entsprechend der Gruppen Remission vs. ohne Remission	67
4.2.3b	Verteilung der Abnahmezeitpunkte der Blutproben im Studienkollektiv entsprechend der Gruppen Remission vs. ohne Remission	69
5.3a	Publikationen zu OPN-Werten bei Kindern und Jugendlichen	79
5.3b	Publikationen der letzten 15 Jahre zu OPN-Blutplasma Spiegel bei Erwachsenen mit Krebserkrankung und einem gesunden Kontrollkollektiv	85-86
7.1a	Patientencharakteristika des Kontrollkollektives	96-97

IV. Abkürzungsverzeichnis

Akt	Serin/Threonin-Kinase
ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
ANOVA	Varianzanalyse (Englisch: „analysis of variance“)
APGAR	Der Apgar-Score ist ein Punkteschema, mit dem sich der klinische Zustand von Neugeborenen standardisiert beurteilen lässt.
AT/RT	Atypische Teratoider Rhabdoid Tumor
BALP	Bone alkaline Phosphatase
CRP	C-Reaktives Protein
ECM	Extrazellulären Matrix
EDTA	Ethylene diamine tetraacetic acid
EGFR	Epidermal growth factor receptor
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ERK	Extracellular Signal-Regulated Protein Kinase
ERM	Ezrin-Radixin-Moesin
ETA-1	Early T lymphocyte activation
° C	Grad Celsius
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony-stimulating factor
GOX	Glucoseoxidase
GPOH	Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie
HRS	Horseradish
IFN-γ	Interferon Gamma
IKK	Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase
JNK1	Mitogen-activated protein kinase 8

MEKK1	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1
ml	Milliliter
MMP-9	Matrixmetallopeptidase 9
mRNA	messenger Ribonucleic acid
NF- κ B	Nuclear factor kappa-B kinase
ng	Nanogramm
NIK	NF- κ B-inducing kinase
NSB	Nabelschnurblut
OC	Osteocalcin
OPN	Osteopontin
pH	Maß für den sauren oder basischen Charakter einer wässrigen Lösung
PI3	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PI3K/Akt	Phosphatidyl-Inositol Triphosphat-Kinase
PINP	Prokollagen Typ I
PKC	Proteinkinase C
PLC- γ	Phospholipase C- γ
pNPP	p-Nitrophenylphosphat
PTEN	Phosphatase und Tensin homologe Protein
RGD	Arginin-Glycin-Asparaginase
SD	Standardabweichung
SSP1	Secreted phosphoprotein 1
uPA	Urokinase-Plasminogen-Aktivatoren
VEGF	Vascular endothelial growth factor
ZNS	Zentrales Nervensystem

Osteopontin im Kindesalter bei Kindern mit und ohne Tumorerkrankung: Erstellung altersspezifischer Referenzwerte für Osteopontin in Liquor und Blutplasma

1. Zusammenfassung

Osteopontin als potentieller Tumormarker bei Krebserkrankungen im Kindesalter

Tumormarker erfüllen in der klinisch angewandten Onkologie den Zweck eine Diagnose zu sichern sowie die Prognose und das Ansprechen einer Therapie besser einschätzen zu können. Die Suche nach neuen Tumormarker ist nach wie vor ungebrochen groß und hat sich in der Krebsforschung über die letzten Jahrzehnte hinweg zu einem stetig wachsenden Forschungszweig entwickelt. Viele, zuvor unbekannte Marker, konnten dadurch Anwendung im klinischen Alltag finden.

Das Protein Osteopontin (OPN) wurde in sehr vielen Arbeiten auf seinen Nutzen als potentieller Tumormarker untersucht. In den letzten 35 Jahren haben zahlreiche Studien den Einfluss unterschiedlicher Tumorerkrankungen auf den OPN Spiegel in Blutplasma, Serum und/oder Liquor analysiert. Viele Arbeiten untersuchten ebenfalls die Expression von OPN in gesundem Gewebe wie auch in Tumorgewebe selbst. Dadurch konnte für OPN bereits eine Assoziation mit mehr als 30 Krebserkrankungen bei adulten Patienten nachgewiesen werden. In meiner Arbeit analysierte ich anhand eines Kontrollkollektives (n=188) OPN Blut- und Liquorwerte von Kindern und Jugendlichen und ermittelte daraus altersspezifische Referenzwerte für OPN entsprechend zuvor festgelegter Altersklassen. Im weiteren Verlauf wurden die erhobenen Werte mit einem Studienkollektiv (n=46) gleichaltriger Kinder und Jugendlicher, welche an unterschiedlichen Krebserkrankungen leiden, verglichen. Ziel meiner Arbeit war es prospektiv und systematisch Referenzwerte für OPN in Blut und Liquor in einem pädiatrischen Patientenkollektiv zu erheben. Ich analysierte unterschiedliche Einflussfaktoren für den OPN Spiegel in Blut und Liquor und

untersuchte anschließend, inwieweit sich die von mir erhobenen Referenzwerte, von Werten bei Kindern mit maligner Krebserkrankung unterscheiden.

Blutplasma- und Liquorproben wurden von mir in der Klinik für Kinder und Jugendmedizin der Universität des Saarlandes in Homburg/Saar abgenommen und gesammelt. Für das Kontrollkollektiv wurden 148 Blut- und 42 Liquorproben und für das Studienkollektiv 33 Blut- und 23 Liquorproben gesammelt. Die Kinder sind in 5 verschiedene Altersklassen eingeteilt worden (0-1J, 1-5J, 6-10J, 11-14J, >14J). Innerhalb der Gruppe der Kinder mit Krebserkrankungen, dem Studienkollektiv, verteilten sich die Blut- und Liquorproben wie folgt: Akute Leukämien 15/14, Hirntumore 5/7, Lymphome 6/2 und andere solide Tumoren 7/0. In der Gruppe der Kinder mit Krebserkrankungen betrug das mittlere Alter 8 Jahre mit einer Spannweite von 0-21 Jahren. Männliches und weibliches Geschlecht waren sowohl in der Studiengruppe als auch im Kontrollkollektiv gleichmäßig verteilt. Innerhalb der Gruppe der Kinder mit Krebserkrankungen fanden sich im Vergleich zum Kontrollkollektiv gleicher Alterklasse signifikant höhere OPN-Blutplasma-Werte ($p < 0.001$). Die Liquor-Werte waren im Vergleich zum Kontrollkollektiv in der Studiengruppe ebenso erhöht, wenngleich ohne Signifikanz. Insgesamt nahm der OPN-Blutplasma-Wert innerhalb der Kontrollgruppe mit steigendem Alter ab (Spearman $r = -0.754$; $p < 0.001$). Die Analyse der OPN Werte in Blut und Liquor erfolgte mittels ELISA-Messungen im Labor der Klinik für pädiatrische Hämatologie und Onkologie. Die statistische Auswertung führte ich mit Hilfe der Statistiksoftware IBM SPSS Statistics Version 20 für Windows [IBM Corporation, Armonk, NY] durch.

Vorliegende Arbeit ist die erste, welche OPN-Blutplasma und Liquorwerte in einem großen Kollektiv von Kindern und Jugendlichen systematisch und prospektiv analysiert. Die Daten zeigen, dass der OPN Blutplasma Spiegel bei Kindern und Jugendlichen ohne maligne Erkrankung physiologisch im ersten Lebensjahr ansteigt und anschließend mit zunehmendem Alter signifikant fällt. Weiterhin lassen die Ergebnisse darauf schließen, dass OPN einen möglichen Nutzen als Tumormarker bei Krebserkrankungen im Kindes- und Jugendalter haben könnte. Weiterführende Studien sind notwendig, um die Ergebnisse aus dieser Arbeit zu validieren und um zu untersuchen für welche Krebserkrankungen OPN im speziellen als Tumormarker in Frage kommen könnte.

Osteopontin as a potential clinical tumour marker for childhood cancer

In clinical oncology tumour markers are useful to ensure a certain diagnosis. They can help us to evaluate the prognosis and sometimes also help us to predict a response to therapy. The search for new biomarkers is still undauntedly high and has grown to an expansive study field within cancer research over the last decades. In this way many biomarkers could be established into daily clinical practice.

The protein Osteopontin (OPN) has been investigated intensively to its potential use as a tumour marker. Within the last 35 years OPN blood plasma, serum and/or cerebrospinal fluid levels (CSF) have been analyzed in many different cancer types. Many studies analyzed OPN in healthy as well as in tumour tissue itself. As a result OPN was found to be associated with more than 30 different cancer types in adults. In this study we analyzed within a control group (n=188) OPN levels in blood plasma and CSF and measured reference values for OPN according to previously determined age groups. Later on we compared our reference values with a study group (n=46) of children and young adolescents suffering from different cancer diseases. Aim of this study was a systematic and prospective investigation to establish reference values for OPN in a pediatric setting. In a next step we wanted to know, how much these reference values for OPN in blood plasma and CSF are affected in children and young adolescents suffering from cancer disease.

Plasma and CSF samples of all children have been collected in the Children's Hospital of Saarland University in Homburg/Saar. In controls we obtained 148 blood- and 42 CSF- samples, in cancer group 33 blood- and 23 CSF samples. Children were divided into 5 different age groups (0-1y, 1-5y, 6-10y, 11-14y and >14y). ELISA was used for the measurement of OPN blood and CSF levels. Statistical analysis was performed using IBM SPSS Statistics Version 20 for Windows [IBM Corporation, Armonk, NY].

Within the cancer group blood and CSF samples were distributed as follows: Acute leukaemia 15/14, brain tumours 5/7, lymphomas 6/2 and other solid tumours 7/0. In the cancer group median age was 8 years with a range of 0-21 years. Gender was equally distributed in cancer and control group. Significant higher blood OPN-level was found in children with cancer-disease in comparison to controls of the same age

group (all $p < 0.001$). CSF levels in children within the cancer group were higher compared to controls, without reaching significance. OPN blood levels were significantly decreasing with age compared to controls (Spearman $r = -0.754$; $p < 0.001$).

This study is the first one analyzing blood and CSF levels in children prospectively and systematically. Our data shows that OPN blood plasma level in children without malignant disease is physiologically increasing during the first year of life and afterwards decreasing significantly with age. Our results do also indicate that OPN has a potential use as a tumour marker in childhood malignancies. Further research is needed to define for which type of childhood cancer disease OPN may serve as a specific biomarker.

2. Einleitung

2.1 Allgemeines

Tumorerkrankungen im Kindesalter haben heutzutage eine Heilungschance von mehr als 80%, bei einigen Erkrankungen, wie z. B dem Nephroblastom bisweilen von mehr als 90%. Dieser Erfolg beruht auf den seit mehr als 30 Jahren durchgeführten Therapieoptimierungsstudien der Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie (GPOH) (Kaatsch 2010;Kaatsch & Grabow 2012;Rossig *et al.* 2013). Ebenso tragen verbesserte bildgebende Verfahren und die Durchführung molekulargenetischer Untersuchungen zur besseren Prognose und Therapie vieler Erkrankungen bei. Mit Hilfe von so genannten Biomarkern versucht die Medizin die Prognose vieler Erkrankungen zu verbessern. Einige dieser Biomarker haben sich bereits seit Jahrzehnten in der klinischen Anwendung etabliert. In der Onkologie bezeichnet man diese Biomarker als Tumormarker, da sie im konkreten Fall Aufschluss über eine bestimmte Tumorerkrankungen geben. Manche Biomarker dienen der Sicherung einer Diagnose, andere wiederum geben Aufschluss über den Erkrankungsstatus eines Patienten oder den möglichen Verlauf seiner Erkrankung, wieder andere ermöglichen eine Prognose über das Ansprechen auf bestimmte Therapien.

Das Auftreten von Tumorerkrankungen im Kindesalter ist im Vergleich zu Krebserkrankungen im Erwachsenenalter deutlich niedriger. In Deutschland erkranken jährlich zwischen 450.000 – 480.000 erwachsene Menschen an Krebs (www.rki.de). Für Kinder und Jugendliche unter 15 Jahren sind es ca. 1.800 Neuerkrankungen pro Jahr (www.kinderkrebsregister.de). Die Bevölkerungsanzahl der unter 15 Jährigen beträgt in Deutschland ca. 12,5 Millionen, dies ergibt demnach für Kinder und Jugendliche dieser Altersklassen eine jährliche Inzidenz von 159/1.000.000 Einwohner. Die Wahrscheinlichkeit für ein neugeborenes Kind, innerhalb seiner ersten 15 Lebensjahre eine bösartige Erkrankung zu erleiden, beträgt 0,2% (*Krebs bei Kindern*, www.rki.de). Seit der Gründung des Deutschen Kinderkrebsregisters in Mainz 1980 werden alle malignen Krebserkrankungen von Kindern und Jugendlichen unter 15 Jahren erfasst und gemeldet. Seit dem 1.1.2009 wurde die Erfassung auf Jugendliche und junge Erwachsene bis 18 Jahren

ausgedehnt. Betrachtet man einen Zeitraum von 10 Jahren (2001–2010) so erkrankten in Deutschland 7.985 Mädchen und 9891 Jungen an Krebs. Dies führt zu einer kumulativen Inzidenz von 2.130 Mädchen/ 1.000.000 Einwohner und 2.504 Jungen/ 1.000.000 Einwohner bei Kindern und Jugendlichen unter 15 Jahren. Einen großen Teil von Krebserkrankungen bei Kindern und Jugendlichen bildet die Gruppe der Leukämien. Sie bilden mit ca. 34,1% den größten Anteil an allen gemeldeten Krebserkrankungen von Kindern und Jugendlichen unter 15 Jahren. Darauf folgen ZNS Tumoren mit einem Anteil von 23,3% und den Lymphomen mit einem Anteil von 11%. Andere solide Tumorerkrankungen sind seltener und bilden jeweils einen Anteil von 3-7%. (*Jahresbericht 2011, Deutsches Kinderkrebsregister Mainz*)

Bei Erwachsenen, wie auch bei Kindern und Jugendlichen, existieren trotz der durch Therapieoptimierungsstudien verbesserten Überlebenschancen, nach wie vor maligne Tumorerkrankungen, deren Prognose in den letzten Jahrzehnten nur geringfügig verbessert werden konnte. Ein Grund hierfür ist das seltene Auftreten dieser Tumorerkrankungen, welches die Erfassung und Auswertung von Daten erschwert. Durch die Seltenheit dieser Tumorerkrankungen sind auch das Asservieren von Tumormaterial und die daraus resultierende Bereitstellung an Material für biologische Studien entsprechend eingeschränkt, die Grundlagenforschung für diese Krebserkrankungen somit erschwert. Verlässliche Biomarker fehlen und sind dringend notwendig. Aus diesen und vielen weiteren Gründen sind die Bemühungen in der Krebsforschung weiterhin ungebrochen groß, immer wieder weitere, neue potentielle Biomarker zu finden und auf ihren klinischen Einsatz hin zu untersuchen. Ein Protein, das bereits vor mehr als 30 Jahren erstmals beschrieben wurde und seitdem immer wieder als möglicher Biomarker bei verschiedensten Erkrankungen untersucht wird, ist Osteopontin (OPN). Ein erhöhter Blutplasma-OPN-Spiegel konnte in vielen Studien und unter Anwendung unterschiedlicher Methoden und Studiendesigns bereits bei vielen malignen und nicht-malignen Erkrankungen nachgewiesen werden. So konnten erhöhte OPN-Spiegel in Blut und/oder Liquor oder eine erhöhte Expression von OPN im Tumorgewebe bereits mit mehr als 30 verschiedenen Krebserkrankungen bei erwachsenen Patienten in Verbindung gebracht werden. Zahlreiche Studien wiesen nach, dass eine Tumorregression oder ein Tumorprogress positiv mit einem Abfall bzw. Anstieg des OPN-Spiegels im Blut und/oder Liquor korrelieren. Die meisten

dieser Studien untersuchten maligne und nicht-maligne Erkrankungen im Erwachsenenalter (Weber *et al.* 2011a).(Weber *et al.* 2010a) Studien an pädiatrischen Patientenkollektiven sind sehr selten und wenig publiziert. Eine Studie von Kao *et al.* zeigte 2005 einen erhöhten OPN-Spiegel bei Patienten mit atypischen teratoiden Rhabdoidtumoren (AT/RT) (Kao *et al.* 2005b). Diese Tumore sind sehr seltene Tumore des zentralen Nervensystems (ZNS), die hauptsächlich innerhalb des ersten Lebensjahres auftreten. Es handelt sich um hochmaligne ZNS Tumore und die Überlebensrate ist sehr schlecht. Der Tumor gehört zu der Gruppe der intrakraniellen und intraspinalen embryonalen ZNS Tumore und macht dort einen Anteil von ca. 14,7% aus. Auf alle Krebserkrankungen im Kindes- und Jugendalter unter 15 Jahren betrachtet bildet der AT/RT einen sehr kleinen Anteil von 0,7%. In einem Zeitraum von ca. 10 Jahren (2001-2010) wurden dem Deutschen Kinderkrebsregister 122 Fälle gemeldet (*Jahresbericht 2011, Deutsches Kinderkrebsregister Mainz*). Kao *et al.* verglichen Plasma und Liquor OPN-Spiegel zwischen Kindern mit AT/RT und Medulloblastomen, mit Kindern ohne eine maligne Erkrankung des ZNS, die jedoch an einer Epilepsie litten oder einem Hydrocephalus aufwiesen (Kao *et al.* 2005b). Die OPN-Spiegel in Blut und Liquor lagen bei den Kindern mit AT/RT signifikant höher als bei Kindern mit Medulloblastomen oder den Kindern ohne maligne Erkrankung. Ferner beobachteten sie nach OP wie auch unter Therapie einen Abfall des OPN Spiegels in Liquor und entsprechend eine Erhöhung des OPN-Spiegels beim Auftreten von Rezidiven. In einer weiteren Studie konnten Kao *et al.* zeigen, dass OPN auch stärker in atypischen teratoiden Rhabdoidtumoren exprimiert wird (Kao *et al.* 2005a). Zusammengefasst lassen die Ergebnisse der Studien von Kao *et al.* darauf schließen, dass OPN auch für bestimmte maligne Erkrankungen des Kindes- und Jugendalters ein gewisses Potential als prognostischer Biomarker hat. Da hier jedoch eine kleine Gruppe von Kindern mit malignen und nicht malignen Erkrankungen untersucht wurde, bleibt unklar, wie sich die OPN-Spiegel unter physiologischen Bedingungen in Blut und Liquor von gesunden Kindern und Jugendlichen entsprechend ihrem Alter verhalten.

2.2 Zielsetzung und Fragestellung

Diese Arbeit ist nach bestem Wissen die erste Studie, welche prospektiv und systematisch OPN-Spiegel in Blut und Liquor bei Kindern und Jugendlichen aller Altersklassen inklusive Neugeborener untersucht. Es ist ebenfalls die erste Arbeit, die in diesem Zusammenhang OPN-Spiegel in Blut und Liquor bei Kindern mit unterschiedlichen malignen Krebserkrankungen analysiert und diese mit einer größeren Gruppe von Kindern ohne maligne Erkrankungen aller Altersklassen vergleicht.

Unsere Zielsetzung und Fragestellung für die aktuelle Studie waren:

- 1) Wie ist die Verteilung der OPN-Werte in Blut und Liquor von Säuglingen, Kindern, Jugendlichen und jungen Erwachsenen zwischen 0-21 Jahren ohne maligne Krebserkrankung? Erstellen von Referenzwerten für OPN in Blut und Liquor entsprechend vorher festgelegter Altersklassen bei Kindern, Jugendlichen und jungen Erwachsenen ohne Krebserkrankung.
- 2) Existiert eine Altersabhängigkeit für OPN in Blut und/oder Liquor?
- 3) Existiert eine Abhängigkeit zum Geschlecht für OPN in Blut und/oder Liquor?
- 4) Wird der OPN-Spiegel in Blut und/oder Liquor durch eine Infektion beeinflusst?
- 5) Beeinflusst eine maligne Krebserkrankung bei Kindern und Jugendlichen den OPN-Spiegel in Blut und/oder Liquor?

2.3 Osteopontin

2.3.1 Molekularstruktur und Funktion

Humanes Osteopontin (OPN) ist ein negativ geladenes saures Glykoprotein. Es kommt sowohl als unbewegliches Molekül der extrazellulären Matrix im Gewebe als auch als Zytokin in Körperflüssigkeiten wie Blut, Muttermilch und Urin vor. Es existiert gleichermaßen in phosphorylierter wie auch in nicht-phosphorylierter Form. Das Protein besteht aus 300 Basenpaaren und erreicht durch post-translationale Modifikationen ein molekulares Gewicht von 44 kDa bis 75 kDa. Es wird unter anderem von Osteoklasten, Osteoblasten, Nervenzellen, Zellen der Niere, des Gehirns, von Makrophagen, von Zellen der weichen Gefäßmuskulatur, von Epithelzellen der Haut sowie von Endothelzellen exprimiert. OPN wird durch sein gleichnamiges Gen kodiert, das sich auf dem langen Arm des Chromosoms 4 (4q22.1) befindet (Bianco *et al.* 1991;Butler 1989;Sodek *et al.* 2000;Young *et al.* 1992;Young *et al.* 1990). Es gehört zur Familie der so genannten „SIBLING“ Proteine (*small integrin binding ligand N-linked glycoprotein*). Mit weiteren Mitgliedern dieser Proteinfamilie hat OPN genetische und biochemische Gemeinsamkeiten (Bellahcene *et al.* 2008;Fisher & Fedarko 2003;Fisher *et al.* 2004;Fisher *et al.* 2001). Eine Gemeinsamkeit ist das Vorhandensein einer sogenannten RGD-Sequenz. Die RGD-Sequenz ist eine Aminosäuresequenz aus den drei L-Aminosäuren Arginin, Glycin und Asparaginsäure, kurz Arg-Gly-Asp, oder im Einbuchstabencode RGD. Die RGD-Sequenz findet sich im Besonderen bei Proteinen der extrazellulären Matrix (Oldberg *et al.* 1986;Oldberg *et al.* 1988). Über die Funktion dieser RGD-Sequenz wird später noch ausführlicher berichtet.

Das Molekül OPN wurde in den 60er Jahren durch Proteinfractionierung aus Rinderknochen entdeckt und von *Herring* und seinen Mitarbeitern erstmals beschrieben (Herring 1976;Herring & Kent 1963). Aufgrund seiner verschiedenen Funktionen ist Osteopontin auch unter den Namen Nephropontin, Uropontin, „early T lymphocyte activation 1“ (ETA-1) oder „secreted phosphoprotein 1“ (SSP1) bekannt. *Senger et al.* beschrieb 1979 das Protein zuerst als „marker of transformation“ Protein für epitheliale Zellen, was seine Funktion in der Tumorbologie bereits vermuten ließ (Senger *et al.* 1979). Später wurde OPN als non-kollagenes Protein im

Knochengewebe identifiziert, woraufhin es den Namen „Osteopontin“ erhielt (Oldberg *et al.* 1986). Dies rührte daher, dass es ein Produkt aus Knochenzellen ist und eine Brücke zwischen Zellen und der mineralen Matrix schlägt. (*lateinisch pons* = Brücke). Anhand vieler Studien konnte bereits gezeigt werden, welche wichtige Rolle OPN in vielen physiologischen Prozessen, wie Angiogenese, Wundheilung, Hypoxie, Apoptose, Inflammation und der Immunantwort zukommt (Asou *et al.* 2001; Shijubo *et al.* 2000; Standal *et al.* 2004). Letztere beide Prozesse gaben dem Protein auch den Namen ETA-1, „early T-lymphocyte activation protein 1“, um somit seine Rolle in der Immunantwort zu unterstreichen (Patarca *et al.* 1989). Mittlerweile sind mehr als 35 Jahre vergangen seitdem OPN als „marker of transformation“ Protein erstmals beschrieben wurde. Dennoch ist das Interesse von OPN in seiner Rolle als Tumormarker sowie seiner Beteiligung in der Genese und im Progress von Tumorerkrankungen nach wie vor ungebrochen groß (Weber 2011).

Abbildung 2.3.1a: Molekulare Struktur von Osteopontin

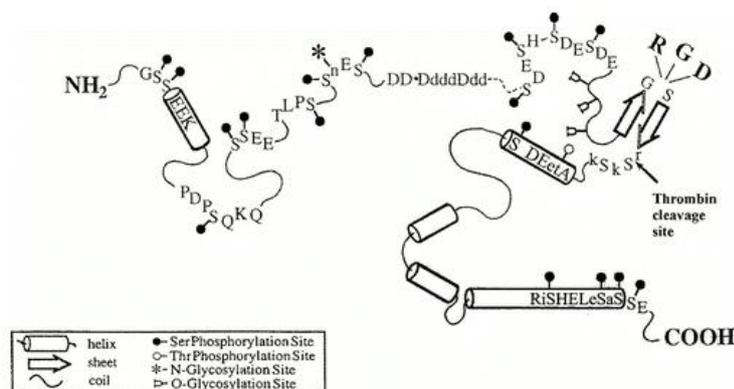


Abbildung 2.3.1a: Struktur des OPN Moleküls basierend auf der Aminosäuresequenz und Vorhersage der sekundären Struktur. Aus Denhardt *et al.*: Role of Osteopontin in cellular signaling and toxicant injury. Annual Review of Pharmacology and Toxicology, Volume 41, 723-749.04/2001

2.3.2 Bindungsstellen des OPN

Das Protein OPN besitzt verschiedene Bindungsstellen, die Grund für seine Multifunktionalität bei vielen physiologischen und pathophysiologischen Prozessen sind (Chakraborty *et al.* 2006) Seine biologische Funktion wird durch seine extensive Phosphorylierung reguliert.

Abbildung 2.3.2a: Struktur von Osteopontin

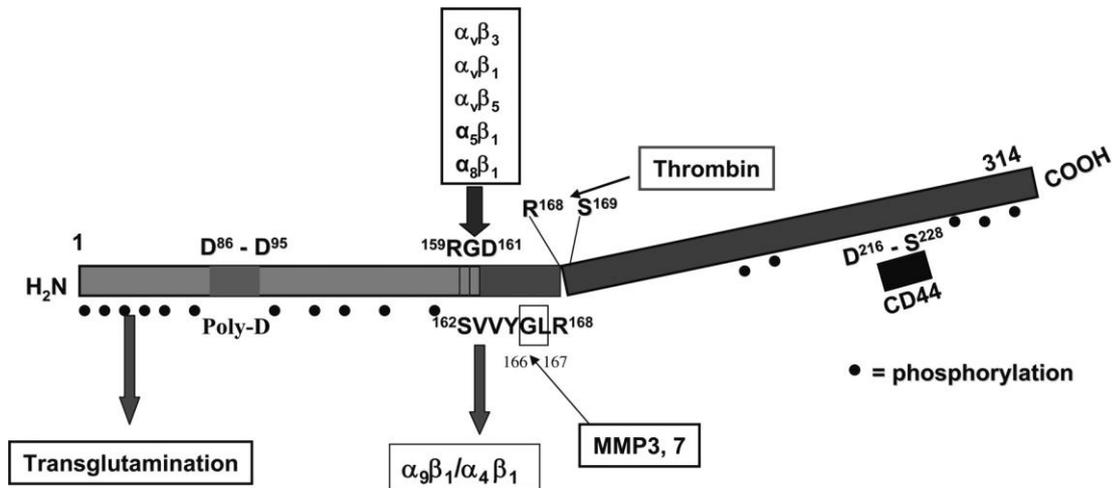


Abbildung 2.3.2a: Struktur und korrespondierende Bindungsstellen von OPN sowie die entsprechenden Liganden der Bindungsstellen. Aus Ramaiha et al: Pathophysiological Role of Osteopontin in Hepatic Inflammation, Toxicity, and Cancer. *Toxicological Sciences* 103(1), 4–10/200

Abbildung 2.3.2a und 2.3.2b verdeutlichen schematisch die verschiedenen Bindungsstellen von Osteopontin und seine Interaktion mit den unterschiedlichen Liganden. Hieraus lässt sich bereits ersehen welchen Einfluss OPN auf viele physiologische und pathologische Prozesse hat.

Abbildung 2.3.2b: Osteopontin und seine Bindungsstellen

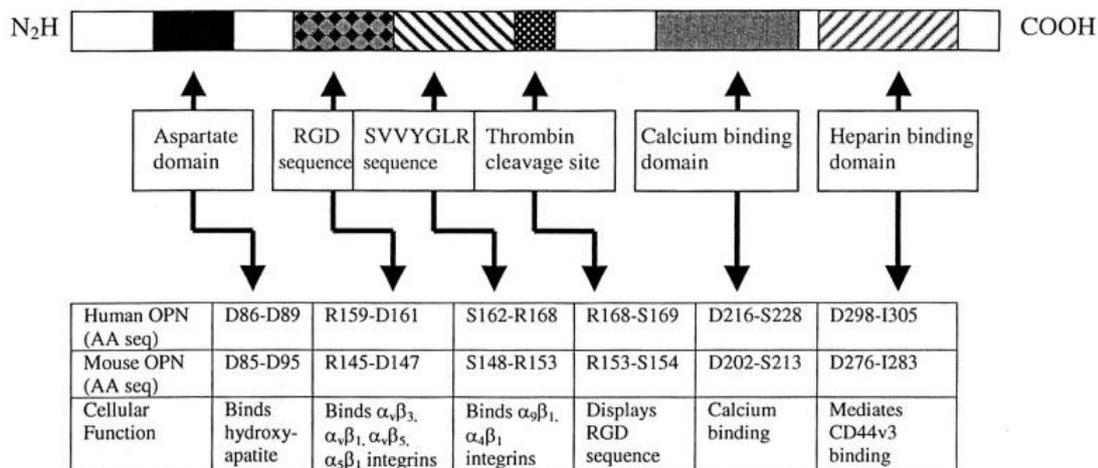


Abbildung 2.3.2b: Struktur von OPN sowie ausgewählte Bindungsstellen mit der Angabe der Loci in der Aminosäuresequenz von humanem OPN und OPN der Maus. D = Aspartat, R = Arginin, S = Serin, V = Valin, G = Glycin, L = Leucin, I = Isoleucin. Abbildung aus Wai et al: The role of Osteopontin in tumor metastasis. *Journal of Surgical Research* Volume 121, Issue 2, 228–241.10/2004

2.3.3 Mediatoren des OPN Signalweges - $\alpha_v\beta$ Integrine und CD44 -

Osteopontin besitzt, wie oben erwähnt, eine Arginin-Glycin-Asparagin (RGD) Bindungsstelle für Integrine, eine Gemeinsamkeit, die OPN mit anderen Mitgliedern der SIBLING Proteinfamilie teilt. Dadurch kommt OPN bei vielen Signalwegen eine entscheidende Rolle zu, die auch die Tumorprogression und Metastasierung von Tumoren beeinflusst (Ruoslahti & Pierschbacher 1987;van Dijk *et al.* 1993). In den folgenden Abschnitten möchte ich nun näher darauf eingehen.

CD44

OPN entfaltet seine Wirkung durch Bindung an verschiedene Zelloberflächenrezeptoren wie z.B. CD44 oder einer Reihe von Integrinen, welche auch von vielen Tumorzellen exprimiert werden. Der primäre Ligand für CD44 ist die Hyaluronsäure, aber auch andere Proteine der Extrazellulären Matrix, wie z.B. OPN können an CD44 binden (Naor *et al.* 1997). Die Bindung von OPN an CD44 scheint unabhängig von der RGD-Sequenz zu erfolgen (Anborgh *et al.* 2009;Katagiri *et al.* 1999). Der CD44-Rezeptor besitzt zusätzlich zu seiner Standardform verschiedene Isoformen, die durch das Splicen von 10 verschiedenen Exons in der extrazellulären Domäne entstehen, sie werden mit CD44v6-15 gekennzeichnet. Besonders CD44v6 wurde als Biomarker für eine Metastasierung in Hepatozellulären Karzinomen, Mamma-, Lungen-, Pankreas-, Kolorektalen-, und Magen-Karzinomen identifiziert (Goodison *et al.* 1999;Khan *et al.* 2005;Marhaba & Zoller 2004;Ponta *et al.* 2003;Rudzki & Jothy 1997;Takahashi *et al.* 2003;Wang *et al.* 2011a).

Unter Nutzung von bestimmten Domänen ($\beta 1$ Integrine) kann sich OPN an die CD44-Varianten CD44v6 und CD44v7 binden und somit eine Funktion als Ligand übernehmen (Katagiri *et al.* 1999). Die Bindung zwischen Osteopontin und CD44 wird unterschiedlich beschrieben. Zum einen wird CD44 als Ligand der dephosphorylierten Form von OPN eine pro-inflammatorische und chemotaktische Rolle zugesprochen (Anborgh *et al.* 2009;Ashkar *et al.* 2000). Als lösliches Protein oder auch im gebundenen Zustand an der extrazellulären Matrix ist OPN in die Migration und Aktivierung von Makrophagen involviert (Weber *et al.* 2002). Es konnte nachgewiesen werden, dass die Bindung von OPN an CD44 ausreicht, um

Chemotaxis oder Adhäsion von Makrophagen zu induzieren (van Dijk et al. 1993; Weber et al. 1996).

Des Weiteren berichten *Zohar* und Mitarbeiter über die Rolle des Proteinkomplexes OPN-CD44-ERM (Ezrin-Radixin-Moesin) in der Migration und im Überleben von durch Fibroblasten aktivierten Makrophagen und metastasierenden Zellen (*Zohar et al.* 2000). So führt eine Aktivierung von OPN durch den „Granulocyte macrophage colony-stimulating factor“ (GM-CSF) Rezeptorwechselwirkung zum Überleben der Zelle durch Interaktion von OPN mit CD44 und der damit verbundenen Induktion der Phosphatidylinositol Triphosphat-Kinase (PI3K/Akt) Signal-Kaskade (Lin & Yang-Yen 2001). Weiterhin aktiviert OPN dendritische Zellen und Makrophagen und induziert eine TH1-Immunantwort (*Ashkar et al.* 2000; *Renkl et al.* 2005). Analog dazu amplifiziert OPN durch Co-Stimulation die CD3 vermittelte T-Zellproliferation (*O'Regan et al.* 1999), reguliert die CD40-Liganden-Expression auf CD3+ T-Zellen herauf und induziert die IFN- γ -Produktion (*O'Regan et al.* 2000).

Integrine

Die Bindung von OPN an Integrine führt zur Aktivierung von Signaltransduktionswegen, die das Wachstum von Tumorzellen fördern können. OPN verbessert durch die Bindung an Integrin-Rezeptoren die Zelladhäsion und -migration und hemmt die Apoptose, wodurch Tumorprogression und Metastasierung ermöglicht werden (*Ahmed et al.* 2011; *Anborgh et al.* 2009; *Zohar et al.* 2000). OPN besitzt die Fähigkeit an verschiedene Integrin-Rezeptoren zu binden. Hierzu zählen unter anderem: $\alpha_v\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$ und $\alpha_4\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_8\beta_1$ und $\alpha_9\beta_1$. (*Barry et al.* 2000; *Bayless et al.* 1998; *Denda et al.* 1998; *Gerber et al.* 1996; *Hu et al.* 1995; *Liaw et al.* 1994; *Liaw et al.* 1995a; *Liaw et al.* 1995b; *Smith et al.* 1996; *Yue et al.* 1994). Im Besonderen spielt hier $\alpha_v\beta_3$ eine wichtige Rolle, da es die Zelladhäsion von B-Zellen, Blutplättchen, Osteoklasten und glatten Muskelzellen ermöglicht (*Anborgh et al.* 2011). Die Bindung von OPN an Integrine kann außer der Migration und Invasion von Tumorzellen auch eine Neovaskularisation fördern, indem es die Migration von Endothelzellen, deren Überleben und Gefäßformation während der Angiogenese reguliert (*Chakraborty et al.* 2006; *Dai et al.* 2009; *Hirama et al.* 2003). Eine Tatsache, welche die pro-angiogenetische Rolle von OPN unterstützt, ist die Beobachtung,

dass der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (*vascular endothelial growth factor*, VEGF) die Expression von OPN und $\alpha_v\beta_3$ in mikrovaskulären Endothelzellen induziert (Denhardt *et al.* 2001; Senger *et al.* 1996).

Abbildung 2.3.3a: Interaktion und Einfluss von OPN auf verschiedene Signaltransduktionswege

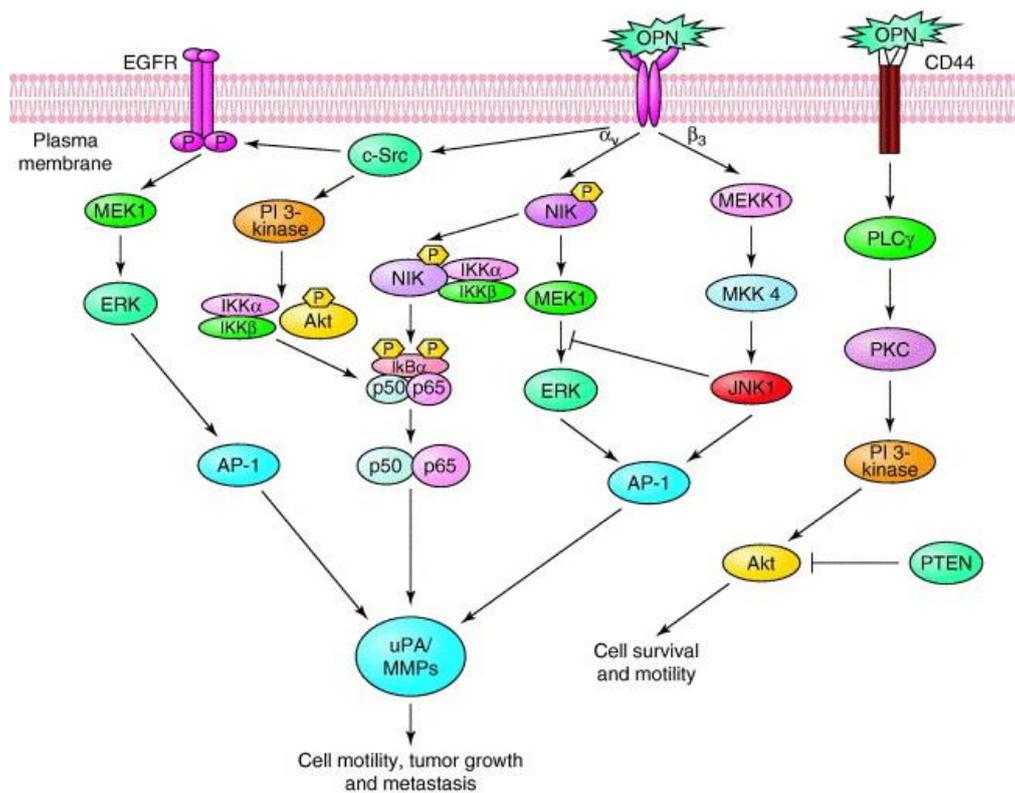


Abbildung 2.3.3a: Osteopontin und sein Einfluss auf unterschiedliche Signaltransduktionswege. Aus Rangaswami *et al.*: Osteopontin, role in cell signaling and cancer progression. *Trends in Cell Biology*, Volume 16, Issue 2, 79–87.02/2006

Abbildung 2.3.3a zeigt die molekularen Mechanismen des $\alpha_v\beta_3$ -Integrin und CD44-vermittelten Signaltransduktionsweges. Die Bindung von OPN an $\alpha_v\beta_3$ -Integrin induziert die Phosphatidylinositol 3-Kinase/Proteinkinase (PI3K/Akt) - abhängige Aktivierung von Nuklearfaktor Kappa B (NF κ B) und die Sekretion des Urokinase-Plasminogen-Aktivators (uPA) in die Krebszellen. OPN induziert ebenfalls eine NIK-Kinase abhängige NF κ B-Aktivierung über die Proteinkinasen IKK und/oder ERK. Diese stimulieren die uPA-abhängige Aktivierung der Matrixmetallopeptidase 9 (MMP-9).

Die Interaktion von OPN mit CD44 fördert das Zellüberleben und die Zellbeweglichkeit über eine Aktivierung von Phospholipase C- γ /Proteinkinase C/ Phosphatidylinositol 3-Kinase-Signalwegen (PLC- γ /PKC/PI3). Das Phosphatase und Tensin homologe Protein (PTEN) reguliert negativ die Akt Aktivierung während der Osteoklasten Differenzierung. Weiterhin stimuliert OPN Tyrosinkinase Src- abhängig (c-Src) den epidermalen Wachstumsfaktor (*epidermal growth factor receptor - EGFR*), die ERK Phosphorylierung und die Aktivatorprotein 1 (AP1) -Aktivierung und reguliert negativ die Kommunikation (Crosstalk) zwischen den NIK/ERK und Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1 (MEKK1)/ Mitogen-activated protein kinase 8 (JNK1) Signalwegen. All diese Prozesse tragen zur Motilität und Invasion von Krebszellen, zum Tumorwachstum und zur Metastasierung bei (Rangaswami *et al.* 2006).

2.4 Biomarker

Der Einfluss von OPN auf verschiedene physiologische und pathophysiologische Prozesse und seine Rolle bei der Tumorprogression und Metastasierung geben Hinweis auf das Potential als Tumormarker. Warum OPN als krankheitsbezogener, prognostischer Marker für Tumorerkrankungen herangezogen werden kann, soll im Folgenden beschrieben werden.

2.4.1 Allgemeines

Bereits in der Antike verwendete man Biomarker um Erkrankungen besser diagnostizieren zu können und somit dem Erkrankten schnell und ohne größeren Zeitverlust die richtige Therapie zukommen lassen zu können. Ein Beispiel aus der Antike ist die Harnanalyse, bei der die Heilkundigen aus Farbe, Geruch und Geschmack des Urins auf bestimmte Krankheiten und deren Verlauf schließen konnten (Pisitkun *et al.* 2006). Bei Biomarkern kann es sich um Zellen, Gene, Genprodukte, Proteine, Enzyme oder Hormone handeln. Auch eine erhöhte Expression oder eine verringerte Expression von bestimmten Proteinen im gesunden als auch im kranken Gewebe, wie z.B. im Tumorgewebe, kann als Biomarker fungieren.

Man unterscheidet im Allgemeinen zwischen krankheitsbezogenen und arzneimittelbezogenen Biomarkern. Krankheitsbezogene Biomarker dienen zur besseren Diagnose einer Erkrankung oder helfen den Verlauf bzw. die Prognose dieser besser einschätzen zu können. Arzneimittelbezogene Biomarker dienen dazu das Ansprechen auf eine bestimmte Therapie am Patienten abzuschätzen. Klassische Biomarker in der Medizin sind Laborparameter, welche zur Diagnosesicherung und Therapieentscheidung herangezogen werden. Um einen Biomarker zur Diagnostik nutzen zu können, sollte das Probenmaterial leicht zugänglich sein, wie z. B über eine Blutentnahme, eine Urin- oder Speichelprobe. Viele der im klinischen Alltag vorkommenden Biomarker können heutzutage mittels eines einfachen Bluttests gemessen werden.

2.4.2 Tumormarker

Tumormarker können Biomarker sein, welche entweder vom Tumor selbst produziert werden oder physiologisch beim Gesunden ebenfalls vorkommen, jedoch beim Erkrankten in entsprechend höherer oder niedriger Konzentration zu messen sind. Sehr häufig handelt es sich bei Tumormarkern um Glykoproteine, Immunglobuline, Enzyme oder Hormone.

2.4.3 Osteopontin als Tumormarker

OPN findet sich in fast allen Körperflüssigkeiten und besitzt somit als Biomarker eine günstige Voraussetzung. Durch Western-Blot konnten *Senger et al.* 1988 und 1989 an einer kleinen Anzahl von Patienten mit unterschiedlichen Krebserkrankungen nachweisen, dass die OPN-Spiegel im Blut im Vergleich zu Kontrollen erhöht sind (*Senger et al.* 1988; *Senger et al.* 1989a). *Bautista et al* entwickelten 1996 den ersten ELISA zur Quantifizierung und Messung von OPN im Blutplasma. Sie verwendeten diesen ELISA zur Erhebung von Normwerten bei einer Reihe gesunder Frauen (*Bautista et al.* 1996). *Singhal et al* nutzten wiederum 1997 diesen ELISA um die OPN-Spiegel im Blutplasma von 70 Frauen mit metastasiertem Brustkrebs zu messen. Die OPN-Spiegel im Blutplasma waren im Vergleich zu den Kontrollen signifikant erhöht. Des Weiteren korrelierten erhöhte Blutplasma-OPN-Spiegel signifikant mit dem Überleben der Patienten sowie mit der Anzahl der Metastasen

(Singhal *et al.* 1997a). In den letzten Jahren haben eine Vielzahl unterschiedlicher Studien diese ersten Ergebnisse zu OPN bestätigt und auf andere Krebserkrankungen übertragen können. Die Liste der Studien und der untersuchten Krebsarten ist lang und umfangreich. In einem 2011 publizierten Review berichten Weber *et al.*, dass ein positiver Zusammenhang zwischen dem OPN-Spiegel in Blutplasma, Serum und/oder Liquor bzw. eine erhöhte Expression von OPN in Tumorgewebe nach ihrer Metaanalyse bei mehr als 30 verschiedenen Krebsarten nachgewiesen werden konnte. Die zur Metaanalyse verwendeten Daten stammen aus Publikationen der „Pubmed“- Datenbank. Gleichzeitig wurden RNA-Microarray Daten der „Oncomine“- Datenbank ebenfalls für die Metaanalyse herangezogen. Bei der Auswertung dieser Metaanalyse zeigte sich, dass OPN als prognostischer Marker für Mama-, Zervix-, Kolorektal-, Hepato- und Lungenkarzinomen als auch bei Kopf- und Halstumoren sowie bei Ovarial- und Prostatakarzinomen, wie auch bei Sarkomen potentiell einsetzbar wäre. OPN ist auch in Metastasen von Kolonkarzinomen, Lungenkarzinomen und Melanomen überexprimiert, nicht jedoch z.B. in Metastasen von Ovarialkarzinomen (Weber *et al.* 2011a). OPN ist im Besonderen bei Mamma-Karzinomen (Allan *et al.* 2006;Bramwell *et al.* 2006;Cook *et al.* 2005;Macri *et al.* 2009;Patani *et al.* 2008;Tuck & Chambers 2001;Tuck *et al.* 2007;Wang *et al.* 2008) und Lungentumoren (Donati *et al.* 2005;Fedarko *et al.* 2001;Shojaei *et al.* 2012;Zhang *et al.* 2010;Zhao *et al.* 2011) untersucht worden. Auch bei Gastrointestinalen Tumoren (Hsu *et al.* 2010b), Leukämien (Chagan-Yasutan *et al.* 2011;Liersch *et al.* 2012), Pankreas Karzinomen (Collins *et al.* 2012;Hsu *et al.* 2010a;Kolb *et al.* 2005;Koopmann *et al.* 2004), Nierenzellkarzinomen (Matusan-Ilijas *et al.* 2013;Matusan *et al.* 2006;Ramankulov *et al.* 2007b) sowie beim malignen Melanom (Filia *et al.* 2013) konnten signifikant veränderte OPN-Werte festgestellt werden.

OPN spielt demnach eine aktive Rolle bei entscheidenden Schritten der Tumorprogression und Metastasierung. Folgendes und unten schematisch dargestelltes Modell wird hierbei zur Erklärung in einigen Arbeiten (www.osteopontin.org) herangezogen: Die Krebszellen des Primärtumors sezernieren OPN in höheren Konzentrationen, was ihr Zellüberleben (A) und ihr Wachstum (B) begünstigt. Krebszellen mit verstärkter Fähigkeit zur Adhäsion und Migration lösen sich von der Primärtumormasse ab und durchdringen die

Basalmembran um das Stromagewebe zu infiltrieren. Die damit verbundene Proteolyse der extrazellulären Matrix (ECM) wird durch Matrix Metalloproteinasen (MMPs) und Urokinase Plasminogen Aktivator (uPA) reguliert. OPN verstärkt die Aktivierung von uPA, die Beweglichkeit der Zellen und das Eindringen in das umliegende Gewebe. An der Eindringungsstelle befindet sich dann eine Bindungsstelle an den $\alpha_v\beta_3$ -Integrin oder CD44-Rezeptor. Dies wiederum fördert aktiv die lokale Proteolyse durch die Bindung an MMP3 (C). Die Expression von OPN durch die Tumorzellen fördert ebenfalls die Migration und Adhäsion von aktivierten Endothelzellen, welche zwingend notwendig sind für die Angiogenese. OPN fungiert auch als chemotaktisches und adhäsives Molekül für Makrophagen und fördert die Infiltration von Makrophagen in den Tumor (D). Der Transport von Krebszellen in den Kreislauf ist der limitierende Schritt auf dem Metastasierungsweg in ferne Organe, da die Krebszellen nun auf das Immunsystem des Wirtes treffen. An der Insertionsstelle, wird in diesem Kontext deutlich, dass die Expression und Anwesenheit von OPN an der Zelloberfläche die Aktivierung und Bindung von Komplementfaktor H an dieser Stelle verhindert. Somit schützen sich die Krebszellen vor der Komplement-aktivierten Lyse (E). Am Ort der Metastasierung folgt dem Austritt der Krebszellen aus dem Gefäß die Formierung einer neuen Kolonie. Wachstums, Überlebens- und angiogenetische Signale von neu formierten Krebszell-Kolonien werden in ähnlicher Weise und Mechanismen erzeugt, die bei den ersten Schritten in der Tumorprogression ebenfalls zum Einsatz kommen. Auch hier fördert das von den Krebszellen sezernierte OPN die Tumorprogression. Abbildung 2.4.3a zeigt schematisch den Verlauf bei der Tumorprogression und Metastasierung.

Abbildung 2.4.3a: Einfluss von Osteopontin auf die Tumorprogression und Metastasierung

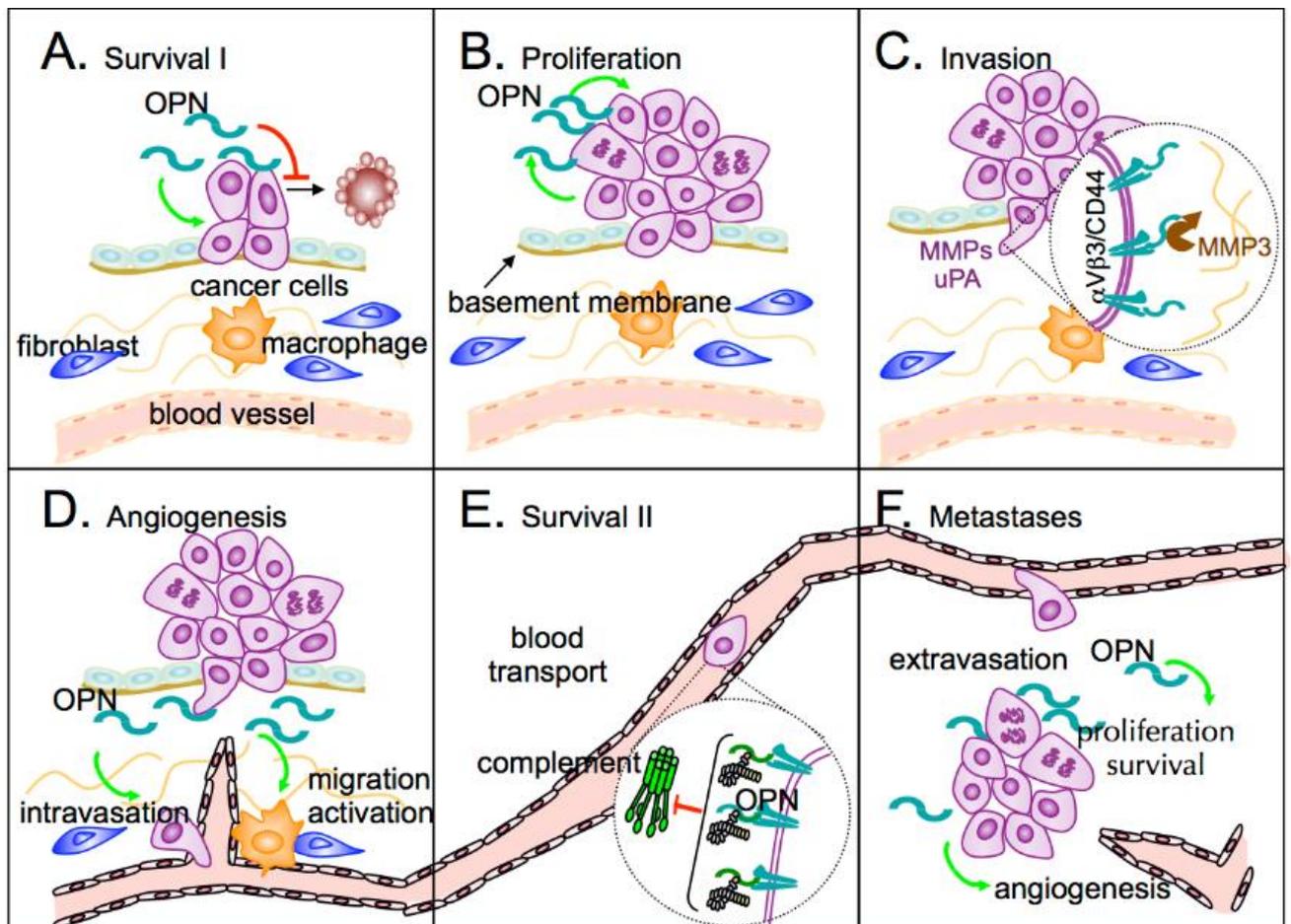


Abbildung 2.4.3a: Osteopontin in cancer, Abbildung aus www.osteopontin.org

Neben zahlreichen Studien welche OPN und seinen Nutzen als Biomarker bei verschiedenen Krebserkrankungen untersuchen, existieren auch eine Reihe von Arbeiten, die sich mit nicht-malignen Erkrankungen beschäftigen. Hier finden sich viele Studien zu OPN als Marker für Inflammation und Immunantwort bei zentral nervösen Erkrankungen (Brown 2012), wie z.B. multipler Sklerose oder Alzheimer (Bornsen *et al.* 2011; Carecchio & Comi 2011). Ein weiterer Forschungsbereich beschäftigt sich mit dem Einfluss von OPN bei Erkrankungen des Herzens (Behnes *et al.* 2013; Schipper *et al.* 2011), der Leber wie auch der Lunge (Hillas *et al.* 2013; Nagoshi 2014).

Zusammengefasst lassen die bisherigen Studien darauf schließen, dass OPN, vor allem als prognostischer Tumormarker bei verschiedenen Krebserkrankungen, häufig soliden Tumoren von erwachsenen Patienten, aber auch bei akuten Leukämien, in Frage kommen könnte und somit als Verlaufsparemeter für die klinische Praxis in Betracht kommt. Die zu Beginn der Einleitung vorgestellte Studie von *Kao et al* zeigte, dass OPN auch bei Krebserkrankungen des Kindes- und Jugendalters eine wichtige Rolle als prognostischer Tumormarker zukommen kann (*Kao et al. 2005a; Kao et al. 2005b*). Leider gibt es zu OPN-Spiegel im Kindesalter nur sehr wenig publizierte Studien. Keiner der bis dato veröffentlichten Arbeiten hat sich systematisch mit der Messung von Osteopontin innerhalb aller Altersklassen im Kindes- und Jugendalter beschäftigt. Um zu erfahren, ob und welchen Veränderungen OPN im Blut und Liquor während der Entwicklung unterliegt und ob wohlmöglich altersabhängige Schwankungen existieren, ist Gegenstand dieser Doktorarbeit. Des Weiteren wollte ich nach Erstellung altersspezifischer Referenzwerte wissen, ob Kinder mit Krebserkrankungen einen höheren OPN-Wert in Blutplasma und/oder Liquor aufweisen als ihre gleichaltrigen Kontrollen.

3. Material und Methodik

Die Studie entspricht den Grundsätzen der Deklaration von Helsinki in der letzten Fassung von Oktober 2008, Seoul, Südkorea. Der entsprechende Ethikantrag für diese Arbeit wurde von der Ethikkommission positiv beschieden [Aktenzeichen: 159/06 vom 02.10.2012]. Eine Kopie des Ethikvotums findet sich im Anhang dieser Dissertation.

3.1 Patientenkollektiv

Die Studienteilnehmerinnen und -teilnehmer wurden aus dem Patientengut der Klinik für Kinder und Jugendmedizin der Universität des Saarlandes in Homburg/Saar rekrutiert. An der Rekrutierung der Proben waren die Klinik für pädiatrische Hämatologie und Onkologie, sowie die Klinik für Allgemeine Pädiatrie, Neonatologie und Neuropädiatrie beteiligt.

EDTA-Blut und Liquor-Proben der Patienten wurden im Zeitraum Januar 2006 bis Januar 2008 gesammelt. Die Kinder wurden in folgende Altersklassen unterteilt. Neugeborene (Nabelschnurblut), Säuglinge (0-1 Jahre), Vorschulkinder (1-5 Jahre), Grundschulkinder (6-10 Jahre), Kinder und Jugendliche (11-14 Jahre) und Adoleszenten (>14 Jahre).

3.2 Kontrollkollektiv

In der Kontrollgruppe wurden 148 Blut- und 42 Liquor-Proben von insgesamt 188 Kindern und Jugendlichen im Alter von 0 bis 21 Jahren auf OPN untersucht, welche im Rahmen von Routineuntersuchungen in der Kinderklinik abgenommen wurden. Wie bereits in der Einleitung dargestellt, konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden, dass OPN im Rahmen von Entzündungsprozessen vermehrt exprimiert wird, auch Erkrankungen die Leber und Niere, sowie Erkrankungen die den Knochenstoffwechsel beeinträchtigen, können den OPN Spiegel im Blut beeinflussen. Deshalb wurden Patienten mit einer Sepsis und/oder Meningitis von vornherein ausgeschlossen. Auch Patienten mit Erkrankungen aus dem

rheumatischen Formenkreis wurden aus dem Kollektiv ausgeschlossen. Es wurde eine Kontrollgruppe zusammengestellt auf die folgende Voraussetzungen zutrafen:

3.2.1 Einschlusskriterien

- Patienten ohne Tumorerkrankung
- Patienten im Alter zwischen 0 und 21 Jahren
- Vorliegen einer schriftlichen Einverständniserklärung der Eltern bzw. des Patienten bei Volljährigkeit

3.2.2 Ausschlusskriterien

- schwere Organinsuffizienzen, wie Herz-, Nieren-, Leberinsuffizienz
- schwere Infektionserkrankungen wie Sepsis, Meningitis
- Erkrankungen aus dem rheumatischen Formenkreis
- Nicht Vorhandensein einer schriftlichen Einverständniserklärung der Eltern bzw. des Patienten bei Volljährigkeit

Im Ergebnisteil werden in Tabelle 4.1a die Hauptdiagnosen der Patienten aus dem Kontrollkollektiv tabellarisch aufgeführt. Alle relevanten Patientencharakteristika können dieser Tabelle entnommen werden. Diese Tabelle ist ebenso separat und detailliert im Anhang dieser Arbeit aufgeführt.

3.3 Studienkollektiv

In die Studiengruppe wurden ausschließlich Kinder mit malignen Krebserkrankungen eingeschlossen. Die Proben wurden zum Teil zu Beginn der Erkrankung, bei Diagnosestellung asserviert und zum Teil erfolgten Blutentnahmen unter Therapie, wie auch bei Remission und im Rezidiv. In Tabelle 3.3.3a-d sind die Abnahmezeitpunkte und Patientencharakteristika des Studienkollektivs, entsprechend der einzelnen Tumorentitäten zusammengefasst. Es erfolgte jeweils eine Blutentnahme zu einem Zeitpunkt während der Erkrankung. Es erfolgten keine Mehrfach-Blumentnahmen pro Patient, so dass der Verlauf des OPN Spiegels pro Patient und Erkrankung hätte beurteilt werden können. Auch im Studienkollektiv

wurden die Kinder zunächst in 5 verschiedene Altersklassen eingeteilt. Die Krankheitsbilder verteilten sich hier wie folgt für Blut- und Liquor-Proben: Akute Leukämien 15/14, Hirntumore 5/7, Lymphome 6/2 und andere solide Tumoren 7/0.

3.3.1 Einschlusskriterien

- Patienten im Alter zwischen 0 und 21 Jahren
- Patienten mit maligner Tumorerkrankung
- Vorliegen einer schriftlichen Einverständniserklärung der Eltern bzw. des Patienten bei Volljährigkeit

3.3.2 Ausschlusskriterien

- schwere Organinsuffizienzen, wie Herz-, Nieren-, Leberinsuffizienz
- schwere Infektionserkrankungen wie Sepsis, Meningitis
- Erkrankungen aus dem rheumatischen Formenkreis
- Nicht Vorhandensein einer schriftlichen Einverständniserklärung der Eltern bzw. des Patienten bei Volljährigkeit

3.3.4 Patientencharakteristika Studienkollektiv

Tabelle 3.3.3a: Patienten mit akuten Leukämien

Fall-Nr	Klinik	Geschlecht	Alter [J]	Hauptdiagnose	ZNS-Beteiligung	Rezidiv	Status	Abnahmephase	Proben
3	Kinderonkologie	weiblich	7	cALL	nein	ja	CR	Rezidiv	Blut+Liquor
4	Kinderonkologie	weiblich	3	präB-ALL	nein	ja	Tod	Rezidiv	Blut
5	Kinderonkologie	männlich	8	cALL	nein	ja	Tod	Remission	Blut+Liquor
8	Kinderonkologie	männlich	8	cALL	nein	ja	Tod	Remission	Blut+Liquor
9	Kinderonkologie	männlich	13	cALL	nein	nein	CR	Diagnose	Blut+Liquor
11	Kinderonkologie	weiblich	2	cALL	ja	nein	CR	Diagnose	Blut+Liquor
23	Kinderonkologie	männlich	9	cALL	nein	nein	CR	Remission	Blut
29	Kinderonkologie	männlich	1	cALL	ja	nein	CR	Remission	Blut+Liquor
34	Kinderonkologie	weiblich	12	cALL	nein	nein	CR	Remission	Liquor
44	Kinderonkologie	männlich	5	AML	nein	nein	CR	Remission	Liquor
50	Kinderonkologie	weiblich	10	cALL	nein	nein	CR	Remission	Liquor
55	Kinderonkologie	weiblich	4	cALL	nein	nein	CR	Remission	Liquor
57	Kinderonkologie	männlich	1	präB-ALL	nein	nein	CR	Remission	Liquor
110	Kinderonkologie	männlich	1	cALL	nein	nein	CR	Diagnose	Liquor
131	Kinderonkologie	männlich	8	cALL	nein	nein	CR	Remission	Blut+Liquor
141	Kinderonkologie	männlich	2	cALL	nein	nein	CR	Remission	Blut+Liquor
175	Kinderonkologie	männlich	11	präT-ALL	ja	nein	Tod	Remission	Blut
199	Kinderonkologie	weiblich	8	cALL	nein	nein	CR	Remission	Blut
201	Kinderonkologie	weiblich	6	cALL	nein	nein	CR	Remission	Blut
203	Kinderonkologie	weiblich	10	cALL	nein	nein	CR	Diagnose	Blut
230	Kinderonkologie	weiblich	6	cALL	ja	nein	CR	Diagnose	Blut

Tabelle 3.3.3b : Patienten mit Hirntumoren

Fall-Nr	Klinik	Geschlecht	Alter [J]	Hauptdiagnose	Rezidiv	Status	Abnahmephase	Proben
6	Kinderonkologie	weiblich	4	Medulloblastom	nein	Tod	Remission	Blut+Liquor
67	Kinderonkologie	weiblich	15	Germinom	nein	CR	Remission	Liquor
74	Kinderonkologie	weiblich	2	unklare Raumforderung	nein	CR	Diagnose	Liquor
95	Kinderonkologie	weiblich	7	Ependymom	nein	CR	Remission	Liquor
103	Kinderonkologie	weiblich	0	Plexuspapillom	nein	CR	Remission	Liquor
106	Kinderonkologie	männlich	2	Pineoblastom	nein	Tod	Therapie	Liquor
149	Kinderonkologie	männlich	12	Ependymom	nein	CR	Remission	Blut
151	Kinderonkologie	männlich	21	Oligoastrozytom	ja	Tod	Rezidiv	Blut
156	Kinderonkologie	männlich	8	Optikusgliom	nein	CR	Remission	Blut
183	Kinderonkologie	männlich	3	Medulloblastom	nein	Tod	Therapie	Blut
184	Kinderonkologie	weiblich	1	Medulloblastom	nein	CR	Therapie	Liquor

Tabelle 3.3.3c: Patienten mit Lymphom

Fall-Nr	Klinik	Geschlecht	Alter [J]	Hauptdiagnose	Rezidiv	Status	Abnahmephase	Proben
12	Kinderonkologie	weiblich	17	Hodgkin Lymphom	ja	Tod	Rezidiv	Blut
18	Kinderonkologie	männlich	14	Hodgkin Lymphom	nein	CR	Remission	Blut+Liquor
24	Kinderonkologie	männlich	13	Hodgkin Lymphom	nein	CR	Diagnose	Blut
26	Kinderonkologie	weiblich	18	Hodgkin Lymphom	ja	CR	Therapie	Blut
31	Kinderonkologie	weiblich	7	Non-Hodgkin Lymphom	nein	CR	Remission	Liquor
165	Kinderonkologie	männlich	6	Hodgkin Lymphom	nein	CR	Remission	Blut
198	Kinderonkologie	weiblich	16	Hodgkin Lymphom	nein	CR	Remission	Blut

Tabelle 3.3.3d: Patienten mit sonstigen soliden Tumoren

Fall-Nr	Klinik	Geschlecht	Alter [J]	Hauptdiagnose	Rezidiv	Status	Abnahmephase	Proben
7	Kinderonkologie	männlich	4	Rhabdomyosarkom	nein	CR	Remission	Blut
14	Kinderonkologie	männlich	1	Weichteiltumor	nein	CR	Remission	Blut
15	Kinderonkologie	weiblich	17	Teratom	ja	CR	Remission	Blut
154	Kinderonkologie	weiblich	1	Rhabdomyosarkom	nein	CR	Therapie	Blut
155	Kinderonkologie	männlich	4	Neuroblastom	nein	Tod	Therapie	Blut
207	Kinderonkologie	männlich	11	Hodentumor	nein	CR	Remission	Blut
231	Kinderonkologie	männlich	17	Apendix Karzinoid	nein	CR	Diagnose	Blut

3.4 Studienablauf

3.4.1 Probengewinnung

Das EDTA-Blut und die Liquorproben wurden im Rahmen diagnostischer Blut- und Liquoruntersuchungen von den Kindern und Jugendlichen der Kinderklinik der Universität des Saarlandes in Homburg/Saar gewonnen. Es wurden keine zusätzlichen Blutabnahmen verordnet, um Proben für die Studie zu asservieren. Gleiches galt für die Gewinnung der Liquorproben. Alle Patienten bzw. deren Eltern wurden vor Abnahme aufgeklärt und ein schriftliches Einverständnis wurde eingeholt. Alle EDTA-Blutproben wurden direkt nach Abnahme zentrifugiert, aliquotiert und bei -80 Grad Celsius eingefroren. Die Liquorproben wurden ebenfalls nach Abnahme aliquotiert und bei -80 Grad Celsius eingefroren.

3.4.2 Messung der Blut- und Liquorproben

Nach Erreichen der gewünschten Probenanzahl wurden die Proben mittels ELISA gemessen. Für die ELISA-Messung der Proben wurde der „*Human Osteopontin Assay Kit – IBL*“ Code No 27158 der Firma *Immuno-Biological Laboratories Co., Ltd.* verwendet.

Geräte

Tabelle 3.4.2a: Geräteverzeichnis

Gerätetyp	Produkt	Hersteller
ELISA Reader	DRG – E – LIZA MAT – 3000	DRG International, USA
ELISA plate washer	Labsystems Autowash II	

Chemikalien

Tabelle 3.4.2b: Chemikalienverzeichnis

Methode	Produkt	Hersteller
OPN - ELISA	Human Osteopontin Elisa Kit	IBL, vertrieben durch die Firma Demeditec diagnostics, Kiel Nr. JP27158
	PMSF (Phenylmethanesulfonylfluoride) Proteaseinhibitor	SIGMA Nr. P7626 – 5G
	Isopropanol	ALDRICH Nr. 27,049 - 0
	PBS Puffer	SIGMA Nr. P4417 – 50TAB

3.5 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Der Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) ist ein Testverfahren, das Antigen oder Antikörper mittels eines Enzym - markierten Antikörpers (Konjugat) und einer dadurch katalysierten Färbereaktion quantitativ nachweist. Wichtig bei ELISA ist, dass die zu untersuchende Substanz mehr als eine Bindungsstelle für die Antikörper bereithält, weil das Antigen von beiden Seiten mit dem Antikörper besetzt sein soll. Die Oberfläche einer Mikrotiterplatte ist mit einem Überschuss an Antikörpern beschichtet, die gegen das zu ermittelnde Antigen gerichtet sind. Nach Absättigung unspezifischer Bindungsstellen und Waschen werden die Serumproben dazugegeben, um das darin enthaltene Antigen an den Antikörper zu binden. Als zweiter Schritt wird ein spezifisch gegen das Antigen gerichteter Antikörper

hinzugefügt, der kovalent an ein Enzym gebunden ist. Dieses Enzym katalysiert die Umsetzung eines bestimmten Substrats zu einem messbaren Farbkomplex, das dann mit Hilfe eines Photometers quantitativ bestimmt wird. Durch gleichzeitige Messung der Extinktion bekannter Antigen-Konzentrationen und einer daraus erstellten Standardkurve kann dann die Antigen-Konzentration bestimmt werden.

3.5.1 Sandwich – ELISA

Eine der ELISA -Techniken (Sandwich-ELISA) verwendet zwei Antikörper (Ak), die beide spezifisch an das nachzuweisende Antigen binden. Hierbei ist es wichtig, dass beide Antikörper an unterschiedlichen Stellen an das Antigen binden, da sie sich sonst gegenseitig behindern würden. Der erste Antikörper (coating-Antikörper) wird an eine feste Phase (meist spezielle Mikrotiterplatten mit 96 wells genannten Vertiefungen) gebunden. Die Probe mit dem nachzuweisenden Antigen wird dann in die wells gegeben und eine Zeit lang inkubiert. Während dieser Zeit bindet der an die Platte gebundene Antikörper das in der Probe vorhandene Antigen. Nach Ablauf der Inkubationsphase wird die Platte gewaschen: Die ungebundenen Bestandteile der Probe werden dadurch entfernt, und zurück bleibt nur das am (coating-) Antikörper gebundene Antigen. Im nächsten Schritt wird ein (zweiter) Detektions-(detection)-Antikörper zugegeben, der ein anderes Epitop als der Capture-Antikörper erkennt und an dessen Ende ein Enzym – meistens Meerrettichperoxidase (HRP, von engl. horseradish), Alkalische Phosphatase (AP) oder seltener Glucoseoxidase (GOX) – gebunden ist. Dieser zweite Antikörper bindet ebenfalls an das Antigen, und es entsteht der Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex (deshalb der Name Sandwich-ELISA – das Antigen ist zwischen die beiden Antikörper wie in einem Sandwich gepackt). Durch erneutes Waschen der Platte wird der überschüssige Detektionsantikörper ausgewaschen. Erst jetzt kann das Antigen detektiert und quantifiziert werden: Es wird ein zum Enzym passendes chromogenes Substrat zugegeben. Dieses wird vom Enzym zu einem Reaktionsprodukt umgesetzt, dessen Nachweis durch Farbumschlag, Fluoreszenz oder Chemolumineszenz erfolgen kann. Für quantitative Nachweise wird üblicherweise eine Serie mit bekannten Antigenkonzentrationen durchgeführt, um eine Kalibrierungskurve für das gemessene Signal (optische Extinktion, emittierte Intensität) zu erhalten.

Alternativ kann auch die Kombination eines ungekoppelten Detektions-Antikörpers und eines zusätzlichen (dritten) sekundären Antikörpers (sekundär, weil es ein Antikörper gegen Antikörper ist), an den ein Enzym gebunden wurde, verwendet werden. Obwohl aufwändiger, hat die Verwendung eines sekundären Antikörperkonjugats den Vorteil, dass die (teure) Herstellung Enzym-gekoppelter Primärantikörper, die nur für jeweils ein Antigen spezifisch sind, umgangen werden kann. Sekundäre Enzym-gekoppelte Antikörper, die universell die Fc-Region anderer Antikörper erkennen, können so für eine Vielzahl unterschiedlicher Immunassays verwendet werden, da es sich bei dem Sekundärantikörper um ein industrielles Massenfertigungsprodukt handelt. Eine weitere, häufige Alternative ist es, das empfindliche Enzym erst „in letzter Minute“ über Biotin an den Detektionsantikörper zu binden. Dies erfordert (neben der Biotinylierung des Detektionsantikörpers) noch einen weiteren Inkubations- und Waschschrift.

Im Falle von alkalischer Phosphatase wird als Chromogen z.B. p-Nitrophenylphosphat (pNPP) zugegeben. Die alkalische Phosphatase spaltet den Phosphatrest vom farblosen Nitrophenylphosphat ab und es entsteht p-Nitrophenol, welches schwach gelb ist. Diese Reaktion kann in einem Photometer verfolgt werden. Die Intensität der Farbe steigt dabei mit der Konzentration des entstandenen Nitrophenols und damit auch der Konzentration des zu bestimmenden Antigens in der Probe.

3.6 Inter- und Intra-Assay-Variabilität

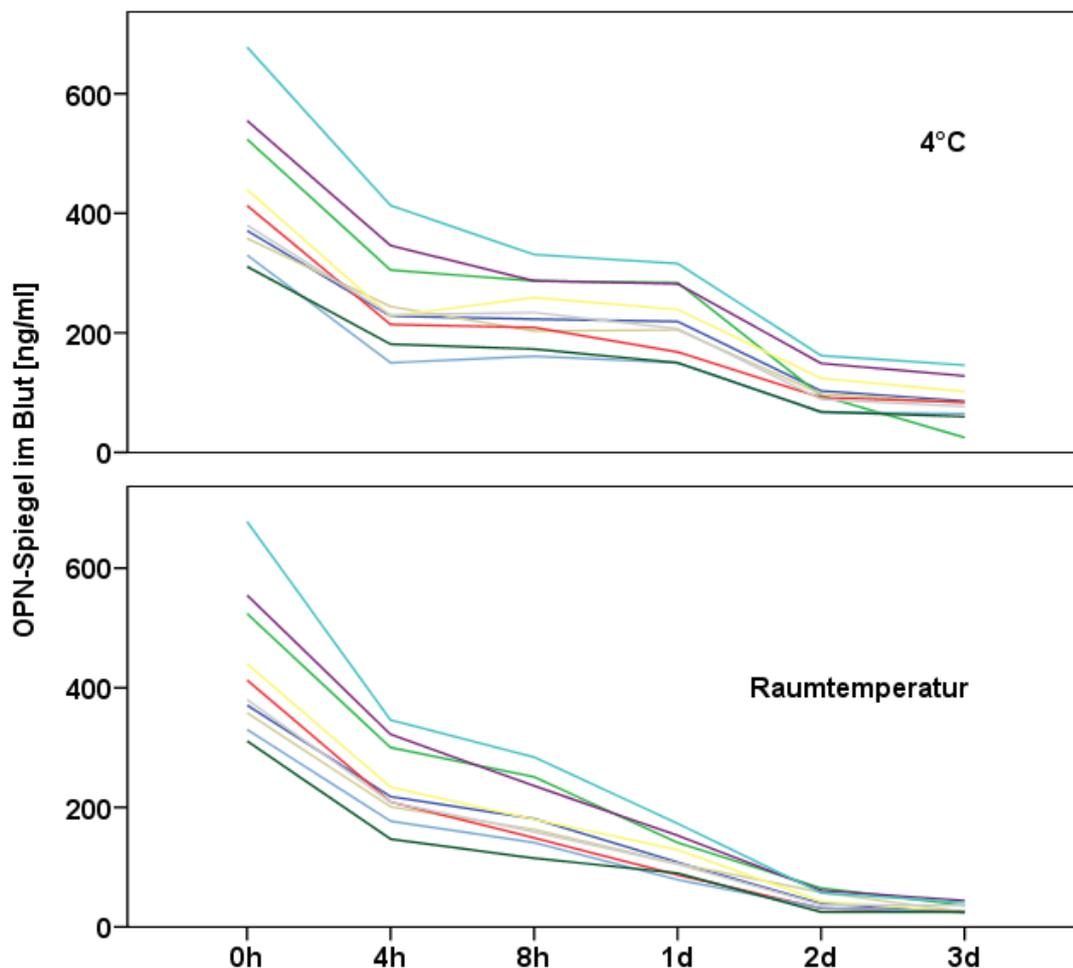
Durch die Bestimmung der Inter- und Intra-Assay-Variabilitäten kann die Zuverlässigkeit der angewandten Messmethode überprüft werden. Als Testprobe wurde ein Gemisch (Pool) aus verschiedenen Standardlösungen verwendet. Die einzelnen Messwerte und die Berechnung sind dem Anhang dieser Arbeit beigefügt (s. Statistisches Rechenblatt: Inter-Assay und Intra-Assay). Der Variationskoeffizient beträgt für den Inter-Assay-Vergleich 10,58% und für den Intra-Assay-Vergleich 3,15%.

3.7 Stabilität und Lagerung der Blutproben für die OPN-Bestimmung

Um den Effekt der Temperatur und Dauer der Lagerung auf den OPN-Wert im Blut zu überprüfen, wurden gleichzeitig mehrere Proben von 10 erwachsenen, freiwilligen Probanden abgenommen und unterschiedlich behandelt: direkte Verarbeitung ohne Lagerung sowie Aufbewahrung für 4h, 8h, 1d, 2d und 3d bei Raumtemperatur oder 4°C. Die unterschiedlich behandelten Proben wurden anschließend nach gleichem Verfahren aliquotiert, direkt bei -80°C eingefroren und unmittelbar vor der Messung aufgetaut.

Bei zunehmender Lagerungsdauer ist OPN im Blut nicht mehr sicher bestimmbar. So kann nach 3 Tagen bei Raumtemperatur in 60% der Proben und bei Kühlung in 10% der Proben kein OPN bestimmt werden. In Abbildung 3.7a ist der Lagerungseffekt auf den OPN-Wert im Blut für die 10 Probanden dargestellt.

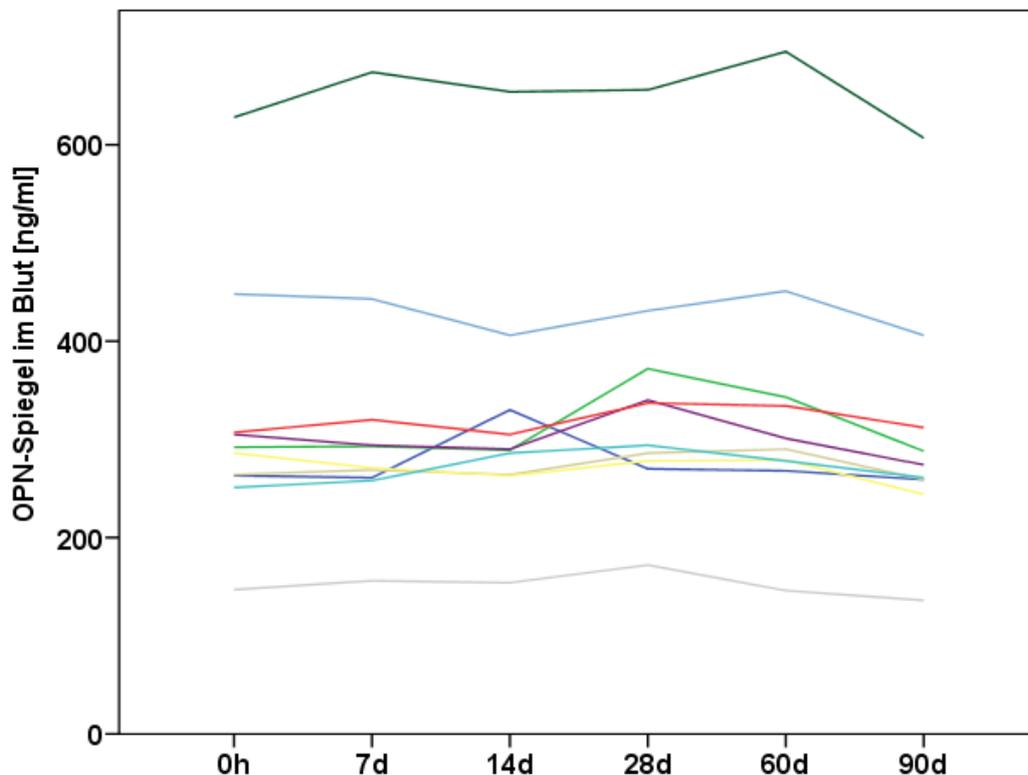
Abbildung 3.7a: OPN-Messwerte in Blut nach Lagerungstemperatur und -dauer



Je länger das Zeitintervall zwischen der Abnahme und der Aliquotierung mit Einfrieren bei -80°C ist, desto niedriger fällt der gemessene OPN-Wert aus. Bereits eine Verzögerung um 4 Stunden führt zu einem mittleren Wertverlust des OPN-Spiegels um 42% in gekühlten Proben bzw. um 46% in Proben bei Raumtemperatur (jeweils $p < 0,005$; Wilcoxon-Test).

Außerdem habe ich den Einfluss der Lagerungsdauer bei -80°C auf die Stabilität des OPN überprüft. Hierzu wurden die Proben nach Abnahme direkt zentrifugiert. Ein Aliquot wurde ohne einzufrieren unmittelbar für die OPN-Bestimmung zum Zeitpunkt 0h herangezogen. Die restlichen Aliquots, welche bei -80°C eingefroren wurden, sind jeweils nach 7d, 14d, 28d, 60d und 90d aufgetaut und gemessen worden. Abbildung 3.7b zeigt die ermittelten OPN-Werte für die 10 Probanden. Der OPN-Spiegel bleibt bei -80°C Lagerung für alle aufgeführten Zeitintervalle bei allen Probanden gleich ($p > 0,06$; Friedman-Test).

Abbildung 3.7b: Verlauf der OPN-Werte in Blutproben von 10 Probanden in Abhängigkeit von der Lagerungsdauer bei -80°C



3.8 Statistik

Die statistische Auswertung des Datenmaterials erfolgte mittels der Statistiksoftware IBM SPSS Statistics Version 20 für Windows [IBM Corporation, Armonk, NY]. Die Schätzung der Fallzahlen basierte auf den bisher veröffentlichten Daten zu Osteopontin-Konzentrationen im Blut bei Kindern und Erwachsenen. Bei einer Gruppengröße von $n=30$ konnte mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit $<5\%$ und $\text{Power}=80\%$ ein Unterschied von mindestens 22-31% im Osteopontin-Blutspiegel zwischen den Altersgruppen erkannt werden (Honsawek S 2011; Al-ayadhi LY 2011; Yu PJ 2009; Mastrangelo G 2011).

Zur deskriptiven Datenanalyse wurden Mittelwerte und Standardabweichung (SD) sowie Mediane mit Minimum und Maximum von allen gemessenen oder errechneten Parametern bestimmt. Die Konzentrationen des OPN wurden in sogenannten Box- und Whiskerdiagrammen graphisch dargestellt. Nach Identifizierung der Ausreißer und Extremwerte wurden diese von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Da nicht von einer Normalverteilung ausgegangen werden konnte, wurden zur statistischen Auswertung nicht-parametrische Tests herangezogen. Kontinuierliche Parameter zwischen den Gruppen wurden mittels Mann-Whitney-U-Test und Kruskal-Wallis-H-Test untersucht.

Zur Beschreibung von Zusammenhängen zwischen kontinuierlichen Variablen wurde als parameterfreier Test der Spearman'sche Rangkorrelationskoeffizient r berechnet. Das Signifikanzniveau wurde $p=0,05$ festgelegt. Bei mehrfachen paarweisen Vergleichen (multiples Testen) wurde das Signifikanzniveau nach Bonferroni korrigiert.

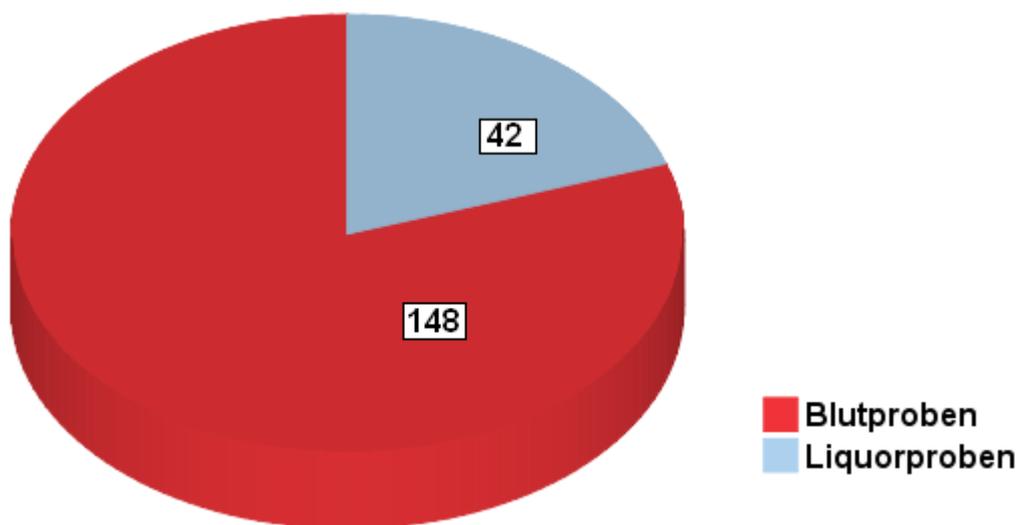
4. Ergebnisse

Zur Bestimmung der OPN-Werte wurden die Blut- und Liquor-Proben von insgesamt 234 Patienten gemessen (Kontroll- und Studienkollektiv). Im Folgenden sollen zunächst die Ergebnisse des Kontrollkollektives dargestellt werden. Im zweiten Abschnitt erfolgt die Analyse des Studienkollektives bestehend aus pädiatrisch-onkologischen Patienten.

4.1 Kontrollkollektiv

Die Messung des OPN-Wertes innerhalb aller Altersklassen diente der Erstellung altersspezifischer Referenzwerte für OPN in Plasma und Liquor. Zur Erhebung der Referenzwerte wurde das Kontrollkollektiv mit 148 Blut- und 42 Liquorproben herangezogen (Abbildung 4.1a).

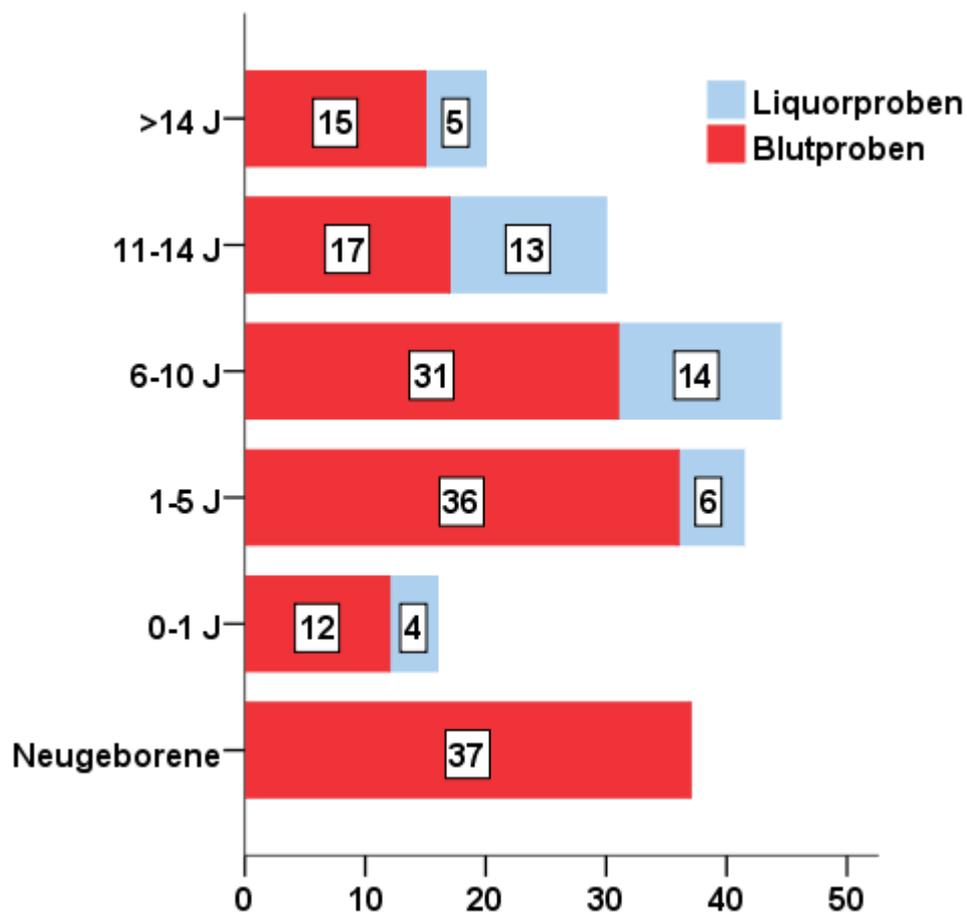
Abbildung 4.1a: Probenverteilung im Kontrollkollektiv



Das Kontrollkollektiv (148 Blutproben) setzt sich hier aus 94 (63,5%) Jungen und 54 (36,5%) Mädchen zusammen. Die 42 Liquorproben des Kontrollkollektives wurden von 23 (54,8%) Jungen und 19 (45,2%) Mädchen aller Altersklassen gewonnen.

Abbildung 4.1b gibt die Verteilung der Blut- und Liquorproben entsprechend der Altersklassen an. In der Gruppe der Neugeborenen liegen ausschließlich Nabelschnurblutproben vor. In allen anderen Altersklassen handelt es sich um peripher venöses Blut und es standen auch Liquorproben für die Analyse zur Verfügung.

4.1b: Verteilung der Blut- und Liquorproben des Kontrollkollektives nach Altersklassen



In der unten stehenden Abbildung 4.1c ist die Verteilung der Blut- und Liquorproben nach vollendeten Lebensjahren der Patienten dargestellt. Das mittlere Patientenalter beträgt $5,6 \pm 5,6$ Jahre (Blut) und $8,8 \pm 4,9$ Jahre (Liquor). Das Alter der Patienten reicht hier von 0 bis 18 (Blut) und 0 bis 16 (Liquor) Jahre. Durch die relativ hohe Anzahl von allein 37 Nabelschnurblutproben in der Gruppe der Neugeborenen sowie weiteren 12 peripher venösen Blutproben aus der Gruppe der 0-1 Jahr alten Säuglinge, ergeben sich für den Zeitpunkt „0 vollendete Jahre“ eine Anzahl von 49 Blutproben.

4.1c: Verteilung der Blutproben nach Altersjahren

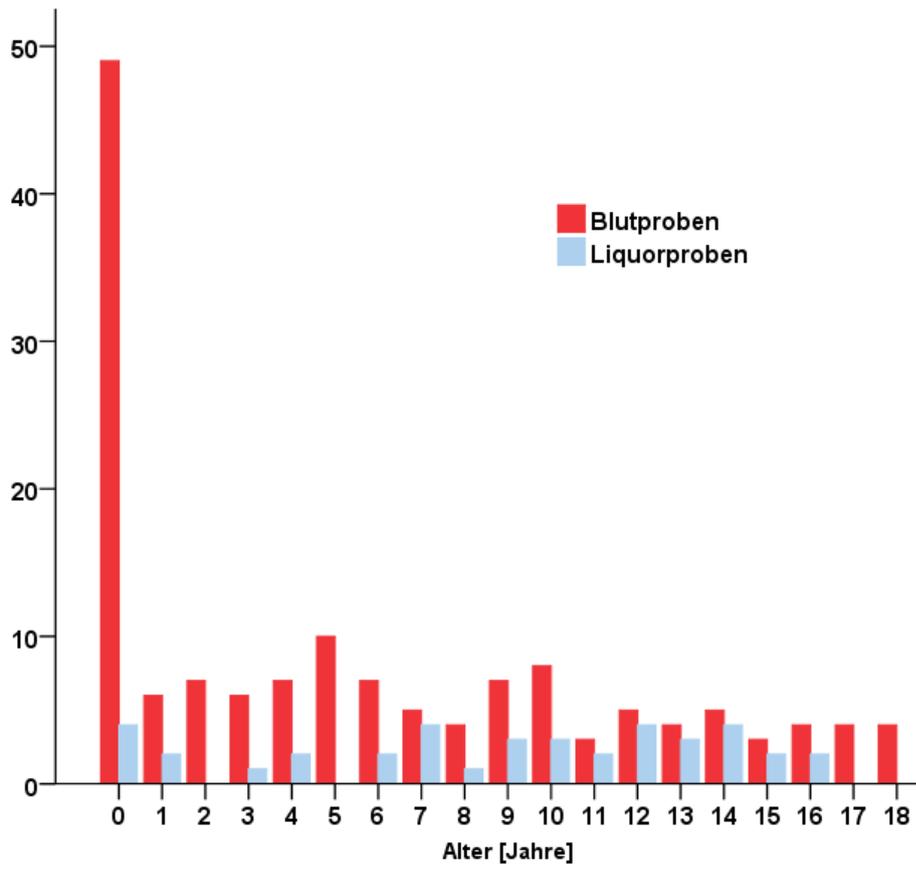


Tabelle 4.1a: Hauptdiagnosen des Kontrollkollektives

Patientenkollektiv	Probe	Hauptdiagnose	Häufigkeit	Prozent		
Neugeborene	Nabelschnurblut	Reifgeborenes	37	100		
		Gesamt	37	100		
Säuglinge, Kinder & Jugendliche	Peripher-venöses Blut	Frühgeborenes	4	3,6		
		Autoimmunerkrankung	7	6,3		
		Infektionserkrankung	36	32,43		
		Nephropathie	1	0,9		
		Stoffwechselstörung	4	3,6		
		Orthopädische Erkrankungen [Coxitis fugax und Frakturen]	4	3,6		
		Elektiver operativer Eingriff	8	7,2		
		Kleinwuchs [Wachstumstestung]	19	17,11		
		Neuropädiatrische Erkrankungen	17	15,31		
		Intoxikation	3	2,7		
		Gerinnungsdefekt	4	3,6		
		Gesund	4	3,6		
		Gesamt	111	100		
		Patientenkollektiv	Probe	Hauptdiagnose	Häufigkeit	Prozent
		Säuglinge, Kinder & Jugendliche	Liquor	Autoimmunerkrankung	4	9,5
Infektionserkrankung	13			31		
Nephropathie	1			2,4		
Coxitis fugax & Gangataxie	1			2,4		
Kleinwuchs [Wachstumstestung]	1			2,4		
Neuropädiatrische Erkrankungen	22			52,4		
Gesamt	42			100		

Tabelle 4.1a gibt einen Überblick über die Hauptdiagnosen und ihren prozentualen Anteil an der Gesamtpopulation der Patienten innerhalb des Kontrollkollektives.

4.1.1 Neugeborene

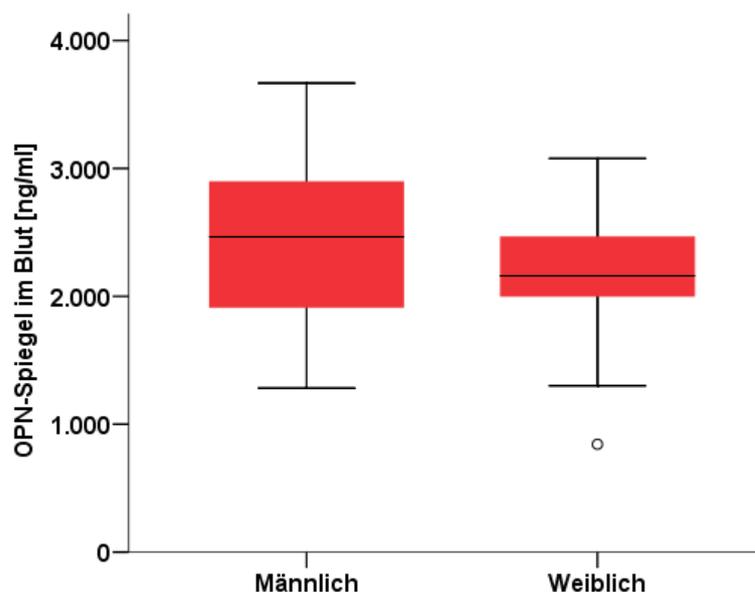
I. Einfluss des Geschlechts auf den OPN-Spiegel im Nabelschnurblut

Für das Neugeborenen-Kollektiv wurde das Nabelschnurblut (NSB) von reifen und gesunden Neugeborenen analysiert. Insgesamt erhielt ich NSB von 24 (65%) männlichen und 13 (35%) weiblichen Neugeborenen. Der mittlere OPN-Spiegel im Nabelschnurblut lag bei 2.236 ± 588 ng/ml und zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen männlichen und weiblichen Kindern ($p=0,137$).

Tabelle 4.1.1a: OPN-Spiegel [ng/ml] im Nabelschnurblut von Neugeborenen

Blut	N	Mittelwert	SD	Median	Minimum	Maximum
Männlich	24	2.443	578	2.463	1.282	3.667
Weiblich	13	2.140	577	2.162	843	3.078
Gesamt	37	2.336	588	2.337	853	3.667

Abbildung 4.1.1a: OPN-Spiegel im Blut bei Neugeborenen



II. Einfluss des Gestationsalters auf den OPN-Spiegel im Nabelschnurblut

Das Gestationsalter der Säuglinge lag zwischen 37 und 41 vollendeten Schwangerschaftswochen. Die Verteilung der Proben ist entsprechend der Gestationswoche in folgender Abbildung 4.1.1b dargestellt.

Abbildung 4.1.1b: Neugeborene nach Gestationsalter

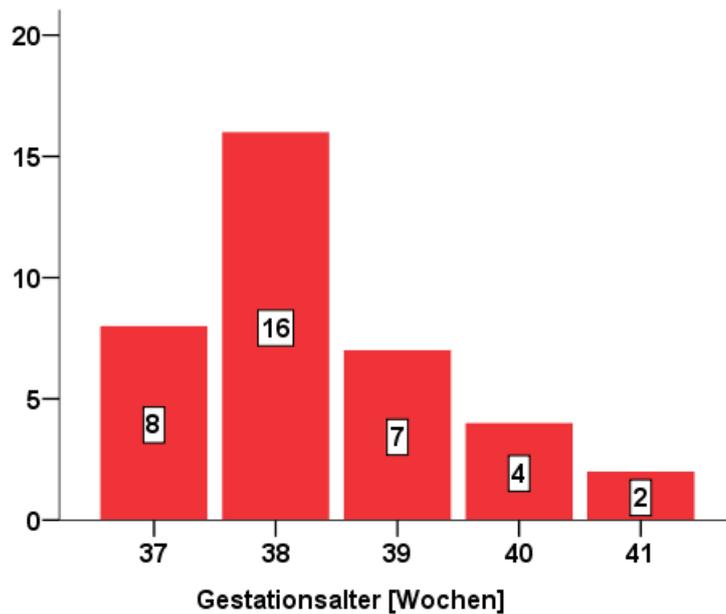
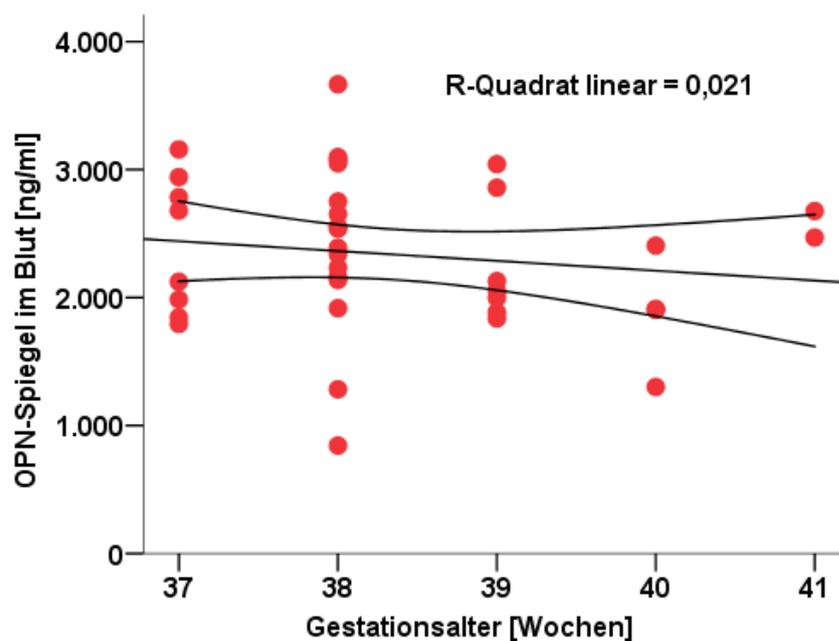


Abbildung 4.1.1c zeigt, dass zwischen dem Gestationsalter und dem OPN-Spiegel im NSB keine signifikante Korrelation festgestellt werden konnte (Spearman $r=-0,171$; $p=0,311$).

Abbildung 4.1.1c: Einfluss des Gestationsalters auf den OPN Wert im Blutplasma



III. Einfluss des Geburtsgewichts auf den OPN-Spiegel im Nabelschnurblut

Das mittlere Geburtsgewicht der Neugeborenen lag bei 3.281 ± 594 g und unterschied sich nicht zwischen den beiden Geschlechtern ($p=0,211$). Ungefähr ein Drittel der Kinder hatte ein für das Gestationsalter zu niedriges (hypotrophes, d.h. Geburtsgewicht unter der 10. Perzentile) oder zu hohes (hypertrophes, d.h. Geburtsgewicht über der 90. Perzentile) Geburtsgewicht. Hierbei beeinflusste die Gewichtsklasse den OPN-Spiegel nicht signifikant ($p=0,417$).

Abbildung 4.1.1d: Verteilung der Neugeborenen entsprechend ihrer Gewichtsklassen

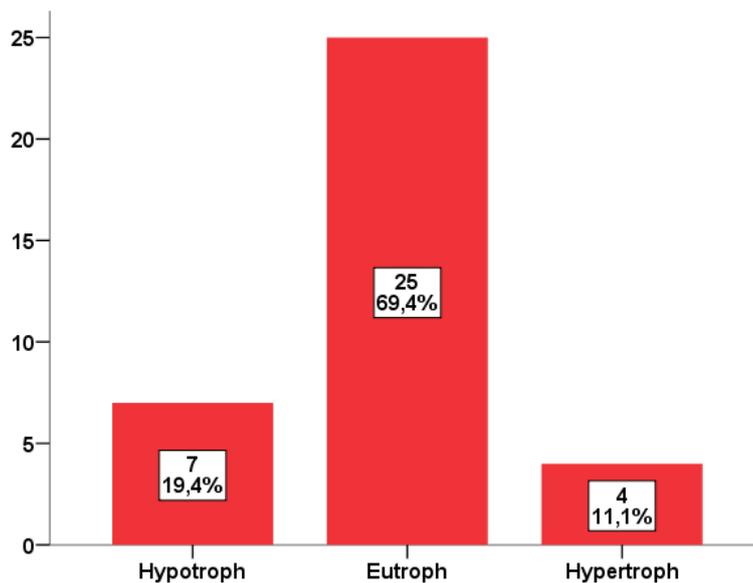
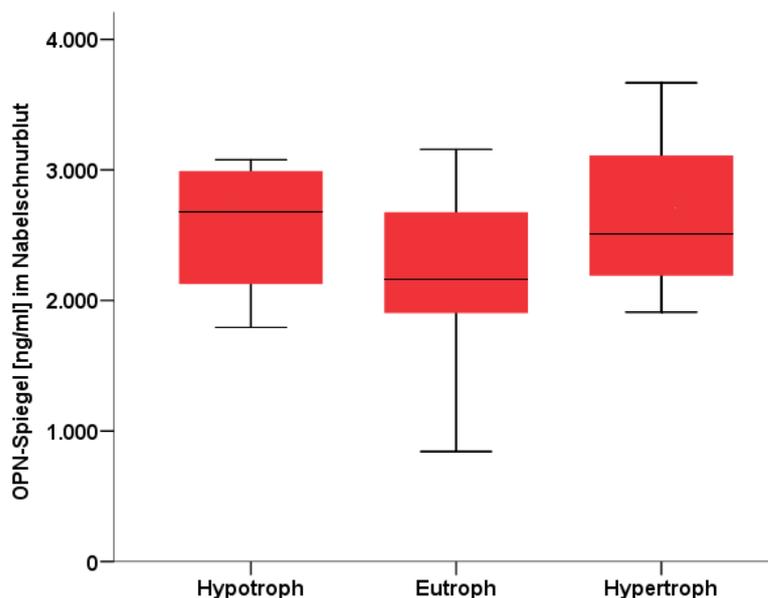
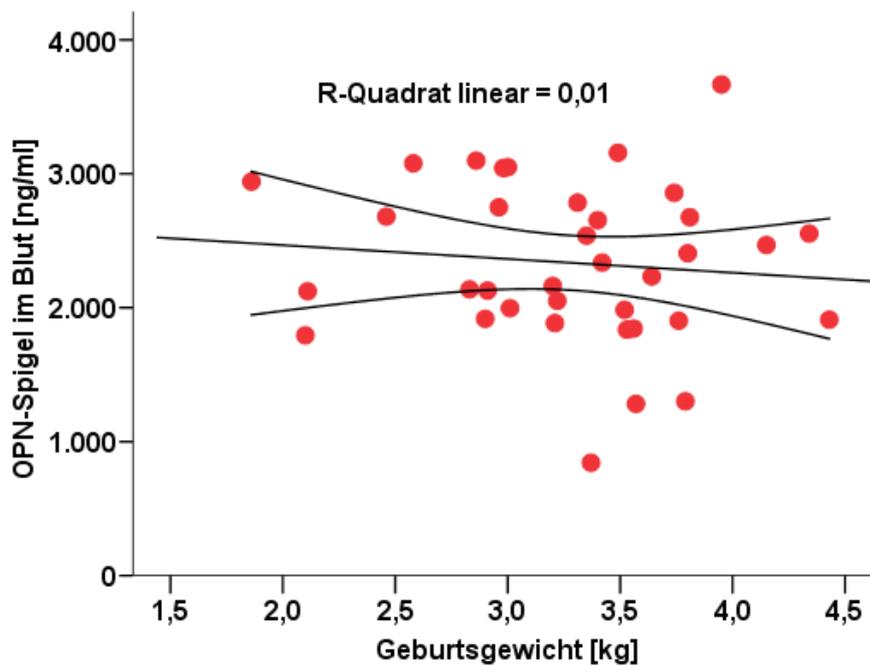


Abbildung 4.1.1e: OPN-Spiegel nach Gewichtsklassen



Auch in der bivariaten Korrelationsanalyse konnte zwischen dem Geburtsgewicht und dem OPN-Spiegel im Nabelschnurblut kein signifikanter Zusammenhang festgestellt werden (Spearman $r=-0,138$; $p=0,423$).

Abbildung 4.1.1f: Einfluss des Geburtsgewichtes auf den OPN-Spiegel im Blut



IV. Einfluss der Wehentätigkeit auf den OPN-Spiegel im Nabelschnurblut

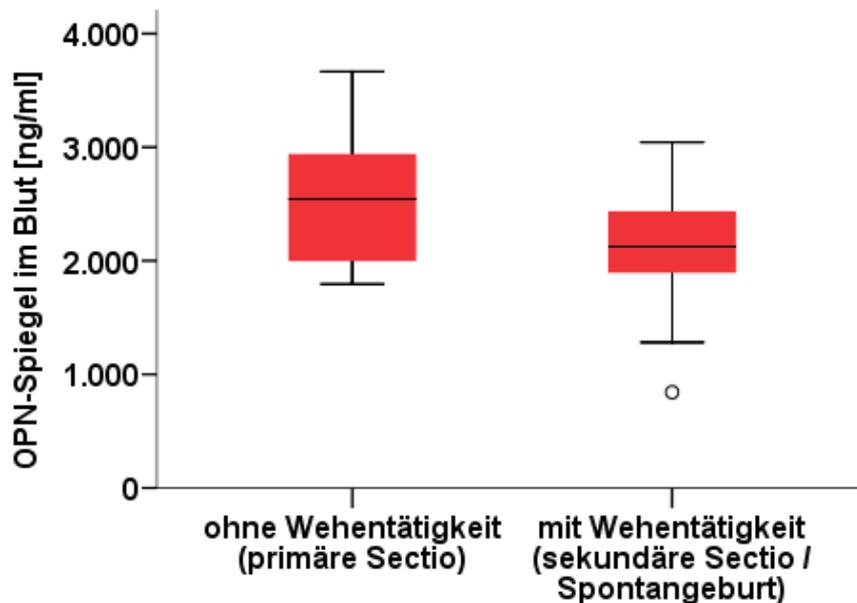
Insgesamt wurden 22 (59%) der Neugeborenen per primäre Sectio, d.h. ohne vorausgegangene Wehentätigkeit, entbunden. Die restlichen Kinder kamen per Spontangeburt und sekundäre Sectio, d.h. mit vorangegangener Wehentätigkeit, zur Welt. In Tabelle 4.1.1b sind Indikationen für die Kaiserschnittentbindung aufgeführt.

Tabelle 4.1.1b: Geburtsmodus und Indikationen für die Sectio-Entbindungen

Wehentätigkeit	Geburtsmodus	Indikation	Häufigkeit	Prozent
Nein	Primäre Sectio	Wunschsectio	2	9,1
		Re-Sectio	4	18,2
		Mütterliche Erkrankung	4	18,2
		Fetale Depression	1	4,5
		Mehrlinge	4	18,2
		Beckenendlage	7	31,8
		Gesamt	22	100
Ja	Sekundäre Sectio	Geburtsstillstand	7	46,7
	Spontangeburt		8	53,3
	Gesamt	15	100	

Der OPN-Spiegel im Nabelschnurblut unterschied sich nicht zwischen den Gruppen mit und ohne Wehentätigkeit ($p=0,075$). In Abbildung 4.1.1g sind die Boxplot Analysen der OPN-Werte entsprechend des Geburtsmodus dargestellt.

Abbildung 4.1.1g: Vergleich der OPN-Spiegel im Nabelschnurblut nach Wehentätigkeit (primäre Sectio vs. sekundäre Sectio und Spontangeburt)



V. Einfluss von Nabelschnur-pH und APGAR auf den OPN-Spiegel

Alle untersuchten Neugeborenen zeigten hinsichtlich der APGAR-Punkte und des Nabelschnur-pH keine pathologischen Befunde. Der Nabelschnur-pH lag stets über 7,10 und die APGAR-Werte über 7 (siehe Tabelle 4.1.1c).

Tabelle 4.1.1c: Nabelschnur-pH und APGAR-Werte

	Nabelschnur-pH	APGAR 1	APGAR 5	APGAR 10
N	37	37	37	37
Median	7,29	9	10	10
Minimum	7,17	7	7	9
Maximum	7,40	9	10	10

Der OPN-Nabelschnurblutspiegel zeigte weder mit dem Nabelschnur-pH (Spearman $r=0,179$; $p=0,297$), noch für die einzelnen APGAR-Werte eine signifikante Korrelation (Spearman $r=-0,146$ bis 0 ; $p=0,999$ bis $0,404$).

Zusammenfassend konnte in dem Kollektiv aus reifen, gesunden Neugeborenen nach unkomplizierter Schwangerschaft festgestellt werden, dass perinatale Variablen wie Geschlecht, Geburtsgewicht (bzw. Hypotrophie oder Hypertrophie), Gestationsalter, Geburtsmodus wie auch Nabelschnur-pH und APGAR-Score keinen Einfluss auf den OPN-Spiegel im Nabelschnurblut haben.

4.1.2 Säuglinge, Kinder und Jugendliche

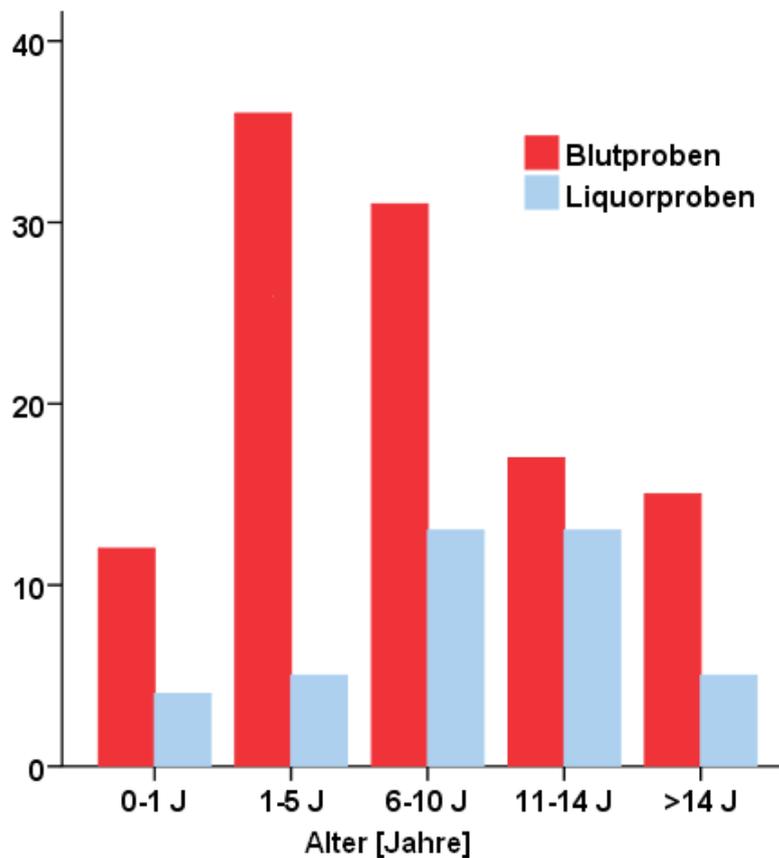
Die Mehrzahl der Proben für das Kontrollkollektiv stammt von Patienten ($n=151$) aus der Klinik für Allgemeine Pädiatrie. Hierbei handelt es sich um Säuglinge, Kinder und Jugendliche. Im Folgenden werden die Ergebnisse aus dieser Untergruppe dargestellt.

I. Einfluss des Alters auf den OPN-Spiegel im Blut und Liquor

Insgesamt konnten 111 Blutproben und 42 Liquorproben von Jungen und Mädchen aller Altersklassen gesammelt werden. Die meisten Blutproben wurden bei Kindern aus der Altersgruppe der 1-5 und 6-10 Jährigen entnommen.

Bei den Liquorproben wurden die Mehrzahl der Proben von Kindern aus der Gruppe der 6-10 und 11-14 Jährigen gesammelt (siehe Abbildung 4.1.2a).

Abbildung 4.1.2a: Verteilung der Blut- und Liquorproben nach Altersklassen



In den folgenden Streudiagrammen ist der Zusammenhang zwischen dem Alter und dem OPN-Spiegel im Blut und Liquor abgebildet (siehe Abbildung 4.1.2b und 4.1.2c). Mit zunehmendem Alter nimmt der OPN-Wert im Blut signifikant ab (Spearman $r=0,620$; $p<0,001$). Im Liquor hingegen beobachtet man einen Anstieg des OPN-Spiegels mit zunehmendem Alter (Spearman $r=0,204$; $p=0,202$). Jedoch ist diese positive Korrelation nicht signifikant.

Abbildung 4.1.2b: Zusammenhang zwischen OPN-Spiegel im Blut nach Alter

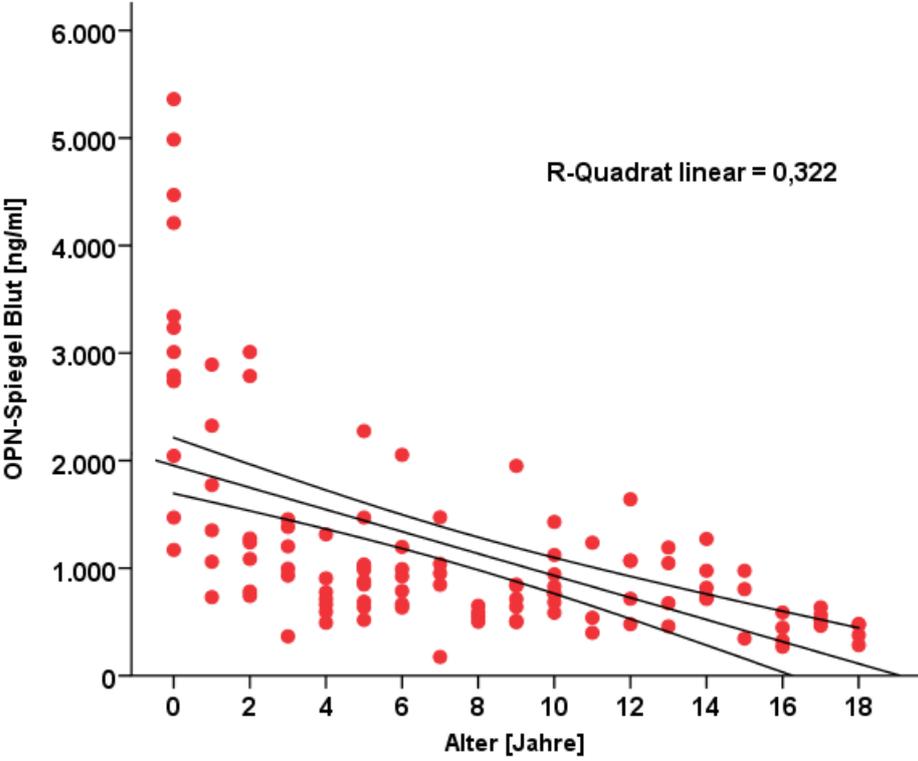
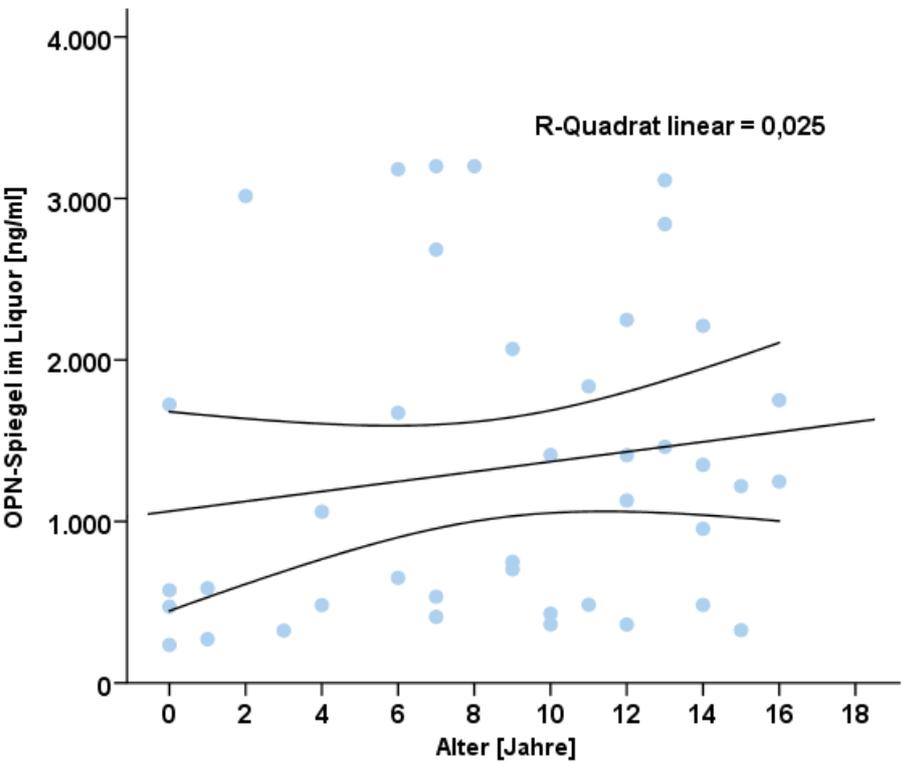


Abbildung 4.1.2c: Zusammenhang zwischen OPN-Spiegel im Liquor nach Alter



Für die definierten Altersklassen ergeben sich folgende OPN-Spiegel im Blut und Liquor:

Tabelle 4.1.2a: Mittelwerte, Standardabweichung (SD), Median, Minimum und Maximum der OPN-Spiegel [ng/ml] in Blutplasma und Liquor entsprechend der Altersklassen im Studienkollektiv

Säuglinge 0-1 Jahre

Blut	N	Mittelwert	SD	Median	Minimum	Maximum	p#
Männlich	8	3.158	930	3.122	1.470	4.470	
Weiblich	4	3.390	2.095	3.515	1.170	5.361	
Gesamt	12	3.235	1.327	3.122	1.170	5.361	0,865
Liquor	N	Mittelwert	SD	Median	Minimum	Maximum	p#
Männlich	3	427	174	472	235	574	
Weiblich	1	-	-	-	1.724	1.724	
Gesamt	4	751	664	523	235	1.724	0,180

Kinder 1-5 Jahre

Blut	N	Mittelwert	SD	Median	Minimum	Maximum	p#
Männlich	22	1.195	816	889	366	3.010	
Weiblich	14	1.207	403	1.144	741	2.324	
Gesamt	36	1.200	678	1.004	366	3.010	0,119
Liquor	N	Mittelwert	SD	Median	Minimum	Maximum	p#
Männlich	4	1.246	1.218	823	324	3.015	
Weiblich	2	377	149	377	271	482	
Gesamt	6	956	1.047	534	271	3.015	0,165

Kinder 6-10 Jahre

Blut	N	Mittelwert	SD	Median	Minimum	Maximum	p#
Männlich	25	833	343	788	174	1.950	
Weiblich	6	1.053	609	853	498	2.053	
Gesamt	31	875	405	788	174	2.053	0,689
Liquor	N	Mittelwert	SD	Median	Minimum	Maximum	p#
Männlich	8	1.401	1.060	1.081	409	3.200	
Weiblich	6	1.675	1.320	1.386	363	3.200	
Gesamt	14	1.518	1.138	1.081	363	3.200	0,846

Jugendliche 11-14 Jahre

Blut	N	Mittelwert	SD	Median	Minimum	Maximum	p#
Männlich	9	709	274	715	399	1.191	
Weiblich	8	1.081	313	1.069	674	1.640	
Gesamt	17	884	342	818	399	1.640	0,034*
Liquor	N	Mittelwert	SD	Median	Minimum	Maximum	p#
Männlich	7	1.933	837	1.836	954	3.113	
Weiblich	6	1.059	738	917	361	2.211	
Gesamt	13	1.529	885	1.410	361	3.113	0,086

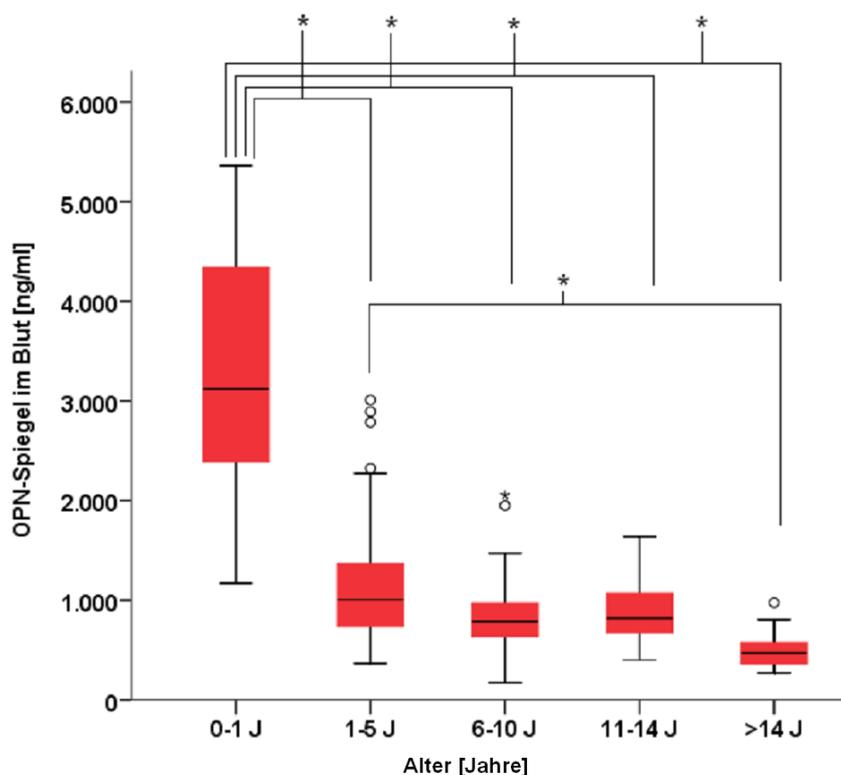
Jugendliche >14 Jahre

Blut	N	Mittelwert	SD	Median	Minimum	Maximum	p#
Männlich	6	628	229	575	327	975	
Weiblich	9	419	114	447	269	635	
Gesamt	15	503	193	474	269	975	0,045*
Liquor	N	Mittelwert	SD	Median	Minimum	Maximum	p#
Männlich	1	-	-	-	1.219	1.219	
Weiblich	4	1.187	610	1.335	327	1.751	
Gesamt	5	1.193	529	1.247	327	1.751	0,480

#Vergleich der OPN-Spiegel zwischen männlichen und weiblichen Kindern jeweils für Blut und Liquor getrennt (Mann-Whitney-U Test). * signifikant für $p < 0,05$

In der Abbildung 4.1.2.d sind die Boxplots der OPN-Spiegel im Blut gegenüber den Altersklassen sowie die Ergebnisse der univariaten Varianzanalyse (ANOVA) und post-hoc Analyse nach Bonferroni dargestellt. Die zuvor beobachtete Assoziation des OPN-Blutspiegels und dem Alter wird bestätigt. Zwischen den 5 Altersklassen unterscheidet sich der OPN-Spiegel hoch signifikant ($p < 0,001$). Hierbei sind die OPN-Werte in der Gruppe der 0-1 jährigen Kindern höher als im Vergleich zu den anderen Altersgruppen ($p < 0,001$). Ein weiterer signifikanter Unterschied findet sich zwischen der Gruppe der 1-5 und >14 Jährigen ($p < 0,005$).

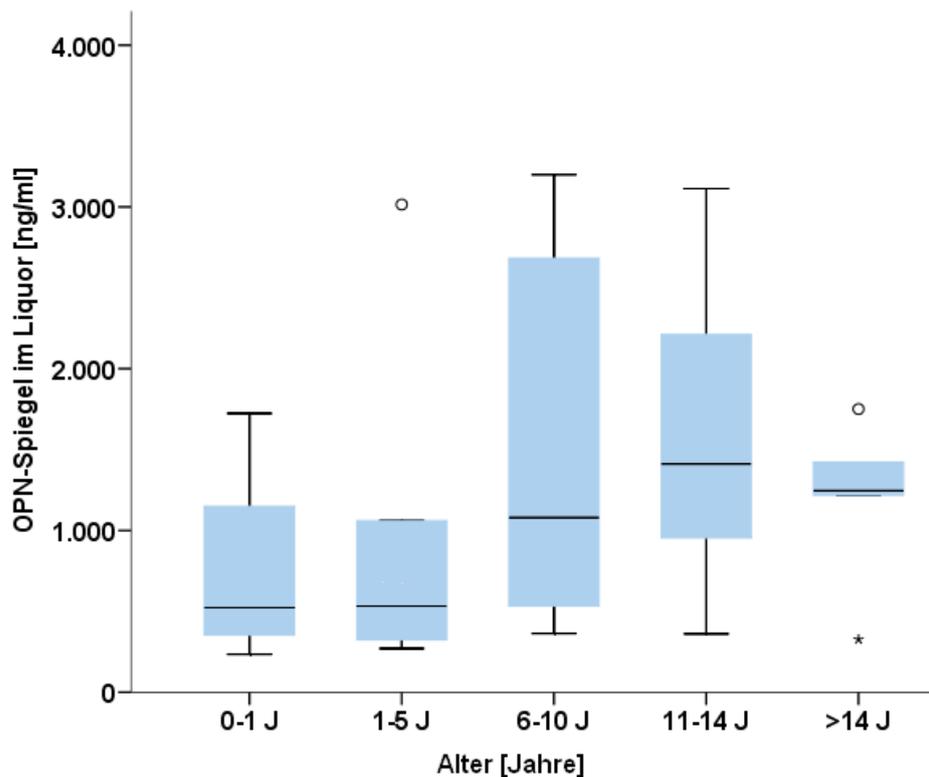
Abbildung 4.1.2d: OPN-Spiegel im Blut entsprechend der Altersklassen



*ANOVA $p < 0,001$ nach post-hoc Analyse (Bonferroni)

Für den OPN-Spiegel im Liquor findet sich keine Abhängigkeit mit den untersuchten Altersklassen (ANOVA $p=0,480$). Die Spiegel zeigen einen zunehmenden Trend mit dem Alter (siehe Abbildung 4.1.2e).

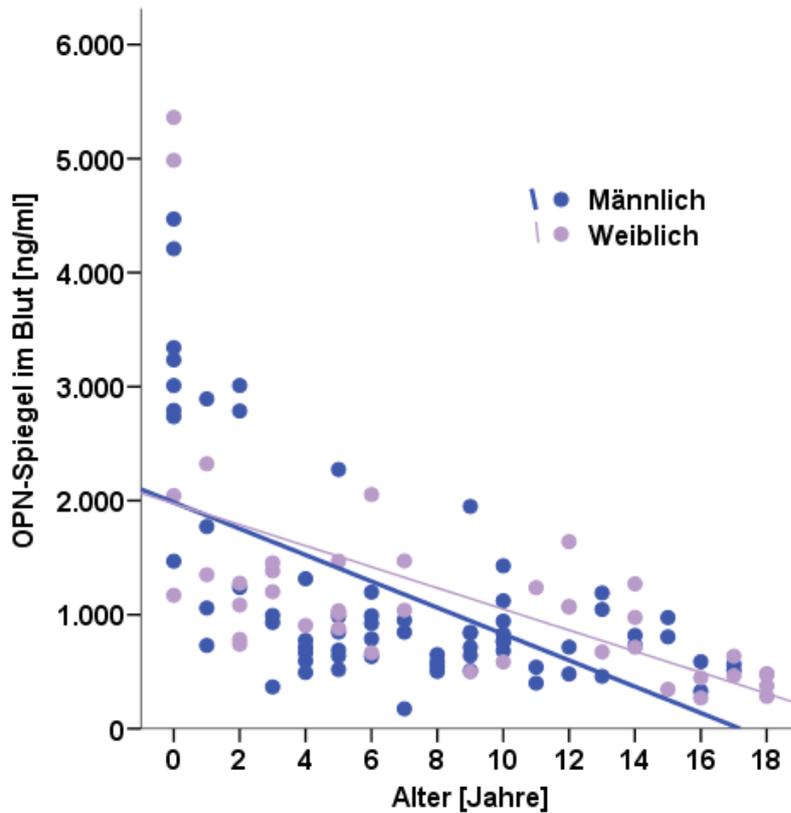
Abbildung 4.1.2e: OPN-Spiegel im Liquor entsprechend der Altersklassen



II. Einfluss des Geschlechts auf den OPN-Spiegel im Blut und Liquor

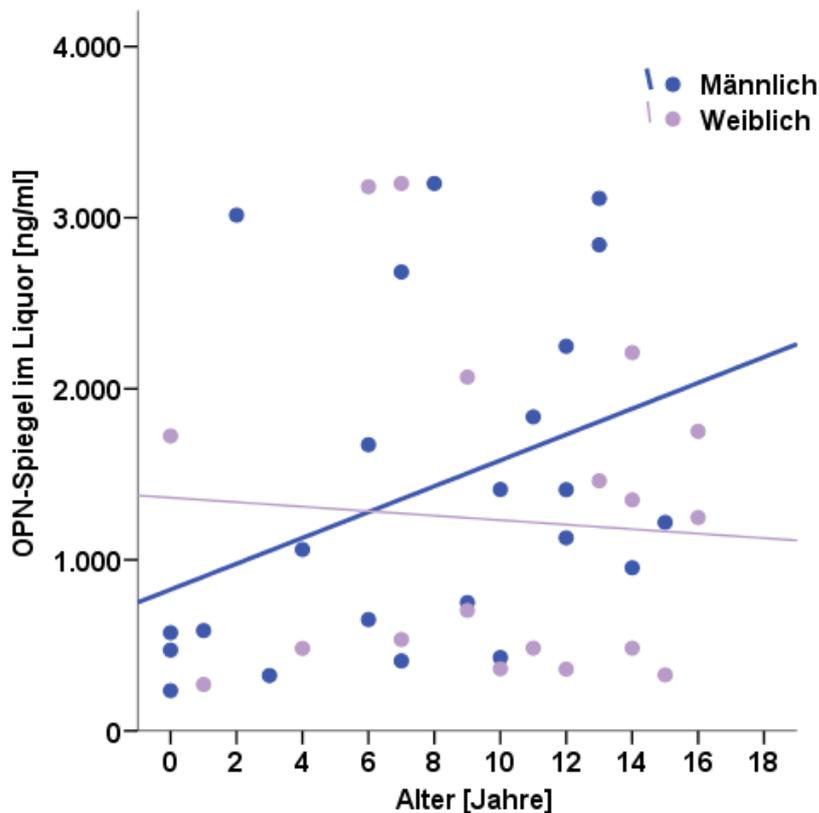
Im Streudiagramm zeigt das Geschlecht weder im Blut noch im Liquor einen signifikanten Einfluss auf den gemessenen OPN-Spiegel (siehe Abbildung 4.1.2f). Der OPN-Blutspiegel nimmt unabhängig vom Geschlecht mit zunehmenden Alter ab (partielle Korrelation $r=-0,574$; $p<0,001$).

Abbildung 4.1.2f: Zusammenhang zwischen OPN-Spiegel im Blut und Alter für Mädchen und Jungen



Im Streudiagramm beobachtet man einen Anstieg des OPN-Spiegels im Liquor für männliche Kinder. Mittels einer partiellen Korrelationsanalyse mit Geschlecht als Kontrollvariable findet sich, wie zuvor festgestellt, keine signifikante Abhängigkeit des OPN-Spiegels vom Alter ($r=0,184$; $p=0,257$). Der Vergleich des OPN-Spiegels zwischen Jungen und Mädchen innerhalb der einzelnen Altersgruppen zeigt einen niedrig signifikanten Unterschied für die Blutwerte in der Gruppe der 11-14 ($p=0,034$) und >14 Jahre ($p=0,045$) alten Kinder (siehe Tabellen 4.1.2a).

Abbildung 4.1.2g: Zusammenhang zwischen OPN-Spiegel im Liquor und Alter für Mädchen und Jungen



III. Einfluss der Infektion auf den OPN-Spiegel im Blut und Liquor

Kinder mit schweren Infektionen, wie einer Sepsis oder Meningitis wurden von vornherein ausgeschlossen. Kinder mit Fieber > 38,5 °C wurden ebenfalls nicht eingeschlossen. Die von uns unter der Diagnose „Infektion“ eingeschlossenen Patienten wiesen folgende klinisch-anamnestische und laborchemische Parameter einer akuten Infektion auf: erhöhtes CRP, Leukozytose, positiver Keimnachweis oder subfebrile Temperaturen zwischen 38-38,5°C während des stationären Aufenthaltes. Wie in Tabelle 4.1a aufgeführt, stellen Infektionserkrankungen die führende Diagnose mit 36 (32,4%) Blutproben dar. Bei den Liquorproben führen mit 22 (52,4%) Fällen die neuropädiatrischen Erkrankungen, gefolgt von 13 (31%) Fällen mit Infektionserkrankungen. Fünf weitere Kinder mit den oben aufgeführten Infektionszeichen, die unter anderen Hauptdiagnosen aufgeführt sind, werden im Weiteren gemeinsam mit den 36 Infektfällen analysiert. Bei den Liquorproben erhöht sich die Zahl der Proben mit Infektion um 1 auf 14.

Die Verteilung der Fälle entsprechend der Altersklassen können aus den Abbildungen 4.1.2h für Blutproben und 4.1.2i für Liquorproben entnommen werden.

Abbildung 4.1.2h: Verteilung der Blutproben nach Altersklasse in Abhängigkeit einer Infektion

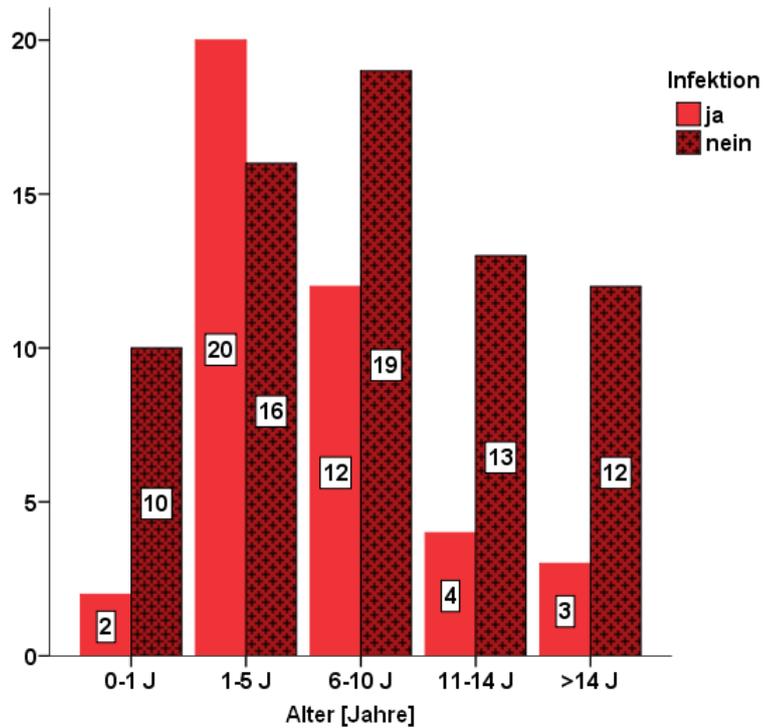
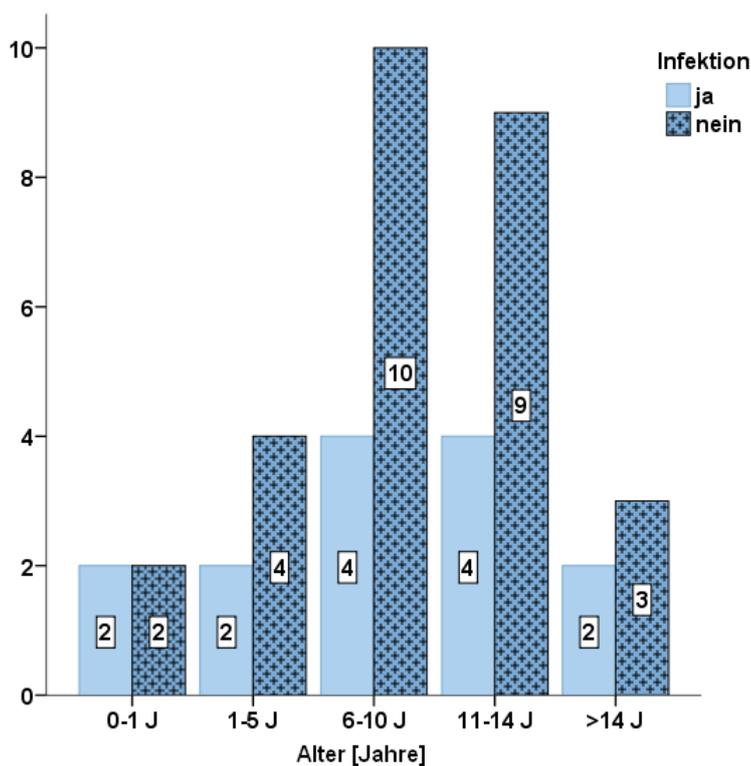


Abbildung 4.1.2i: Verteilung der Liquorproben nach Altersklasse in Abhängigkeit einer Infektion



Der OPN-Spiegel im Blut und Liquor zeigt keinen Unterschied zwischen den Kindern mit und ohne Infektion innerhalb der untersuchten Altersklassen (vgl. 4.1.2j und 4.1.2k).

Abbildung 4.1.2j: OPN-Spiegel im Blut bei Kindern mit und ohne Infektion entsprechend der Altersklassen

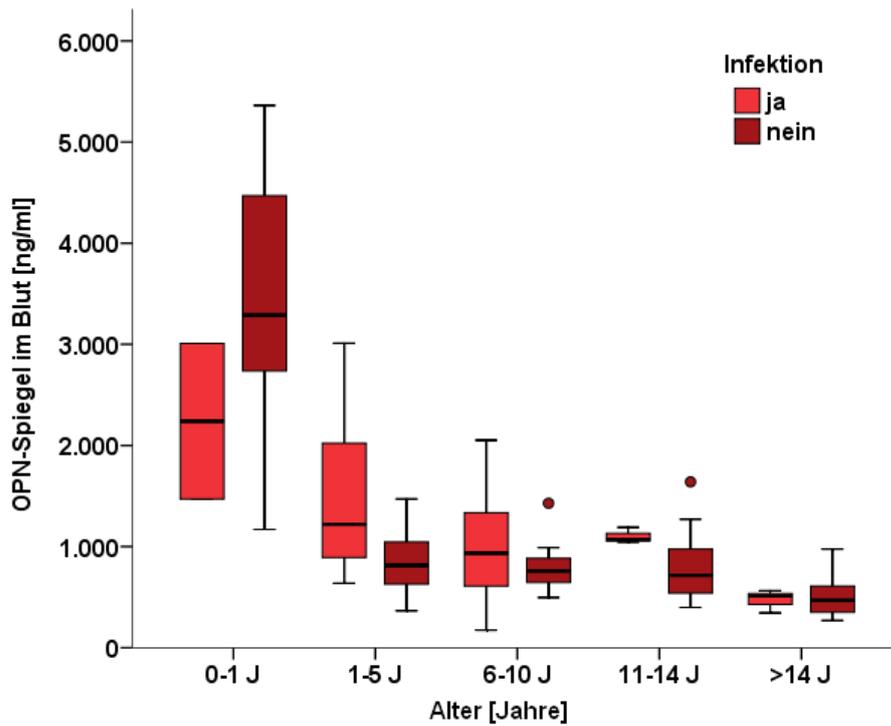
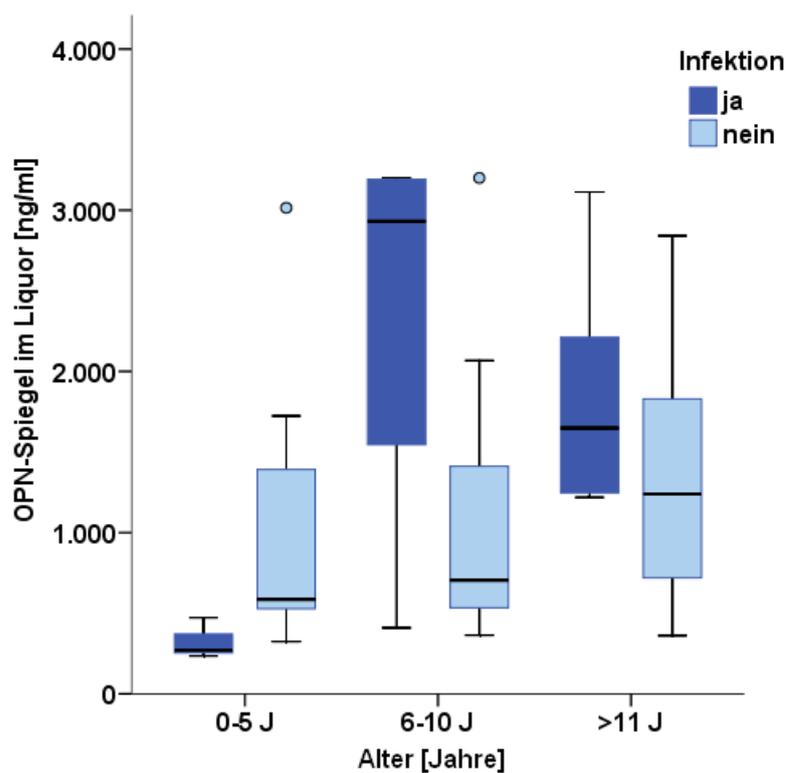


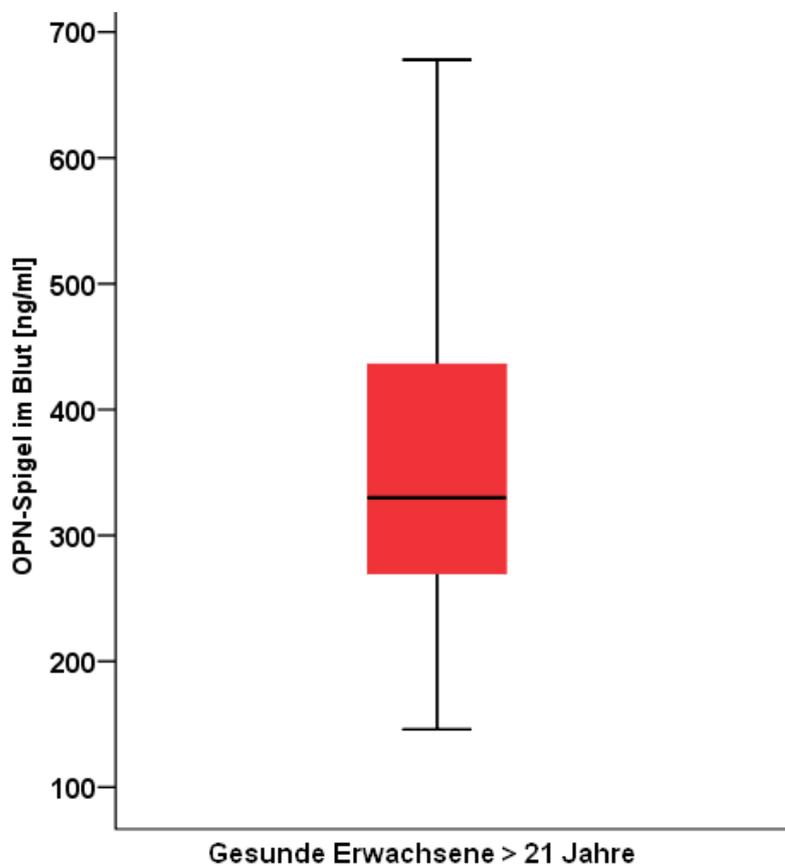
Abbildung 4.1.2k: OPN-Spiegel im Liquor bei Kindern mit und ohne Infektion entsprechend der Altersklassen



4.1.3 Erwachsene

Im Rahmen der Proben-Akquirierung wurden ebenfalls zum Vergleich Blutproben von 19 gesunden erwachsenen Probanden abgenommen. Diese dienen der internen Qualitätskontrolle und zum Vergleich der aus der Literatur bekannten Daten zu OPN-Spiegel in Blutplasma bei gesunden Erwachsenen.

Abbildung 4.1.3a: Mittlerer OPN-Spiegel im Blut bei gesunden Erwachsenen.



Wie in Abbildung 4.1.3a zu sehen, liegt der OPN- Spiegel im Blutplasma bei Erwachsenen bei 330 ng/ml (Minimum 146 und Maximum 678 ng/ml).

4.1.4 Zusammenfassung Kontrollkollektiv

In Abbildung 4.1.4a werden die OPN-Spiegel der einzelnen pädiatrischen Gruppen zusammen mit der Gruppe der gesunden Erwachsenen dargestellt. Basierend auf den dargestellten Ergebnissen konnte ich 5 Altersgruppen festlegen, bei denen sich der mittlere OPN-Wert signifikant von der jeweils anderen Altersgruppe unterscheidet ($p < 0,001$).

Abbildung 4.1.4a: OPN-Spiegel im Blut bei Erwachsenen im Vergleich zur Kontrollgruppe des pädiatrischen Kollektives

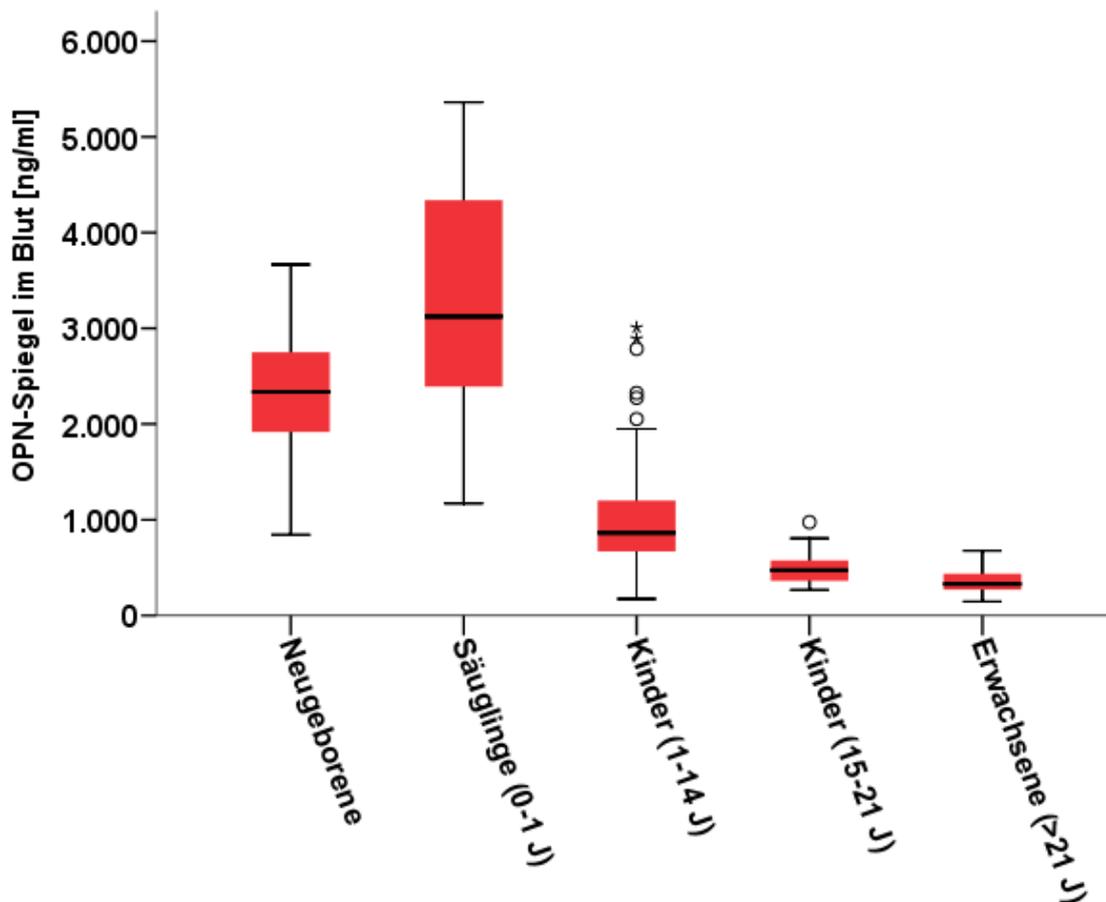


Tabelle 4.1.4a und 4.1.4b sind die von mir auf Basis des in dieser Arbeit untersuchten Kontrollkollektives aufgestellten Referenzwerte für OPN in Blut und Liquor in Übersicht zusammengefasst.

Tabelle 4.1.4a: Referenzwerte für OPN in Blut [ng/ml]

Altersgruppen	n	5. Perzentile	Median	95. Perzentile
Neugeborene (Nabelschnurblut)	37	1.238	2.337	3.208
Säuglinge (0-12 Monate)	12	1.170	3.122	5.249
Kinder (1-14 J)	84	464	863	2.312
Jugendliche / junge Erwachsene (15-21 J)	15	269	474	873
Erwachsene (>21 J)	19	146	330	666

Tabelle 4.1.4b: Referenzwerte für OPN in Liquor [ng/ml]

Altersgruppen	n	5. Perzentile	Median	95. Perzentile
Säuglinge, Kinder, Jugendliche	42	279	1.174	3.197

4.2 Studienkollektiv

Das Studienkollektiv setzt sich aus 46 Kindern und Jugendlichen verschiedenster Altersklassen mit malignen Erkrankungen zusammen. Insgesamt wurden 33 Blut- und 23 Liquorproben gesammelt. Bei 10 Kindern konnten Blut- und Liquorproben gleichzeitig abgenommen werden (siehe Abbildung 4.2a).

Abbildung 4.2a: Probenverteilung im Studienkollektiv

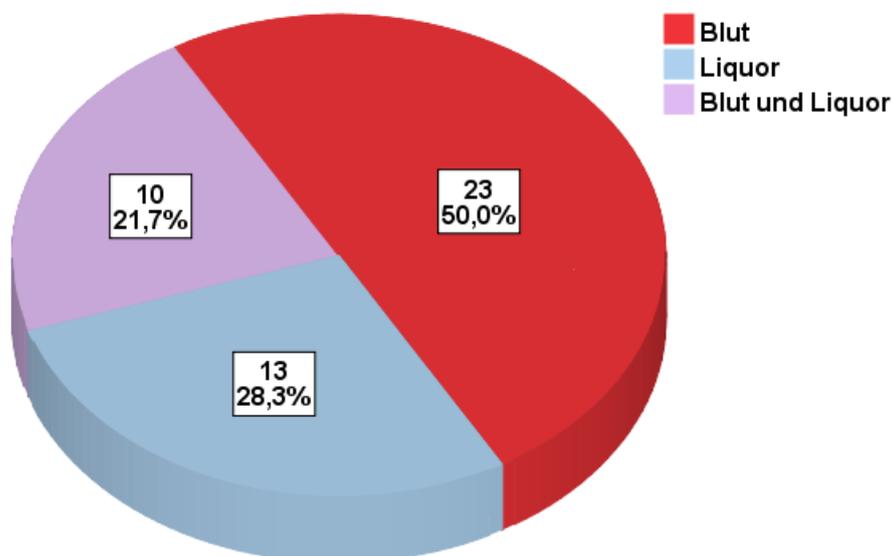


Abbildung 4.2b: Verteilung der Blutproben nach Alter

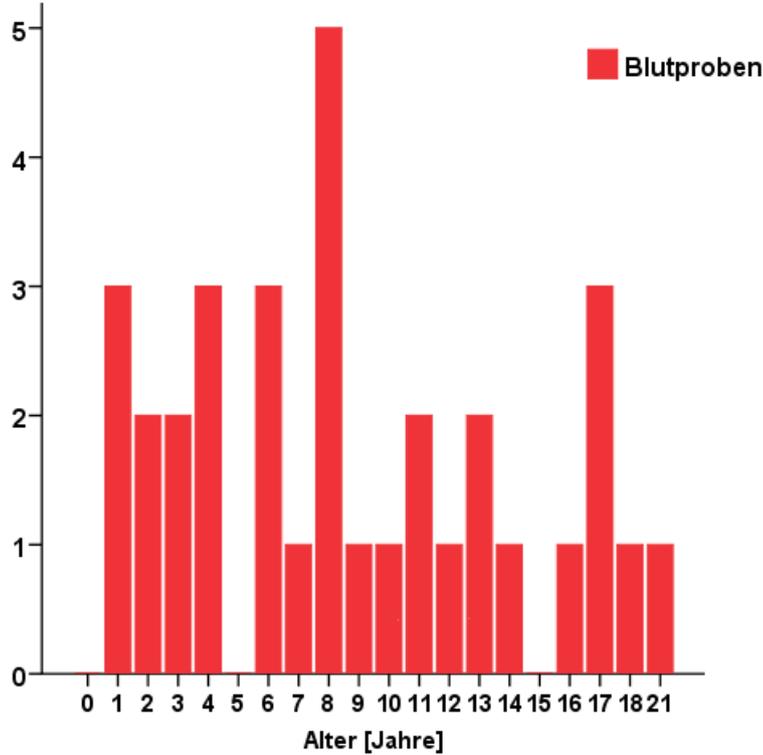
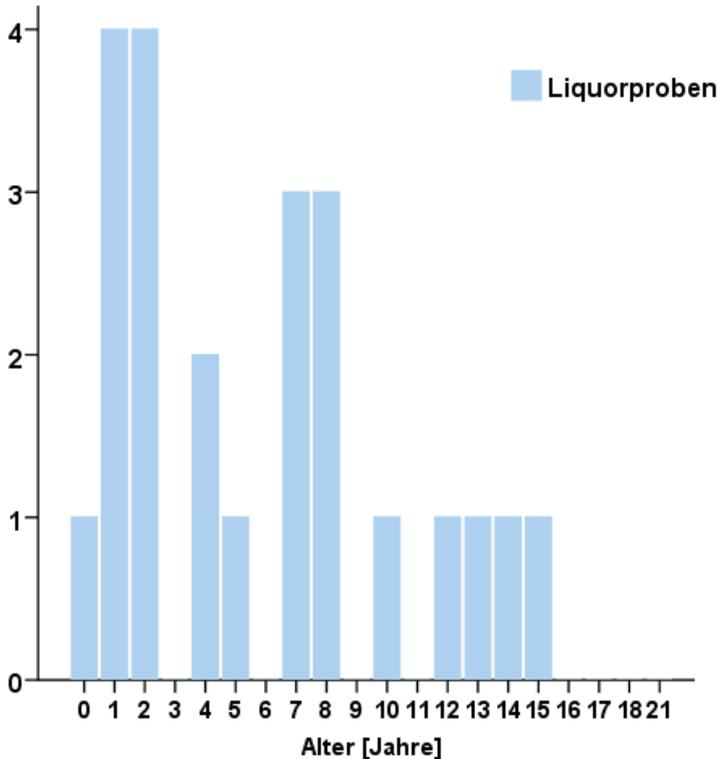


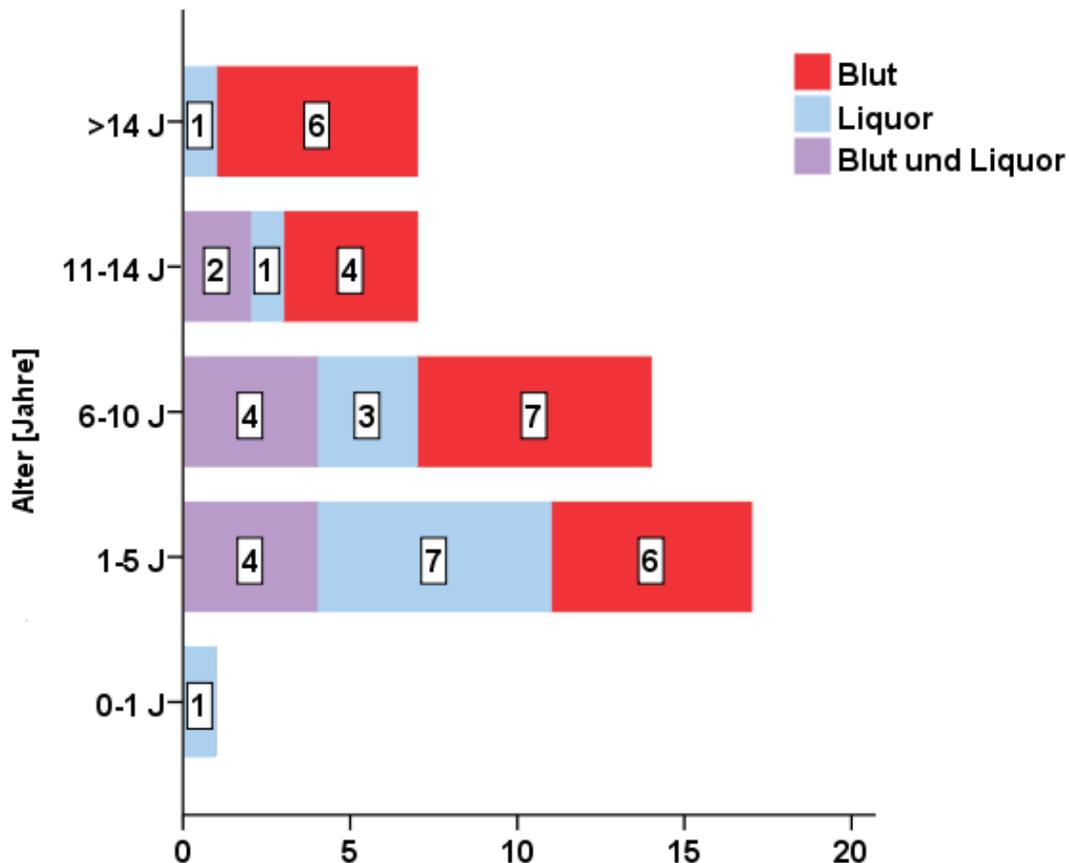
Abbildung 4.2c: Verteilung der Liquorproben nach Alter



4.2.1 Einfluss des Alters auf den OPN-Spiegel im Blut und Liquor

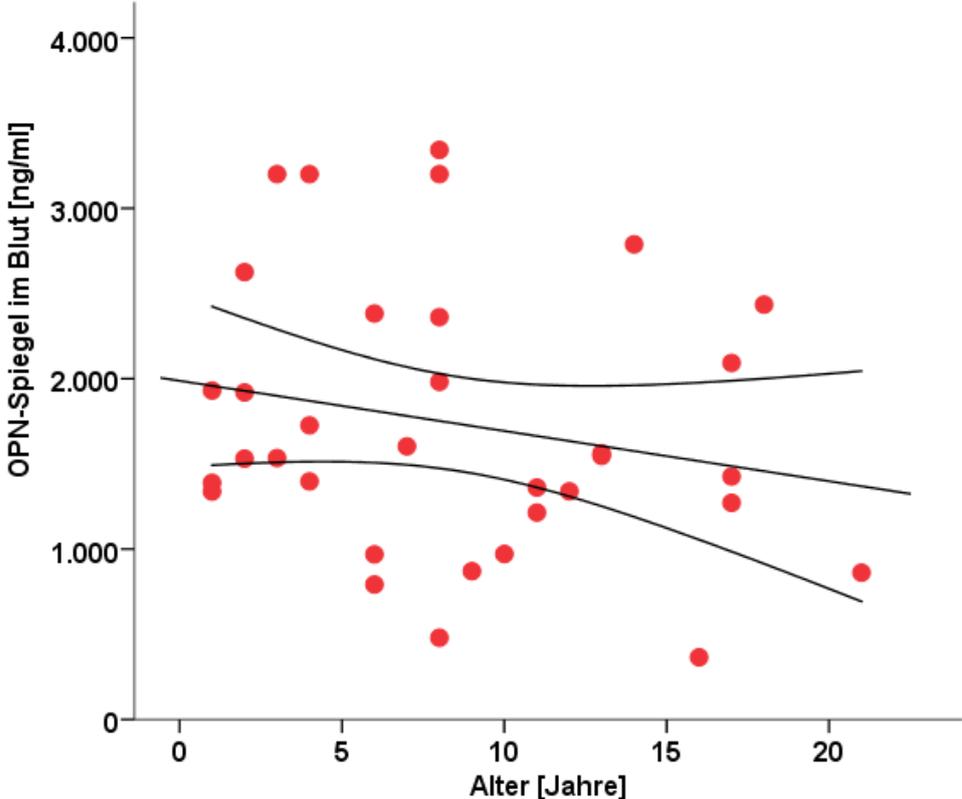
In der pädiatrischen Onkologie wurden die meisten Proben von Kindern aus der Altersgruppe der 1-5 und 6-10 Jährigen entnommen (siehe Abbildung 4.2.1a).

Abbildung 4.2.1a: Verteilung der Blut- und Liquorproben nach Altersklassen

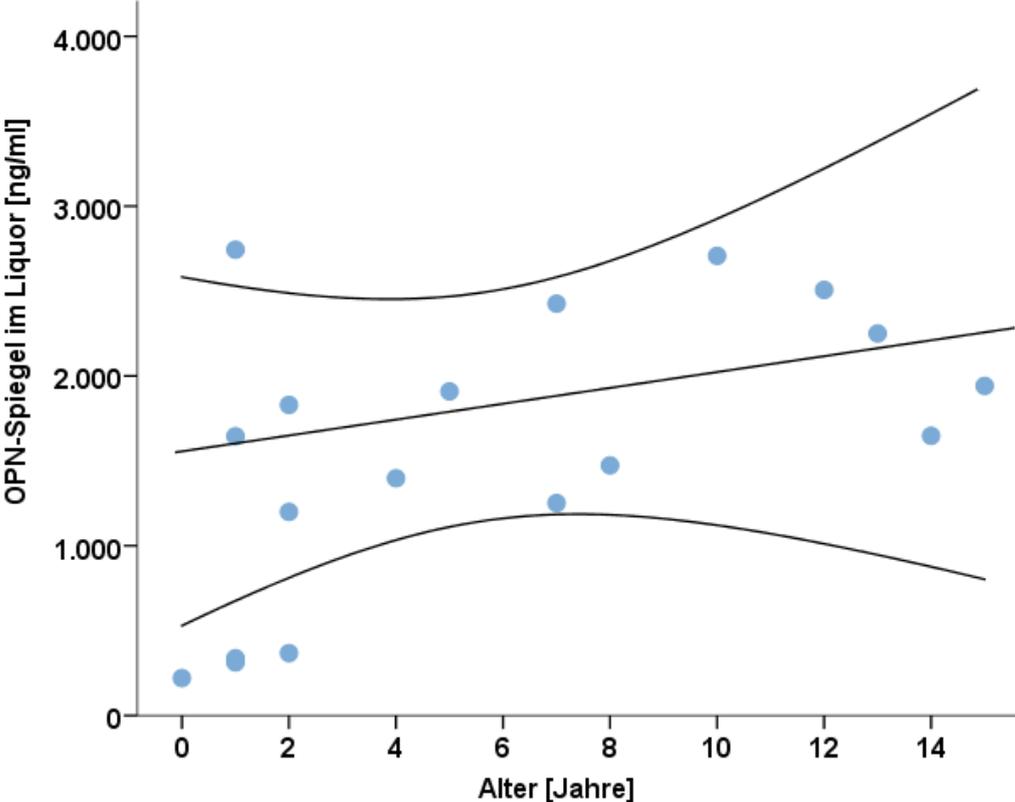


In den folgenden Streudiagrammen ist der Zusammenhang zwischen dem Alter und dem OPN-Spiegel im Blut und Liquor abgebildet (siehe Abbildung 4.2.1b und 4.2.1c). Mit zunehmendem Alter nimmt der OPN-Wert im Blut ab (Spearman $r=-0,191$; $p=0,279$). Im Liquor hingegen beobachten wir einen Anstieg des OPN mit zunehmendem Alter (Spearman $r=0,457$; $p=0,051$). Jedoch sind beide Korrelationen nicht signifikant.

Abbildungen 4.2.1b Zusammenhang zwischen OPN-Spiegel im Blut und Alter



Abbildungen 4.2.1c: Zusammenhang zwischen OPN-Spiegel in Liquor und Alter



4.2.2 Einfluss der Tumorentität auf den OPN-Spiegel

Wie aus Abbildung 4.2.3a hervorgeht, wurden die meisten Proben von Kindern mit akuten Leukämien und Hirntumoren gesammelt.

Abbildung 4.2.2a: Verteilung der Tumorentitäten im Studienkollektiv

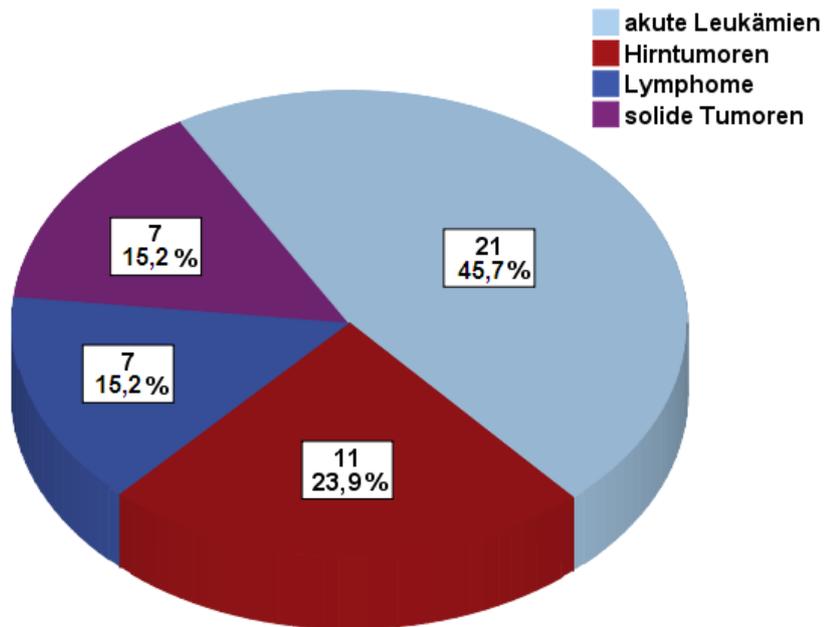
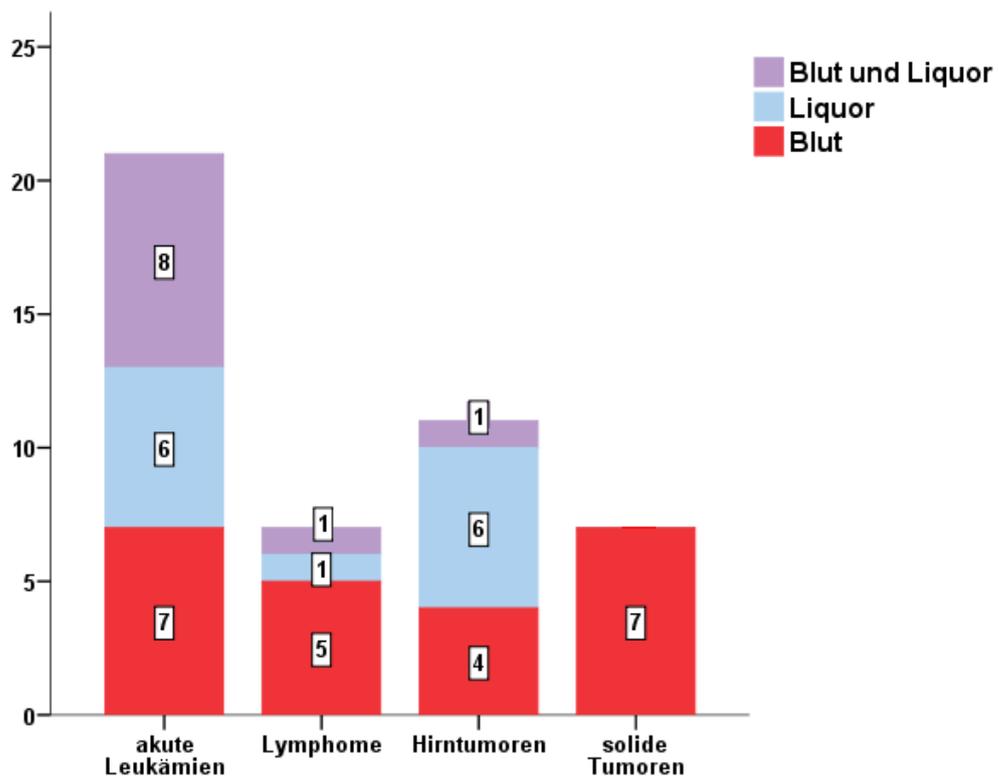


Abbildung 4.2.2b: Verteilung der Proben nach Tumorgruppen



4.2.3 Einfluss des Abnahmezeitpunktes auf den OPN Spiegel in Blut und Liquor

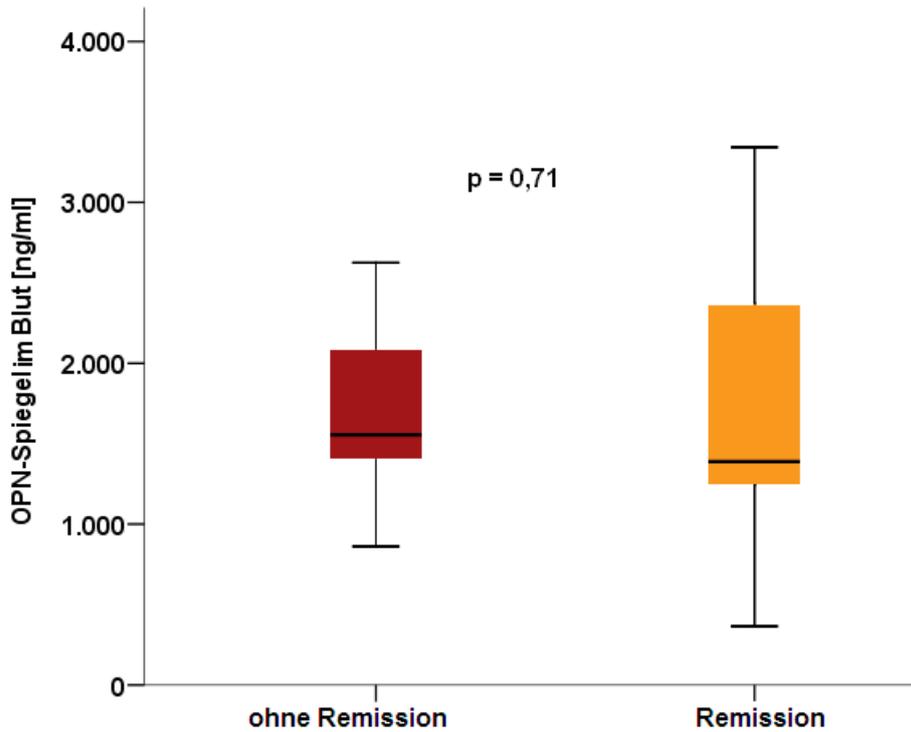
Um zu sehen, ob der Abnahmezeitpunkt einen Einfluss auf den OPN-Spiegel im Blut hat wurden die Proben entsprechend ihrer Tumorentität und dem Abnahmezeitpunkt aufgeteilt. Entsprechend der 4 Abnahmezeitpunkte (Diagnose, Therapie, Remission, Rezidiv) wurden 2 Gruppen gebildet und die Patienten sind entsprechend ihres Remissionsstatus in die Gruppen *Remission* und *ohne Remission* aufgeteilt worden. In der Gruppe *Remission* befanden sich alle Patienten, bei denen zum Zeitpunkt der Blutentnahme keine Tumorerkrankung mehr nachweisbar war. Hierzu zählen z.B. alle Leukämiepatienten unter Therapie, die ihre 1. Remission erreicht hatten. In die Gruppe *ohne Remission* wurden Patienten zusammengefasst, deren Blutentnahme zum Zeitpunkt der Diagnose erfolgte oder im Rezidiv bzw. unter Therapie bei noch nachweislicher Tumorerkrankung wie z.B. Leukämiepatienten, die unter Therapie, jedoch noch nicht in Remission waren.

Tabelle 4.2.3a: Verteilung der Abnahmezeitpunkte der Blutproben im Studienkollektiv entsprechend der Gruppen Remission vs. ohne Remission

Abnahmezeitpunkt	Häufigkeit	Prozent
ohne Remission	14	42,4
Remission	19	57,6
Gesamt	33	100,0

Abbildung 4.2.3a zeigt die Mittelwerte der Abnahmezeitpunkte in den Gruppen Tumor vs. Remission. Alle Tumorentitäten zusammengenommen ließ sich keine Signifikanz feststellen.

Abbildung 4.2.3a: OPN-Spiegel in Blut entsprechend dem Remissionsstatus ohne Remission vs. Remission



Abbildungen 4.2.3b: OPN-Spiegel im Blut entsprechend dem Remissionsstatus ohne Remission vs. Remission und nach Tumorentität

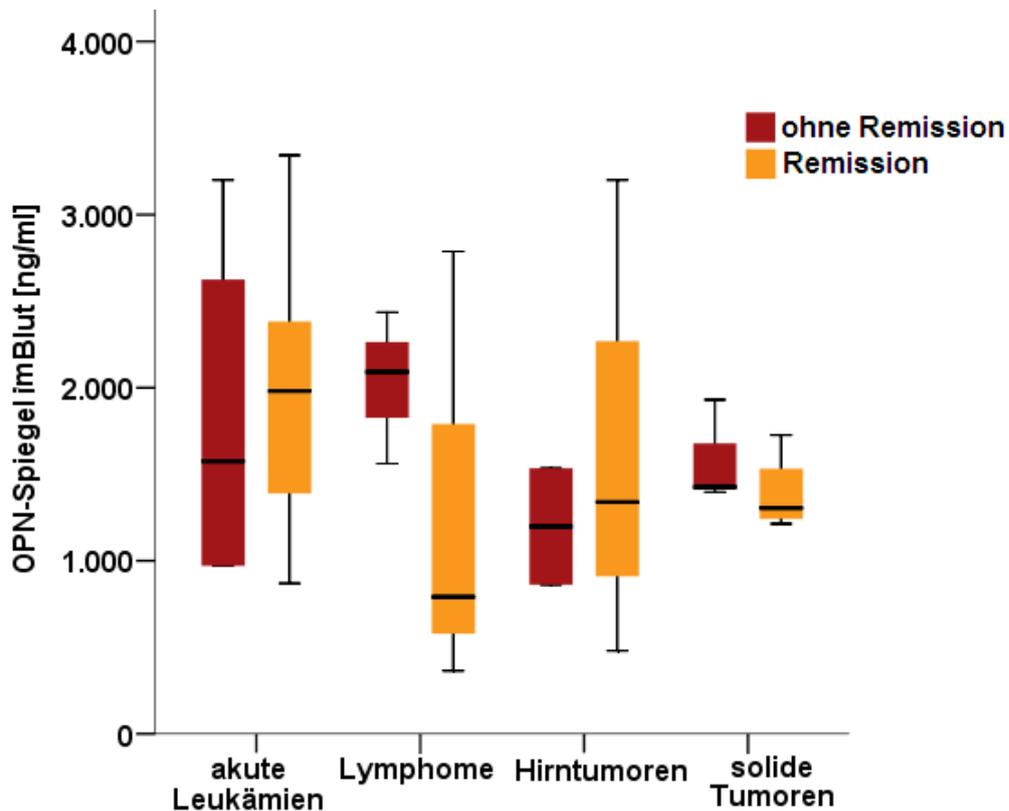


Abbildung 4.2.3b zeigt die Abnahmezeitpunkte Tumor vs. Remission entsprechend der einzelnen Tumorentitäten. Auch in dieser Analyse zeigt sich keine Signifikanz für den mittleren OPN-Wert in Blut hinsichtlich des Abnahmezeitpunktes aufgeteilt nach den einzelnen Tumorentitäten.

Tabelle 4.2.3b: Verteilung der Abnahmezeitpunkte der Liquorproben im Studienkollektiv entsprechend der Gruppen Remission vs. ohne Remission

Abnahmezeitpunkt	Häufigkeit	Prozent
ohne Remission	7	30,4
Remission	16	69,6
Gesamt	23	100,0

Abbildung 4.2.3c: OPN-Spiegel in Liquor entsprechend dem Remissionsstatus ohne Remission vs. Remission

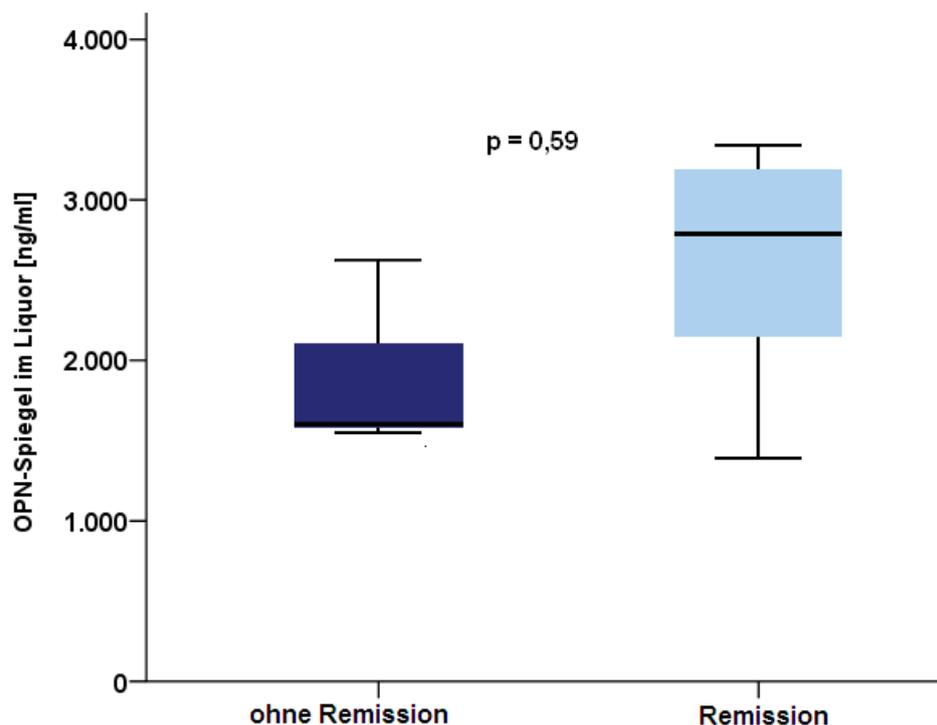


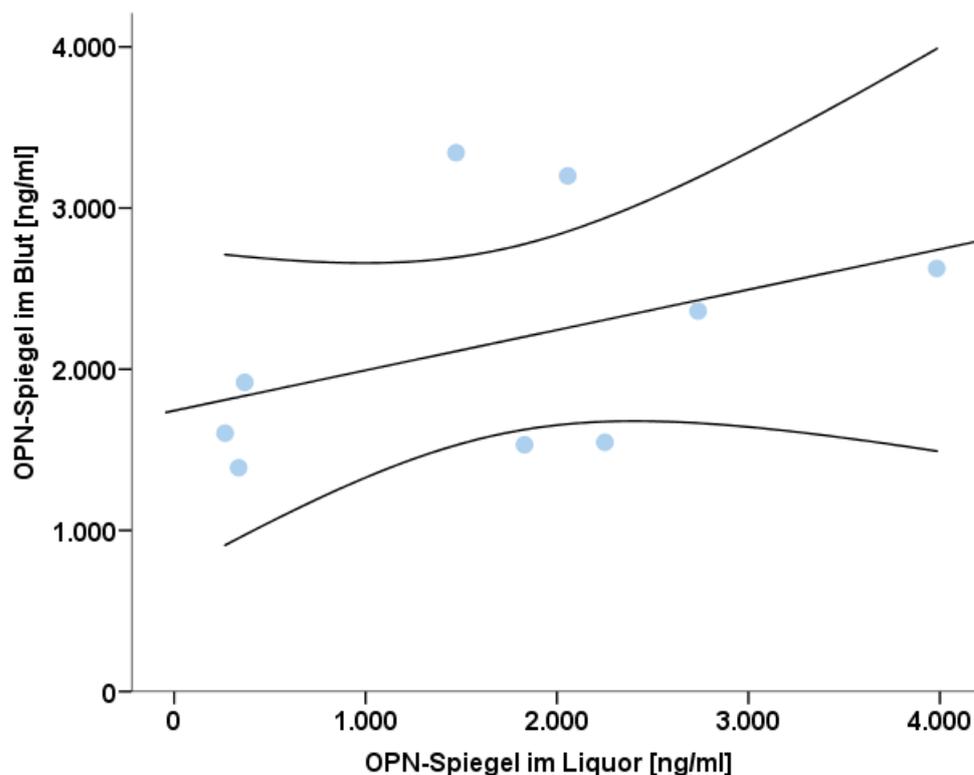
Abbildung 4.2.3c zeigt die mittleren OPN-Spiegel im Liquor entsprechend den Abnahmezeitpunkten der Gruppen ohne Remission vs. Remission. Alle Tumorentitäten zusammen genommen lässt sich keine Signifikanz für den mittleren OPN-Spiegel im Liquor in Abhängigkeit zum Abnahmezeitpunkt feststellen.

4.2.4 Einfluss der ZNS-Beteiligung auf den OPN-Spiegel im Liquor bei Kindern mit akuten Leukämien

Insgesamt wurde bei 4 der 21 eingeschlossenen Kinder mit akuten Leukämien eine positive ZNS-Beteiligung diagnostiziert. Es konnten die Liquorproben von 14 Kindern, davon 2 mit positivem ZNS-Befall, untersucht werden, jedoch macht diese sehr geringe Fallzahl eine statistische Auswertung unmöglich.

Um einen möglichen Zusammenhang des OPN-Spiegels gemessen im Blut und Liquor zu untersuchen, wurde die Untergruppe der akuten Leukämien herangezogen, da bei 8 Kindern in dieser Gruppe zeitgleich abgenommene Blut- und Liquorproben zur Verfügung standen (s. Abbildung 4.2.4b). In der Korrelationsanalyse zeigte sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen OPN-Spiegel im Liquor und Blut (Spearman $r=0,367$; $p=0,332$).

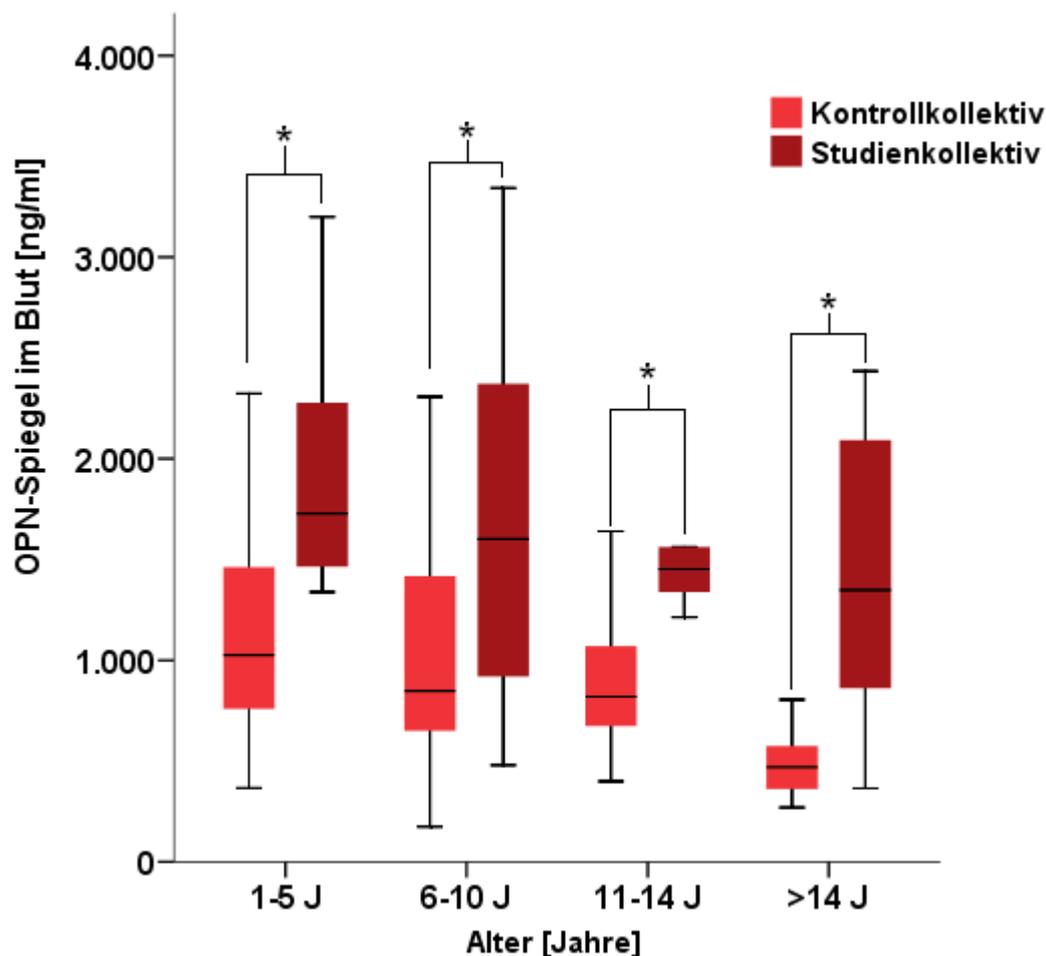
Abbildung 4.2.4a: Korrelation zwischen OPN-Spiegel im Blut und Liquor bei Kindern mit akuten Leukämien



4.3 Vergleich Studien- und Kontrollkollektiv

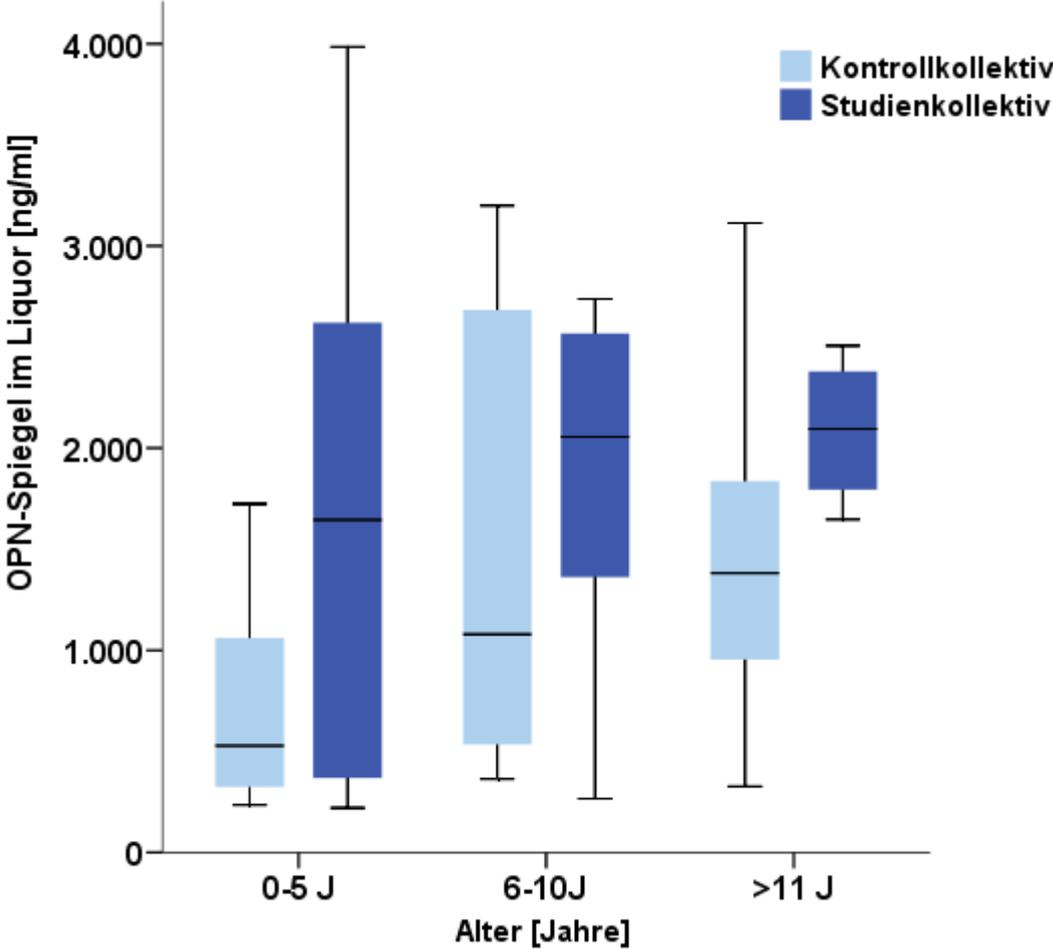
Im letzten Abschnitt werden die OPN-Spiegel zwischen den beiden Kollektiven verglichen. Da, wie unter Punkt 4.3.3 dargelegt, keine Abhängigkeit entsprechend der Abnahmezeitpunkte für die einzelnen Tumorentitäten des Studienkollektives nachgewiesen werden konnte, wurden für die weiteren Analysen die unterschiedlichen Abnahmezeitpunkte nicht nochmals berücksichtigt. Der Vergleich der OPN-Spiegel im Blut und Liquor zeigt erhöhte Werte bei Kindern mit Tumorerkrankungen als bei Kindern aus der Kontrollgruppe für alle untersuchten Altersklassen (siehe Abbildungen 4.3a und 4.3b). Hierbei sind die Unterschiede im OPN-Blutspiegel in jeder Altersklasse signifikant (1-5J: $p < 0,001$; 6-10J: $p < 0,026$; 11-14J: $p < 0,001$; > 14 J: $p < 0,008$). Die Liquorspiegel jedoch zeigen keine Signifikanz (0-5J: $p = 0,154$; 6-10J: $p = 0,601$; > 11 J: $p = 0,061$).

Abbildung 4.3a: OPN-Spiegel im Blut nach Altersklassen



*signifikant nach Mann-Whitney-U Test, $p < 0,05$

Abbildung 4.3b: OPN-Spiegel im Liquor nach Altersklassen



5. Diskussion

In dieser Arbeit wurden altersabhängige Referenzwerte für Osteopontin in Blutplasma und Liquor für Neugeborene, Kinder und Jugendliche im Alter von 0 – 21 Jahre erstellt. Es wurden Referenzintervalle für verschiedene Altersgruppen berechnet. Die errechneten Referenzintervalle dienen als Grundlage für den Vergleich mit einem Kollektiv von Kindern und Jugendlichen, die unter verschiedenen malignen Krebserkrankungen leiden. Hier wurden ebenfalls OPN Werte in Blutplasma und Liquor erhoben und gemessen.

5.1 Erstellung von Referenzwerten

5.1.1 Referenzwertproblematik im Kindesalter

Die Rekrutierung von Patienten zu Studienzwecken birgt oftmals verschiedene Schwierigkeiten. Nach *Solberg et al* und *Wright and Royston et al* sollte zur Berechnung von Referenzbereichen nach der nicht-parametrischen Methode die Referenzpopulation aus mindestens 120 Individuen bestehen (Solberg 2004;Wright & Royston 1999). Wird jedoch, wie in unserer Studie, die Population in einige Subgruppen unterteilt, ist die geforderte Anzahl an Personen pro Gruppe kaum zu erreichen. Bei einer Gruppengröße von unter 120 Probanden ist die Bestimmung von Konfidenzintervallen nicht mehr sinnvoll, da dann die Minimal- und Maximalwerte der Messergebnisse das Konfidenzintervall begrenzen würden (Reed *et al.* 1971;Solberg 2004). Für die Erhebung pädiatrischer Referenzbereiche sind die Daten unter Umständen zusätzlich limitiert. Wenn wissenschaftliche Untersuchungen eine Blutprobe gesunder Kinder erfordern, stellt dies ein großes ethisches Problem dar, da Blutentnahmen für Kinder oft eine psychische Belastung darstellen und besonders im Kleinkindalter auch traumatisierend sein können. Darüber hinaus können Minderjährige nicht frei über die Teilnahme an einer Studie entscheiden und eine Einwilligung bzw. Ablehnung müsste durch die Erziehungsberechtigten erfolgen. Aus diesen Gründen sind Blutentnahmen allein zu Forschungszwecken bei Kindern kaum zu rechtfertigen, von einer Lumbalpunktion zu reinen Forschungszwecken ganz abgesehen.

Obwohl das ideale Verfahren zur Erstellung von Referenzbereichen die stichprobenartige Untersuchung ausschließlich gesunder Personen aus der Allgemeinbevölkerung wäre, werden häufig bereits vorhandene Daten von Kindern einer Krankenhauspopulation herangezogen, um eine ausreichende Anzahl an Laborwerten ohne zusätzliche Blutentnahme zu erhalten. Dabei ist es sehr wichtig, dass in die Studie eingeschlossene Patienten an keiner Erkrankung desjenigen Organsystems leiden, das wissenschaftlich untersucht werden soll bzw. Einfluss auf den erhobenen Wert haben kann. Aus genanntem Grund wurden, so gut es sich steuern ließ, Patienten für die Blut- und Liquorproben à priori ausgewählt, aufgeklärt und die Proben wurden, im Rahmen der am darauffolgenden Tag diagnostischen Blut- und/oder Liquorentnahme, prospektiv abgenommen. Retrospektiv wurden alle Patientenakten studiert, fehlende Daten ergänzt und unpassende Patienten ausgeschlossen. Ein Vorteil der anhand einer Krankenhauspopulation erstellten Referenzwerte ist, dass diese Referenzbereiche auch an einem Kollektiv erhoben wurden, das ebenfalls hospitalisiert war und dessen Werte/Blutproben unter vergleichbaren Umständen, eventuell sogar im gleichen Labor, analysiert wurden (Kouri *et al.* 1994). Da die Analyse im Forschungslabor und nicht im Zentrallabor erfolgte und die retrospektiv erfassten Routinelaborwerte uns lediglich als Zusatzinformation dienten, ist dieser Punkt bei vorliegender Arbeit nicht stark gewichtet. Vor dem Hintergrund oben genannter praktischer und ethischer Gründe wurden daher für diese Arbeit nur Blut- und/oder Liquor-Proben benutzt, die zwar in einem extra Röhrchen, jedoch im Rahmen der diagnostischen Untersuchung abgenommen wurden. Dies wurde als beste Alternative zur Probenentnahme zu reinen Studienzwecken erachtet.

5.1.2 Problematik bei der Auswahl einer Referenzpopulation

Eine Referenzpopulation kann auch kranke Personen beinhalten, sofern die Selektionskriterien und der Gesundheitszustand der ausgewählten Personen genau beschrieben werden (Grasbeck 1990;Grasbeck 2004;Solberg 2004). Daher wurden die, für diese Studie vordefinierte Ein- und Ausschlusskriterien genutzt, um die untersuchten Patienten anhand der verfügbaren klinischen Informationen in ein gesundes Referenzkollektiv zu selektionieren. Entsprechend wurden nur Kinder in die Studie aufgenommen, deren Gesundheitszustand, Erkrankungen und Medikation

auf der Basis der bis dato veröffentlichten Arbeiten zu Osteopontin im Kindes- und Jugendalter, keine Auswirkungen auf den zu analysierenden Osteopontinwert in Blut und/oder Liquor haben (siehe hierzu auch Tabelle 5.3a: Publikationen zu OPN-Werten bei Kindern und Jugendlichen).

5.2 Osteopontin als potentieller Tumormarker - Allgemeines

OPN ist ein sekretorisches Phosphoprotein welches von T-Lymphozyten, Epidermalzellen, Knochenzellen und Endothelzellen aber auch von Tumorzellen im Remodelling Prozess, z.B. im Rahmen einer Inflammation, ischämischen Perfusion, Knochenresorption, atherosklerotischen Prozessen oder im Zuge einer Tumor-Progression in hohem Maße exprimiert wird (Chakraborty *et al.* 2006; Rangaswami *et al.* 2006; Renkl *et al.* 2005; Wai & Kuo 2004). Aufgrund seiner Multi-Domän Struktur beeinflusst OPN viele physiologische und pathophysiologische Prozesse. Eine wichtige Funktion erfüllt OPN über die $\alpha_v\beta$ -Integrin- und CD44- Bindungsstelle (Weber *et al.* 1997; Weber *et al.* 1996; Zohar *et al.* 2000). Auch für maligne Erkrankungen im Kindesalter wurde die Besonderheit der Interaktion zwischen CD44 und OPN beschrieben (Elli *et al.* 2012). In der Einleitung wurde bereits ausführlich über die verschiedenen Bindungsstellen und die daraus resultierenden Funktionen von OPN berichtet. OPN-Werte in Blut und Liquor sowie seine Expression im Gewebe wurden bei sehr vielen malignen Erkrankungen wie auch bei nicht malignen Erkrankungen analysiert und beschrieben. Somit konnte für OPN bereits bei verschiedenen Krebserkrankungen im Vergleich zu gesunden Kontrollen erhöhte Blutplasma- und Liquorspiegel nachgewiesen werden (Weber *et al.* 2010b; Weber *et al.* 2011b). Eine erhöhte mRNA-Expression von OPN im Tumorgewebe, wie z.B. Kolon- und Mammakarzinomen, Nierenzellkarzinomen, metastasierten Lungen Karzinomen wurde ebenfalls mehrfach analysiert (Senger *et al.* 1989b; Wang *et al.* 2011b). Die in der Einleitung erwähnte Studie von Kao *et al* fand eine erhöhte OPN Expression im Tumorgewebe von pädiatrischen Patienten mit atypischen teratoiden Rhabdoidtumoren sowie erhöhte Liquor OPN- Spiegel (Kao *et al.* 2005a; Kao *et al.* 2005b). Ein erhöhter OPN-Spiegel wurde bei verschiedenen Krebsarten als Marker für einen schlechteren Verlauf gedeutet. So wird mehrfach beschrieben, dass das Gesamt- und ereignisfreie Überleben eng mit den OPN Werten, wie z.B. beim Mammakarzinom durch Singhal *et al* bereits 1997 beschrieben, assoziiert ist (Singhal

et al. 1997b). In einer 2006 veröffentlichten Studie von *Vivien et al.*, werden erhöhte OPN Blutplasma-Werte bei metastasierten Mammakarzinom Patientinnen im Verlauf untersucht. Sie stellen fest, dass der Ausgangs-OPN-Wert wie auch der Wert im Verlauf mit der Überlebenszeit der Patientinnen korreliert (*Bramwell et al.* 2006). Auch *Ramunkulov et al.* stellten in ihrer 2007 veröffentlichten Studie fest, dass erhöhte Plasma OPN Spiegel mit einer höheren Metastasierungsrate und einem schlechteren Überleben bei Patienten mit Nierenzellkarzinomen einhergehen (*Ramankulov et al.* 2007a). Eine Studie von *Wu et al.* konnte Ähnliches für Magenkarzinome nachweisen (*Wu et al.* 2007). Es konnte somit also ein Zusammenhang zwischen hohen OPN-Spiegeln und der mittleren Überlebensrate, durch Messungen im Tumor und Plasma bei Krebspatienten, nachgewiesen werden, was darauf schließen lässt, dass OPN eine nützliche Rolle bei der Risikostratifizierung von Patienten mit bestimmten Krebserkrankungen zukommen könnte. Dies wurde in einer größeren Übersichtarbeit von *Weber et al.* auch analysiert (*Weber* 2011). In vielen Studien zu OPN konnten die Untersucher zeigen, dass OPN als prognostischer Marker für das Überleben herangezogen werden kann (*Adeli* 2011a). Bei manchen Krebserkrankungen kann OPN als Marker für den Grad, das Stadium oder die frühe Progression einer Erkrankung dienen (*Weber et al.* 2010a; *Weber et al.* 2011a). Demnach könnte z.B. erwogen werden, die Behandlung von Patienten mit einem hohen OPN Spiegel zum Zeitpunkt ihrer Diagnose entsprechend anzupassen (*Thoms et al.* 2012). Die molekularen Mechanismen welche das Wachstum, die Progression und das Stadium einer Tumorerkrankung regulieren überlappen einander und OPN ist in fast all diese Mechanismen involviert (*Sodek et al.* 2000). In der Patientenversorgung werden die Diagnose und das Stadium einer Krebserkrankung anhand klinischer und histo-morphologischer Kriterien gestellt. Neben einer Früherkennung vor dem Auftreten jeglicher Krankheitssymptome, können molekulare Marker auch dazu dienen das Ausmaß einer Krebserkrankung besser zu reflektieren und einzuschätzen, so dass eine auf den Patienten individuell ausgerichtete Therapie erfolgen kann. Die noch unvollständige Synergie von klinischen und molekularen Markern bei malignen Tumorerkrankungen sollte Ausgangspunkt zur Reevaluation für eine neue Diagnostik und Klassifizierung von Krebserkrankungen sein. Wenn Biomarker Targets für neue Medikamente darstellen, könnten Sie unter Umständen auch als Grundlage für eine personalisierte Therapie in der Krebstherapie dienen (*Bruggenjurgen et al.* 2012).

5.3 Vergleich der Ergebnisse mit der aktuellen Literatur

5.3.1 Referenzwerte im Kindesalter

Das Beurteilen der Gesundheit von Patienten im Kindes- und Jugendalter sowie die Interpretation ihrer Blutwerte hängen maßgeblich von präzisen Laboruntersuchungen und Biomarkern ab. Die Laborbefunde und deren Interpretation basiert auf der Grundlage etablierter Referenzintervalle oder sogenannter pädiatrischer „Referenzwerte“ (Kohse & Thamm 2011;Thamm 2011). Leider gibt es immer noch große Lücken klar definierter pädiatrischer Referenzintervalle für viele Labortests, die bei Kindern und Jugendlichen verwendet werden. Ferner gibt es noch große Unklarheiten, was den Einfluss verschiedener Faktoren, wie Alter, Geschlecht, Entwicklungsstand, ethnischer Ursprung und Vieles mehr, auf pädiatrische Referenzintervalle angeht. Verschiedene Studien beschäftigten sich daher bereits damit diese Informationslücke zu schließen und entscheidende Einflussfaktoren näher zu analysieren und zu beschreiben (Adeli 2011b;Colantonio *et al.* 2012;Schnabl *et al.* 2008).

5.3.2 Referenzwerte für Osteopontin bei Kindern und Jugendlichen

OPN Blutplasma und Liquor Werte bei Kindern und Jugendlichen mit maligner oder nicht maligner Erkrankung sind bis dato nur in einigen wenigen publizierten Arbeiten untersucht worden. Bis zum heutigen Zeitpunkt sind weder Referenzwerte noch Referenzintervalle für OPN in Blutplasma, Serum oder Liquor erhoben worden. Unsere Studie ist unseres Wissens nach die erste, welche systematisch OPN-Spiegel bei Neugeborenen, Kindern und Jugendlichen aller Altersgruppen, von 0-21 Lebensjahren, in Blut und Liquor untersucht. Ferner ist es die erste Studie welche OPN Spiegel von gesunden Kindern aller Altersklassen untersucht und diese Werte mit OPN- Blutplasma- und OPN-Liquor-Werten von Kinder und Jugendlichen mit unterschiedlichen malignen Krebserkrankungen vergleicht. Daher lassen sich die von uns erhobenen Referenzwerte im Kontrollkollektiv sowie die im Studienkollektiv gemessenen Werte nur teilweise mit jenen, sehr wenigen aus der Literatur bekannten Werte, vergleichen.

Tabelle 5.3a fasst die wichtigsten Arbeiten zu OPN-Spiegel bei Kindern und Jugendlichen zusammen und gibt einen Überblick über die in den jeweiligen Studien erhobenen OPN-Werte. Ferner werden in der Tabelle das mittlere Alter sowie der gemessene Probentyp aufgelistet, da beides einen Einfluss auf den OPN-Spiegel hat. Keiner der aufgeführten Studien zu OPN im Kindesalter hat bis dato Referenzwerte für OPN im Kindes- und Jugendalter erstellt. Aus diesem Grund ist der Vergleich mit bereits publizierten Arbeiten nur teilweise möglich. Eine weitere Einschränkung stellt die Verwendung unterschiedlicher Probentypen dar. So haben einige Studien OPN Werte im Serum, andere OPN Werte im Blutplasma analysiert. Die Arbeit von *Lanteri P. et al* zeigt, dass OPN Werte im Plasma um das 3,8 bis 4,8-fache höher liegen als im Serum. Die Unterschiede zwischen den OPN Werten in Blutplasma und Serum waren höher als die gemessene Intra- und Inter-Assay Variabilität (*Lanteri et al. 2012b*).

Tabelle 5.3a: Publikationen zu OPN- Werten bei Kindern und Jugendlichen

Erkrankung	Autor & Jahr	Probe	Kontrollen Gesund [n]	Mittleres Alter Gesund [Jahre]	Mittlerer OPN Wert Gesunde [ng/ml]	Kollektiv Kranke [n]	Mittleres Alter Kranke [Jahre]	Mittlerer OPN Wert Kranke [ng/ml]
Asthma	Akelma AZ, 2013	Serum	42	3,0±1,95	6,0 (2,3-8,2)	51	3,6±2,0	6,9 (2,4-14,5)
Akute Leukämien mit und ohne ZNS Beteiligung	Incesoy - Ödemir S, 2013	Liquor	16	1,2 *	14,93±6,8	12 [ZNS+] 49 [ZNS-]	3,2±0,0 [ZNS+] 3,5±0,0 [ZNS-]	53,48±89,21 [ZNS+] 27,68±32,73 [ZNS-]
Lymphoretikuläre Neoplasien: Non-Hodgkin Lymphome [NHL] Hodgkin Lymphome [HL] Akute Lymphatische Leukämie [ALL]	Elli M, 2012	Serum	20	N/A	3,89±1,96	54	N/A	5,42±8,24 [Gesamt] 5,95±8,52 [NHL] 3,63±1,86 [HL] 7,24±7,13 [ALL]
Patienten mit Einzelnieren [SFK - Solitary functioning kidney]	Taranta - Janusz, 2012	Plasma	21	11,5 *	4,3 (1,0-16,0)	51	11,5 *	6,78 (1,75-41,43)
Autismus	Al - Ayadhi LY, 2011	Serum	42	7,76±2,45	122,3± 39,16	42	7,76± 2,45	197,1± 48,8
Biläre Atresie	Honsawek S, 2011	Plasma	13	8,3± 1,1	27,5± 6,4	59	8,2± 0,4	146,9 ± 19,1
Leberfibrose bei bilärer Atresie	Honsawek S, 2010	Plasma	10	7,4± 3,9	15,1± 15,0	30	7,2± 3,4	47,0 ± 56,4
Rhabdoidtumore [AT/RT]/Medulloblastom [MB] vs. Hydrocephalus[HC]/Epilepsie[E]	Kao CL, 2005	Plasma	15 [HC+E]	7,1±6,1	208,0	8 [AT] 16 [MB]	6,6±5,2 8,5±6,7	852,0 [AT/RT] 492,0 [MB]
		Liquor	15 [HC+E]	7,1±6,1	168,0	8 [AT] 16 [MB]	6,6±5,2 8,5±6,7	1175 [AT/RT] 524,5 [MB]

*Median

Soweit möglich werden nun die erhobenen Werte mit denen aus der Literatur bekannten Daten in den folgenden Abschnitten diskutiert.

5.3.3 OPN Werte im Kontrollkollektiv – Erstellung der Referenzwerte

Voraussetzung für das Kontrollkollektiv war, dass es einem Kollektiv gesunder Kinder gleichgestellt werden konnte. Daher wurde zunächst untersucht und nachgewiesen, dass eine Infektion in der aktuellen Anamnese entsprechend der

definierten Ein- und Ausschlusskriterien keinen Einfluss auf den OPN-Spiegel im Blut und Liquor hat. Somit ist davon auszugehen, dass die gemessenen OPN-Spiegel auch repräsentativ für Werte von gesunden Kindern und Jugendlichen sind. Die für die Studie gewählten Ein- und Ausschlusskriterien basieren auf den bisher publizierten Daten zu OPN bei verschiedenen nicht-malignen Erkrankungen (z.B. Asthma, Autismus, biliäre Atresie) im Kindesalter (vgl. Tabelle 5.3a). Ich wollte weiterhin wissen, wie sich die OPN Werte direkt nach Geburt und mit zunehmendem Alter bis zu 21 Jahren, verhalten. Im Gegensatz zu *Taranta-Junusz et al.* konnte ich durchaus eine signifikante Altersabhängigkeit im Plasma-OPN-Spiegel innerhalb des Kontrollkollektives aufzeigen und konnte somit beweisen, dass der OPN-Spiegel im Blut mit steigendem Alter unabhängig von weiteren Faktoren stetig und signifikant sinkt (*Taranta-Janusz et al.* 2012). Für die Liquorspiegel konnte ich keine Altersabhängigkeit nachweisen, jedoch konnte auch hier gezeigt werden, dass eine Infektionserkrankung entsprechend der Ein- und Ausschlusskriterien keinen Einfluss auf den OPN-Spiegel im Liquor hat. Patienten mit schweren Infektionen wie einer Meningitis oder einer Sepsis wurden bereits von vornherein ausgeschlossen.

In Bezug auf die Gruppe der Neugeborenen konnte ich aufzeigen, dass der Geburtsmodus den OPN-Spiegel im Blut des Neugeborenen nicht beeinflusst. Auch ist der OPN-Spiegel von Geburtsgewicht und anderen perinatalen Parametern (APGAR, Nabelschnur-pH, etc) unabhängig. Da mit dieser Arbeit zum ersten Mal OPN-Werte im Nabelschnurblut gemessen wurde, gibt es bis dato keine vergleichbaren publizierten Daten hierzu.

Durch die Messung des OPN-Wertes im Nabelschnurblut und den Vergleich zur Altersklasse 0-1 Jahre ließ sich nachweisen, dass der OPN- Spiegel im Blutplasma innerhalb des ersten Lebensjahres zunächst ansteigt um dann signifikant und kontinuierlich mit zunehmendem Alter abzufallen. Somit ergibt sich für OPN im Blutplasma ein postpartaler Peak der nach dem 1. Lebensjahr sinkt. Dies lässt sich damit erklären, dass OPN bei vielen physiologischen Prozessen, wie vor allem beim Knochenstoffwechsel eine wichtige Rolle zukommt. Dadurch ließe sich, durch eine anzunehmende erhöhte Expression von OPN in diesem Lebensalter, ein damit verbundener erhöhter OPN-Spiegel im Blut erklären.

Bayer et al kommen in ihrer Arbeit zur Erstellung von Referenzwerten von Osteocalcin (OC) und Prokollagen Typ I (PINP) im Kindes und Jungendalter, beides wichtige Proteine für den Knochenstoffwechsel, zu ähnlichen Ergebnissen. Die höchsten Werte für PINP konnten *Bayer et al* bei der Erstellung Ihrer Referenzwerte im ersten Lebensjahr nachweisen, danach fiel der Wert mit leichten Schwankungen in der Pubertät kontinuierlich ab (*Bayer 2013*). *Ambroszkiewicz et al* untersuchen ebenfalls mehrfach zwei Marker des Knochenstoffwechsels, in ihrer Arbeit handelte es sich um Osteocalcin (OC) und der alkalischen Knochenphosphatase (Bone alkaline Phosphatase - BALP). Auch hier zeigte sich, dass beide Marker abhängig sind vom Lebensalter der Kinder und Jugendlichen. Einen Peak stellten sie hier in der Pubertät fest. Nach der Pubertät fielen beide Marker kontinuierlich ab bis sie einen stabilen Wert erreicht hatten (*Ambroszkiewicz et al. 2002; Gajewska et al. 2005*).

Auch das Geschlecht der Kinder spielte im Kontrollkollektiv in allen Alterklassen keine Rolle und beeinflusste den OPN-Spiegel in Blut oder im Liquor der untersuchten Kinder nicht. Dies steht auch im Einklang mit den zu OPN im Kindes- und Jungendalter publizierten Arbeiten. Ein Unterschied nach Geschlechtern wurde für OPN Spiegel in Blut und Liquor bei Kindern und Jugendlichen bis dato nicht beschrieben (vgl. hierzu auch Tabelle 5.3a).

Die in dieser Arbeit erhobenen OPN-Spiegel wurden im Blutplasma gemessen. Nach *Lanteri et al*, liegen die OPN-Spiegel im Plasma um das 3,8 bis 4,8-fache höher als im Serum (*Lanteri et al. 2012a*). In der Studie von *Al-Ayadhi et al* ergab sich für den Serum OPN-Spiegel von 42 gesunden Kontrollen mit einem mittleren Alter von $7,7 \pm 2,5$ Jahren ein Wert von $122,3 \pm 39,16$ ng/ml (*Al-ayadhi & Mostafa 2011*)(vgl. hierzu auch Tabelle 5.3a). Multipliziert man diesen im Serum erhobenen Wert um den Faktor 3,8 so ergibt sich ein mittlerer OPN-Wert von 463,74, multipliziert mit 4,8 entsprechend von 587,04 ng/ml. Diese Werte stimmen weitgehend mit denen in dieser Arbeit erhobenen mittleren OPN-Blutplasma-Spiegel für die Altersklasse der Kinder von 1-14 Jahren überein (vgl. hierzu Tabelle 4.1.4a auf Seite 60). Allerdings liegen die, in beiden Studien von *Honsawek et al* gemessenen OPN-Blutplasma Werte von 13 bzw. 10 gesunden Kontrollen, im Alter von $8,3 \pm 1,1$ bzw. $7,4 \pm 3,9$, weit unterhalb der von uns gemessenen und erhobenen Referenzintervalle für Kinder

von 1-14 Jahren. Dies ist sicherlich auf das doch sehr kleine Kontrollkollektiv von einem knappen Duzend Kindern in den Arbeiten von *Honsawek et al* zurückzuführen (*Honsawek et al.* 2010;*Honsawek et al.* 2011). Auch die in der Studie von *Akalema et al* gemessenen Werte von 42 gesunden Kontrollen weisen einen deutlich niedrigeren OPN Serum-Spiegel auf als die in meiner Arbeit gemessenen OPN-Spiegel im Blutplasma (*Akelma et al.* 2013). Insgesamt muss davon ausgegangen werden, dass die Verwendung unterschiedlicher Probenarten und unterschiedlicher ELISA Kits zu verschiedenen OPN-Spiegeln führen kann.

5.3.4 OPN Werte im Studienkollektiv

Nach der Erstellung von altersabhängigen Referenzwerten in Blutplasma sowie der Erhebung von Referenzwerten in Liquor von Kindern und Jugendlichen habe ich im nächsten Schritt, die OPN-Spiegel in Blut und Liquor von Kindern und Jugendlichen mit verschiedenen malignen Erkrankungen untersucht. Hier konnte ich zeigen, dass der OPN Spiegel im Blut von krebserkrankten Kindern im Vergleich zu Kindern ohne Krebserkrankung signifikant erhöht ist. Ferner konnte ich aufzeigen, dass auch der OPN-Spiegel im Liquor von Kindern mit Krebserkrankung erhöht ist, jedoch konnte ich im Gegensatz zu *Kao et al* keine Signifikanz für eine bestimmte Tumorerkrankung nachweisen (*Kao et al.* 2005a;*Kao et al.* 2005b). Der Einschluss von Kindern mit unterschiedlichen Krebserkrankungen zu unterschiedlichen Zeitpunkten innerhalb ihrer Therapie hat sicherlich Einfluss auf den OPN Spiegel in Blutplasma und Liquor. Im Studienkollektiv zeigte sich keine Abhängigkeit des OPN-Spiegel in Blut und/oder Liquor zum Abnahmezeitpunkt. Grund hierfür kann die kleine Fallzahl pro Tumorentität im Studienkollektiv sein. Ein weiterer Grund ist die Tatsache, dass eine Blut und/oder Liquorprobe pro Patient abgenommen wurde und nicht mehrere Proben im Verlauf der Erkrankung pro Patient. *Kao et al* konnten aufzeigen, dass die OPN-Spiegel im Liquor sich im Verlauf der Erkrankung und unter Therapie bei Kindern mit AT/RT verändern. Dieser Nachweis konnte aufgrund der Zusammensetzung der Blut und Liquorproben im Studienkollektiv dieser Arbeit nicht erbracht werden. Jedoch konnte ich trotz der sehr heterogenen Zusammensetzung des Studienkollektives, höhere mittlere OPN-Blutplasma-Werte bei allen Patienten des Studienkollektives im Vergleich zur jeweiligen Altersklasse des Kontrollkollektives nachweisen.

Auch im Liquor waren die mittleren OPN-Werte höher, jedoch nicht signifikant im Vergleich zu den Kontrollen. Aufgrund der kleinen Fallzahl im Studienkollektiv konnte eine Sensitivität und/oder Spezifität für eine bestimmte Tumorerkrankung nicht ausgemacht werden. Es zeigte sich kein Unterschied im OPN-Spiegel innerhalb der einzelnen Tumorerkrankungen. Auch unter Berücksichtigung des Remissionsstatus konnte kein Unterschied in den OPN-Werten zwischen Kindern mit hämatopoetischen Erkrankungen (akuten Leukämien) und Kindern mit soliden Tumoren (Hirntumore, Lymphome und sonstige solide Tumoren) festgestellt werden. Dies liegt sicherlich an den sehr kleinen Gruppengrößen der einzelnen Erkrankungen innerhalb des Studienkollektives. Dennoch waren die OPN- Blut und Liquor Spiegel im Mittel alle gleichmäßig stark erhöht im Vergleich zu Kindern und Jugendlichen gleicher Altersklasse im Kontrollkollektiv. Um jedoch eine sichere Aussage darüber machen zu können, ob sich OPN als diagnostischer oder prognostischer Tumormarker eignet, ist ein größeres und homogeneres Studienkollektiv mit krebskranken Patienten erforderlich. Ferner sind in diesem Zusammenhang auch sequenzielle Blutentnahmen zu fest definierten Zeitpunkten pro Patienten und Erkrankung notwendig. Dies ist wichtig um zu erkennen, inwieweit sich die OPN-Werte von Beginn der jeweiligen Erkrankung, unter Therapie und im weiteren Verlauf verändert. Bei soliden Tumoren ist, ähnlich wie bei erwachsenen Patienten mit soliden Tumorerkrankungen, auch bei Kindern mit soliden Tumoren, zu untersuchen, wie das Stadium einer Tumorerkrankung, somit also auch die Größe des Tumors, der Status von Fern- und Lymphknotenmetastasen, Einfluss auf den OPN- Spiegel haben kann (Weber *et al.* 2011a). Eine solche Analyse war bei dem hier vorliegenden kleinen Kontrollkollektiv nicht möglich und war ein limitierender Faktor dieser Arbeit.

Im Gegensatz zu der Arbeit von *Incesoy-Özdemir et al* konnte für Kinder mit akuten Leukämien kein Unterschied für den OPN-Liquor Wert bei Vorliegen einer Leukämie mit ZNS Beteiligung festgestellt werden (Incesoy-Ozdemir *et al.* 2013). Dies ist vermutlich erneut auf die geringe Fallzahl der einzelnen Untergruppen innerhalb des Studienkollektives zurückzuführen. Insgesamt wurde bei lediglich 4 der 21 eingeschlossenen Kinder mit akuten Leukämien eine positive ZNS-Beteiligung bei Diagnose diagnostiziert. Untersucht wurden Liquorproben von 14 Kindern (davon 2 mit positivem ZNS-Befall). Aufgrund der zu kleinen Fallzahl in diesem Subkollektiv

von Patienten mit akuter Leukämie und ZNS Befall vs. akuter Leukämie ohne ZNS Befall wurden keine weiteren statistischen Berechnungen erwogen. Auch hier gilt, wie zuvor bereits erwähnt, dass ein größeres Kollektiv an Patienten und somit Proben notwendig ist, um den OPN-Spiegel im Liquor von Patienten mit Krebserkrankungen weiter differenzieren zu können. So kann anhand des Studienkollektives dieser Arbeit die Studie von *Incesoy-Özdemir et al* weder bestätigt noch widerlegt werden.

5.3.5. OPN-Werte bei gesunden Erwachsenen

Im Rahmen der internen Qualitätskontrolle und zum Vergleich mit den in der Literatur bekannten Werten, wurden bei 19 gesunden Erwachsenen ebenfalls die OPN-Spiegel im Blutplasma gemessen. Hierbei ergab sich bei den von mir gemessenen, überwiegend weiblichen, gesunden, erwachsenen Probanden ein mittlerer OPN-Spiegel von 330 ng/ml (Min 146 und Max 678 ng/ml). Im Vergleich zu den in der Literatur bekannten Daten zu OPN-Spiegel bei Erwachsenen liegen die von mir gemessenen Proben, verglichen mit anderen Arbeiten, zum Teil in Einklang und zum Teil sind die von mir erhobenen OPN Werte deutlich höher. Da es sich bei meinem Kollektiv von erwachsenen Patienten, um eine kleine Anzahl vorwiegend weiblicher, gesunder Probanden handelt, ist ein Vergleich mit anderen Kontrollgruppen schwierig. Bis dato wurde noch keine Arbeit publiziert, welche OPN Werte an einem großen Kollektiv gesunder erwachsener Probanden erhoben hat. Somit existieren keine klar definierten und validierten Referenzwerte für OPN im Erwachsenenalter. Die Wahl des kommerziell erworbenen ELISA, wie auch die Art des Blutprobenmaterials (Serum vs. Plasma) haben Einfluss auf den OPN- Spiegel (Anborgh *et al.* 2009;Vordermark *et al.* 2006). Tabelle 5.3b gibt einen Überblick und stellt eine Auswahl an Arbeiten der letzten 15 Jahre dar, bei denen der OPN-Spiegel in Blutplasma oder Serum bei erwachsenen Patienten mit Krebserkrankungen gemessen wurde und gleichzeitig ein gesundes, nicht erkranktes Kontrollkollektiv zur Verfügung stand.

Tabelle 5.3b: Publikationen der letzten 15 Jahre zu OPN-Blutplasma Spiegel bei Erwachsenen mit Krebserkrankung und einem gesunden Kontrollkollektiv

Erkrankung	Autor & Jahr	Probe	Kontrolle Gesund [n]	Mittlerer OPN Wert Kontrollen Gesund [ng/ml]	Kollektiv Kranke [n]	Mittlerer OPN Wert Kollektiv Kranke [ng/ml]
Nicht-kleinzelliges Bronchial Karzinom	Rud AK, 2013	Serum	30	22,9 (9,5-49,1)	201	36,6 (8,1-164,1)
Nicht-kleinzelliges Bronchial Karzinom	Han SS, 2013	Plasma	50	48,41 (6,52-274,85)	53	93,07 (5,34-454,34)
Kutanes Melanom	Filia A, 2013	Plasma	30	59,2 (28,6-118,8)	158	54,7 (27,9-140,0)
Duktales Adenokarzinom des Pankreas	Poruk KE, 2013	Serum	86	39,5 ± 32,8	86	77,6 ± 67,3
Hepatozelluläres Karzinom	Zhou C, 2013	Serum	29	28,7 ± 4,5	176	164,3 ± 18,6
Harnblasenkarzinom	Zhao L, 2012	Plasma	230	173,1 ± 72,1	225	341,6 ± 136,6
Akute myeloische Leukämie	Liersch R, 2012	Serum	41	2,1 (0,83-3,22)	41	7,4 (0,3-30,5)
Larynx- und Hypopharynx Karzinome	Li Y, 2012	Plasma	20	15,2 ± 2,9	75	25,7 ± 5,1
Hepatitis C Virus-assoziertes Hepatozelluläres Karzinom	Abu El-Makarem MA, 2011	Plasma	120	45*	133	595*
Maligne Pleurale Mesotheliom	Cristaudo A, 2011	Plasma	93	553,10 ± 387,67	31	1322,56 ± 998,98
Hepatitis C Virus-assoziertes Hepatozelluläres Karzinom	El-Din Bessa SS, 2010	Plasma	20	4,3 ± 2,2	30	14,1 ± 3,7
Glioblastoma multiforme	Sreekanth-reddy P, 2010	Serum	22	11,70 ± 7,26	30	31,54 ± 28,98

Erkrankung	Autor & Jahr	Probe	Kontrolle Gesund [n]	Mittlerer OPN Wert Kontrollen Gesund [ng/ml]	Kollektiv Kranke [n]	Mittlerer OPN Wert Kollektiv Kranke [ng/ml]
Pankreas Karzinom	Chen R, 2010	Serum	25	1,16 ± 0,2	20	1,98 ± 0,1
Nasopharynx [NPC] & Hals-und Nacken Karzinome [HNC]	Hui EP, 2008	Plasma	29	523 ± 135	44 [NPC] 22 [HNC]	704 [NPC] 728 ± 248 [HNC]
Prostata Karzinome	Ramankulov, 2007	Plasma	29	625*	90	838* [G1, G2 Tumore] 994* [G3 Tumore]
Nierenzellkarzinome [RCC]	Ramankulov, 2007	Plasma	52	28,9	55	115 [RCC M1] 31,1 [RCC M0]
Uveales Melanom	Reiniger IW, 2007	Plasma	8	54,6 (38,23 -71,21)	19 8	46,78 (14,5 -118,67) [M0] 170,72 (87,37-375,54) [M1]
Hals & Nackenkarzinome [HNC]	Eto M, 2007	Serum	16	55,3 ± 35,3	37	99,5 ± 114,0
Magenkarzinome	Wu CY, 2007	Plasma	93	55,6*	132	78,6*
Hepatozelluläres Karzinom	Kim J, 2006	Plasma	60	155*	62	954* (168 – 5,742)
Non-Hodgkin Lymphom	Libra M, 2005	Serum	31	20,7 ± 6	29	81,5 ± 8,2
Nasopharynx Karzinom	Wong TS, 2005	Plasma	72	75,89 (10-455)	72	184,66 (6,81 – 856,9)
Pankreas Karzinom	Koopmann, 2004	Serum	22	204 ± 65	50	482 ± 170
Kolon-, Brust-, Prostata und Lungen-Karzinome [CA]	Fedarko NS, 2001	Serum	77	439 ± 30	20 [jeweils]	653 ± 39 [Prostata CA] 449 ± 22 [Kolon CA] 814 ± 53 [Brust CA] 724 ± 33 [Lungen CA]
Mammakarzinom	Singhal H, 1997	Plasma	35	37* (22-122)	70	142* (38-1312) [M1]

- * = Median,
- M1 = metastasierte Erkrankung des erkrankten Kollektives
- M0 = nicht metastasierte Erkrankung des erkrankten Kollektives
- G1-G3 = Grad der Tumorerkrankung

5.4 Schlussfolgerung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurden Referenzwerte für Osteopontin im Nabelschnurblut, Blutplasma und Liquor von Neugeborenen, Kindern und Jugendlichen im Alter von 0 – 21 Jahre erhoben und es wurde gezeigt, dass der OPN Blutplasma Spiegel altersabhängig ist und eine signifikante Korrelation zum Alter besteht. Für die OPN Liquor Werte konnten höhere Werte mit zunehmenden Alter gefunden werden, diese jedoch ohne signifikante Korrelation. Ich konnte mit dieser Arbeit darüber hinaus zeigen, dass OPN-Blutplasma-Werte auch bei Kindern und Jugendlichen mit malignen Erkrankungen im Vergleich zum analysierten Kontrollkollektiv signifikant erhöht sind. Aufgrund der kleinen Fallzahl im Studienkollektiv konnte keine Sensitivität und/oder Spezifität für bestimmte Tumorerkrankungen ausgemacht werden. Ebenso konnte, wie zuvor erwähnt, nicht analysiert werden, inwieweit sich der OPN- Spiegel im Verlauf einer Erkrankung auf den einzelnen Patienten gesehen entwickelt, da keine sequenziellen Blut- und Liquorentnahmen pro Patient und Erkrankung erfolgten. Dennoch waren die OPN-Liquor Werte von Kindern mit maligner Erkrankung im Vergleich zum Kontrollkollektiv, unabhängig zu ihrem Entnahmezeitpunkt, erhöht, hier jedoch nicht signifikant. Die Daten lassen darauf schließen, dass es sinnvoll ist OPN in Blutplasma und Liquor von Kinder und Jugendlichen mit maligner Krebserkrankung weiter zu untersuchen, um zu prüfen ob OPN als diagnostischer und/oder prognostischer Tumormarker in der Kinderonkologie für bestimmte Tumorerkrankungen in Betracht kommt.

6. Literaturverzeichnis

Adeli K. (2011a) Closing the gaps in pediatric reference intervals: the CALIPER initiative. *Clin Biochem* 44: 480-2.

Adeli K. (2011b) Closing the gaps in pediatric reference intervals: the CALIPER initiative. *Clin Biochem* 44: 480-2.

Ahmed M., Behera R., Chakraborty G., Jain S., Kumar V., Sharma P., Bulbule A., Kale S., Kumar S., Mishra R., Raja R., Saraswati S., Kaur R., Soundararajan G., Kumar D., Thorat D., Sanyal M., Ramdasi A., Ghosh P., & Kundu G. C. (2011) Osteopontin: a potentially important therapeutic target in cancer. *Expert Opin Ther Targets* 15: 1113-26.

Akelma A. Z., Cizmeci M. N., Kanburoglu M. K., Bozkaya D., Catal F., Mete E., Kutukoglu I., & Namuslu M. (2013) Elevated level of serum osteopontin in school-age children with asthma. *Allergol Immunopathol (Madr)*.

Al-ayadhi L. Y. & Mostafa G. A. (2011) Increased serum osteopontin levels in autistic children: relation to the disease severity. *Brain Behav Immun* 25: 1393-8.

Allan A. L., George R., Vantyghem S. A., Lee M. W., Hodgson N. C., Engel C. J., Holliday R. L., Girvan D. P., Scott L. A., Postenka C. O., Al-Katib W., Stitt L. W., Uede T., Chambers A. F., & Tuck A. B. (2006) Role of the integrin-binding protein osteopontin in lymphatic metastasis of breast cancer. *Am J Pathol* 169: 233-46.

Ambroszkiewicz J., Gajewska J., & Laskowska-Klita T. (2002) [Serum osteocalcin and bone alkaline phosphatase in healthy children in relation to age and gender]. *Med Wieku Rozwoj* 6: 257-65.

Anborgh P. H., Mutrie J. C., Tuck A. B., & Chambers A. F. (2011) Pre- and post-translational regulation of osteopontin in cancer. *J Cell Commun Signal* 5: 111-22.

Anborgh P. H., Wilson S. M., Tuck A. B., Winquist E., Schmidt N., Hart R., Kon S., Maeda M., Uede T., Stitt L. W., & Chambers A. F. (2009) New dual monoclonal ELISA for measuring plasma osteopontin as a biomarker associated with survival in prostate cancer: clinical validation and comparison of multiple ELISAs. *Clin Chem* 55: 895-903.

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: 860-4.

Asou Y., Rittling S. R., Yoshitake H., Tsuji K., Shinomiya K., Nifuji A., Denhardt D. T., & Noda M. (2001) Osteopontin facilitates angiogenesis, accumulation of osteoclasts, and resorption in ectopic bone. *Endocrinology* 142: 1325-32.

Barry S. T., Ludbrook S. B., Murrison E., & Horgan C. M. (2000) A regulated interaction between alpha5beta1 integrin and osteopontin. *Biochem Biophys Res Commun* 267: 764-9.

Bautista D. S., Saad Z., Chambers A. F., Tonkin K. S., O'Malley F. P., Singhal H., Tokmakejian S., Bramwell V., & Harris J. F. (1996) Quantification of osteopontin in human plasma with an ELISA: basal levels in pre- and postmenopausal women. *Clin Biochem* 29: 231-9.

Bayer M. (2013) Reference values of osteocalcin and procollagen type I N-propeptide plasma levels in a healthy Central European population aged 0-18 years. *Osteoporos Int*.

Bayless K. J., Meininger G. A., Scholtz J. M., & Davis G. E. (1998) Osteopontin is a ligand for the alpha4beta1 integrin. *J Cell Sci* 111 (Pt 9): 1165-74.

Behnes M., Brueckmann M., Lang S., Espeter F., Weiss C., Neumaier M., Ahmad-Nejad P., Borggreffe M., & Hoffmann U. (2013) Diagnostic and prognostic value of osteopontin in patients with acute congestive heart failure. *Eur J Heart Fail* 15: 1390-400.

- 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: 212-26.
- Bianco P., Fisher L. W., Young M. F., Termine J. D., & Robey P. G. (1991) Expression of bone sialoprotein (BSP) in developing human tissues. *Calcif Tissue Int* 49: 421-6.
- Bornsens L., Khademi M., Olsson T., Sorensen P. S., & Sellebjerg F. (2011) Osteopontin concentrations are increased in cerebrospinal fluid during attacks of multiple sclerosis. *Mult Scler* 17: 32-42.
- 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: 3337-43.
- Brown A. (2012) Osteopontin: A key link between immunity, inflammation and the central nervous system. *Transl Neurosci* 3: 288-293.
- Bruggenjurgen B., Kornbluth L., Ferrara J. V., & Willich S. N. (2012) [Clinical and health economic challenges of personalized medicine]. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* 55: 710-4.
- Butler W. T. (1989) The nature and significance of osteopontin. *Connect Tissue Res* 23: 123-36.
- Carecchio M. & Comi C. (2011) The role of osteopontin in neurodegenerative diseases. *J Alzheimers Dis* 25: 179-85.
- Chagan-Yasutan H., Tsukasaki K., Takahashi Y., Oguma S., Harigae H., Ishii N., Zhang J., Fukumoto M., & Hattori T. (2011) Involvement of osteopontin and its signaling molecule CD44 in clinicopathological features of adult T cell leukemia. *Leuk Res* 35: 1484-90.
- Chakraborty G., Jain S., Behera R., Ahmed M., Sharma P., Kumar V., & Kundu G. C. (2006) The multifaceted roles of osteopontin in cell signaling, tumor progression and angiogenesis. *Curr Mol Med* 6: 819-30.
- Colantonio D. A., Kyriakopoulou L., Chan M. K., Daly C. H., Brinc D., Venner A. A., Pasic M. D., Armbruster D., & Adeli K. (2012) Closing the gaps in pediatric laboratory reference intervals: a CALIPER database of 40 biochemical markers in a healthy and multiethnic population of children. *Clin Chem* 58: 854-68.
- Collins A. L., Rock J., Malhotra L., Frankel W. L., & Bloomston M. (2012) Osteopontin expression is associated with improved survival in patients with pancreatic adenocarcinoma. *Ann Surg Oncol* 19: 2673-8.
- Cook A. C., Tuck A. B., McCarthy S., Turner J. G., Irby R. B., Bloom G. C., Yeatman T. J., & Chambers A. F. (2005) Osteopontin induces multiple changes in gene expression that reflect the six "hallmarks of cancer" in a model of breast cancer progression. *Mol Carcinog* 43: 225-36.
- Dai J., Peng L., Fan K., Wang H., Wei R., Ji G., Cai J., Lu B., Li B., Zhang D., Kang Y., Tan M., Qian W., & Guo Y. (2009) Osteopontin induces angiogenesis through activation of PI3K/AKT and ERK1/2 in endothelial cells. *Oncogene* 28: 3412-22.
- Denda S., Reichardt L. F., & Muller U. (1998) Identification of osteopontin as a novel ligand for the integrin alpha8 beta1 and potential roles for this integrin-ligand interaction in kidney morphogenesis. *Mol Biol Cell* 9: 1425-35.
- Denhardt D. T., Noda M., O'Regan A. W., Pavlin D., & Berman J. S. (2001) Osteopontin as a means to cope with environmental insults: regulation of inflammation, tissue remodeling, and cell survival. *J Clin Invest* 107: 1055-61.
- Donati V., Boldrini L., Dell'Omodarme M., Prati M. C., Faviana P., Camacci T., Lucchi M., Mussi A., Santoro M., Basolo F., & Fontanini G. (2005) Osteopontin expression and prognostic significance in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 11: 6459-65.
- Elli M., Dagdemir A., Bozkurt C., Pinarli F. G., Duzgun A., Ozmen Z. C., Ertem U., & Acar S. (2012) Serum osteopontin and CD44 levels in lymphoreticular malignancies in children. *Bratisl Lek Listy* 113: 534-8.

- 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: 4060-6.
- Filia A., Elliott F., Wind T., Field S., Davies J., Kukalicz K., Randerson-Moor J., Harland M., Bishop D. T., Banks R. E., & Newton-Bishop J. A. (2013) Plasma osteopontin concentrations in patients with cutaneous melanoma. *Oncol Rep* 30: 1575-80.
- Fisher L. W. & Fedarko N. S. (2003) Six genes expressed in bones and teeth encode the current members of the SIBLING family of proteins. *Connect Tissue Res* 44 Suppl 1: 33-40.
- Fisher L. W., Jain A., Tayback M., & Fedarko N. S. (2004) Small integrin binding ligand N-linked glycoprotein gene family expression in different cancers. *Clin Cancer Res* 10: 8501-11.
- Fisher L. W., Torchia D. A., Fohr B., Young M. F., & Fedarko N. S. (2001) Flexible structures of SIBLING proteins, bone sialoprotein, and osteopontin. *Biochem Biophys Res Commun* 280: 460-5.
- Gajewska J., Ambroszkiewicz J., & Laskowska-Klita T. (2005) [Some bone turnover markers in serum of healthy children and adolescents in relation to age and gender]. *Wiad Lek* 58: 476-80.
- Gerber D. J., Pereira P., Huang S. Y., Pelletier C., & Tonegawa S. (1996) Expression of alpha v and beta 3 integrin chains on murine lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 14698-703.
- Goodison S., Urquidi V., & Tarin D. (1999) CD44 cell adhesion molecules. *Mol Pathol* 52: 189-96.
- Grasbeck R. (1990) Reference values, why and how. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 201: 45-53.
- Grasbeck R. (2004) The evolution of the reference value concept. *Clin Chem Lab Med* 42: 692-7.
- Herring G. M. (1976) A comparison of bone matrix and tendon with particular reference to glycoprotein content. *Biochem J* 159: 749-55.
- Herring G. M. & Kent P. W. (1963) Some studies on mucosubstances of bovine cortical bone. *Biochem J* 89: 405-14.
- Hillas G., Loukides S., Kostikas K., Simoes D., Petta V., Konstantellou E., Emmanouil P., Papiris S., Koulouris N., & Bakakos P. (2013) Increased levels of osteopontin in sputum supernatant of smoking asthmatics. *Cytokine* 61: 251-5.
- Hirama M., Takahashi F., Takahashi K., Akutagawa S., Shimizu K., Soma S., Shimanuki Y., Nishio K., & Fukuchi Y. (2003) Osteopontin overproduced by tumor cells acts as a potent angiogenic factor contributing to tumor growth. *Cancer Lett* 198: 107-17.
- Honsawek S., Chayanupatkul M., Chongsrisawat V., Vejchapipat P., & Poovorawan Y. (2010) Increased osteopontin and liver stiffness measurement by transient elastography in biliary atresia. *World J Gastroenterol* 16: 5467-73.
- Honsawek S., Vejchapipat P., Chongsrisawat V., Thawornsuk N., & Poovorawan Y. (2011) Association of circulating osteopontin levels with clinical outcomes in postoperative biliary atresia. *Pediatr Surg Int* 27: 283-8.
- Hsu H. P., Shan Y. S., Lai M. D., & Lin P. W. (2010a) Osteopontin-positive infiltrating tumor-associated macrophages in bulky ampullary cancer predict survival. *Cancer Biol Ther* 10: 144-54.
- Hsu K. H., Tsai H. W., Lin P. W., Hsu Y. S., Shan Y. S., & Lu P. J. (2010b) Osteopontin expression is an independent adverse prognostic factor in resectable gastrointestinal stromal tumor and its interaction with CD44 promotes tumor proliferation. *Ann Surg Oncol* 17: 3043-52.
- Hu D. D., Lin E. C., Kovach N. L., Hoyer J. R., & Smith J. W. (1995) A biochemical characterization of the binding of osteopontin to integrins alpha v beta 1 and alpha v beta 5. *J Biol Chem* 270: 26232-8.

- Incesoy-Ozdemir S., Sahin G., Bozkurt C., Oren A. C., Balkaya E., & Ertem U. (2013) The relationship between cerebrospinal fluid osteopontin level and central nervous system involvement in childhood acute leukemia. *Turk J Pediatr* 55: 42-9.
- Kaatsch P. (2010) Epidemiology of childhood cancer. *Cancer Treat Rev* 36: 277-85.
- Kaatsch P. & Grabow D. (2012) [The German cohort of long-term survivors of childhood cancer. A population-based cohort in the German Childhood Cancer Registry]. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* 55: 843-51.
- Kao C. L., Chiou S. H., Chen Y. J., Singh S., Lin H. T., Liu R. S., Lo C. W., Yang C. C., Chi C. W., Lee C. H., & Wong T. T. (2005a) Increased expression of osteopontin gene in atypical teratoid/rhabdoid tumor of the central nervous system. *Mod Pathol* 18: 769-78.
- Kao C. L., Chiou S. H., Ho D. M., Chen Y. J., Liu R. S., Lo C. W., Tsai F. T., Lin C. H., Ku H. H., Yu S. M., & Wong T. T. (2005b) Elevation of plasma and cerebrospinal fluid osteopontin levels in patients with atypical teratoid/rhabdoid tumor. *Am J Clin Pathol* 123: 297-304.
- 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: 219-26.
- Khan S. A., Cook A. C., Kappil M., Gunthert U., Chambers A. F., Tuck A. B., & Denhardt D. T. (2005) Enhanced cell surface CD44 variant (v6, v9) expression by osteopontin in breast cancer epithelial cells facilitates tumor cell migration: novel post-transcriptional, post-translational regulation. *Clin Exp Metastasis* 22: 663-73.
- Kohse K. P. & Thamm M. (2011) KiGGS-the German survey on children's health as data base for reference intervals. *Clin Biochem* 44: 479.
- Kolb A., Kleeff J., Guweidhi A., Esposito I., Giese N. A., Adwan H., Giese T., Buchler M. W., Berger M. R., & Friess H. (2005) Osteopontin influences the invasiveness of pancreatic cancer cells and is increased in neoplastic and inflammatory conditions. *Cancer Biol Ther* 4: 740-6.
- Koopmann J., Fedarko N. S., Jain A., Maitra A., Iacobuzio-Donahue C., Rahman A., Hruban R. H., Yeo C. J., & Goggins M. (2004) Evaluation of osteopontin as biomarker for pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 13: 487-91.
- Kouri T., Kairisto V., Virtanen A., Uusipaikka E., Rajamaki A., Finneman H., Juva K., Koivula T., & Nanto V. (1994) Reference intervals developed from data for hospitalized patients: computerized method based on combination of laboratory and diagnostic data. *Clin Chem* 40: 2209-15.
- Lanteri P., Lombardi G., Colombini A., Grasso D., & Banfi G. (2012a) Stability of osteopontin in plasma and serum. *Clin Chem Lab Med* 0: 1-6.
- Lanteri P., Lombardi G., Colombini A., Grasso D., & Banfi G. (2012b) Stability of osteopontin in plasma and serum. *Clin Chem Lab Med* 50: 1979-84.
- Liaw L., Almeida M., Hart C. E., Schwartz S. M., & Giachelli C. M. (1994) Osteopontin promotes vascular cell adhesion and spreading and is chemotactic for smooth muscle cells in vitro. *Circ Res* 74: 214-24.
- Liaw L., Lindner V., Schwartz S. M., Chambers A. F., & Giachelli C. M. (1995a) Osteopontin and beta 3 integrin are coordinately expressed in regenerating endothelium in vivo and stimulate Arg-Gly-Asp-dependent endothelial migration in vitro. *Circ Res* 77: 665-72.
- Liaw L., Skinner M. P., Raines E. W., Ross R., Cheresch D. A., Schwartz S. M., & Giachelli C. M. (1995b) The adhesive and migratory effects of osteopontin are mediated via distinct cell surface integrins. Role of alpha v beta 3 in smooth muscle cell migration to osteopontin in vitro. *J Clin Invest* 95: 713-24.

- Liersch R., Gerss J., Schliemann C., Bayer M., Schwoppe C., Biermann C., Appelmann I., Kessler T., Lowenberg B., Buchner T., Hiddemann W., Muller-Tidow C., Berdel W. E., & Mesters R. (2012) Osteopontin is a prognostic factor for survival of acute myeloid leukemia patients. *Blood* 119: 5215-20.
- 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: 46024-30.
- Macri A., Versaci A., Lupo G., Trimarchi G., Tomasello C., Loddo S., Sfuncia G., Caminiti R., Teti D., & Famulari C. (2009) Role of osteopontin in breast cancer patients. *Tumori* 95: 48-52.
- Marhaba R. & Zoller M. (2004) CD44 in cancer progression: adhesion, migration and growth regulation. *J Mol Histol* 35: 211-31.
- Matusan-Ilijas K., Damante G., Fabbro D., Dordevic G., Hadzisejdic I., Grahovac M., Avirovic M., Grahovac B., Jonjic N., & Lucin K. (2013) EGFR expression is linked to osteopontin and Nf-kappaB signaling in clear cell renal cell carcinoma. *Clin Transl Oncol* 15: 65-71.
- Matusan K., Dordevic G., Stipic D., Mozetic V., & Lucin K. (2006) Osteopontin expression correlates with prognostic variables and survival in clear cell renal cell carcinoma. *J Surg Oncol* 94: 325-31.
- Nagoshi S. (2014) Osteopontin: Versatile modulator of liver diseases. *Hepatol Res* 44: 22-30.
- Naor D., Sionov R. V., & Ish-Shalom D. (1997) CD44: structure, function, and association with the malignant process. *Adv Cancer Res* 71: 241-319.
- 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: 1024-31.
- O'Regan A. W., Hayden J. M., & Berman J. S. (2000) Osteopontin augments CD3-mediated interferon-gamma and CD40 ligand expression by T cells, which results in IL-12 production from peripheral blood mononuclear cells. *J Leukoc Biol* 68: 495-502.
- 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: 8819-23.
- Oldberg A., Franzen A., & Heinegard D. (1988) The primary structure of a cell-binding bone sialoprotein. *J Biol Chem* 263: 19430-2.
- Patani N., Jouhra F., Jiang W., & Mokbel K. (2008) Osteopontin expression profiles predict pathological and clinical outcome in breast cancer. *Anticancer Res* 28: 4105-10.
- Patarca R., Freeman G. J., Singh R. P., Wei F. Y., Durfee T., Blattner F., Regnier D. C., Kozak C. A., Mock B. A., Morse H. C. 3rd, & et al. I. (1989) Structural and functional studies of the early T lymphocyte activation 1 (Eta-1) gene. Definition of a novel T cell-dependent response associated with genetic resistance to bacterial infection. *J Exp Med* 170: 145-61.
- Pisitkun T., Johnstone R., & Knepper M. A. (2006) Discovery of urinary biomarkers. *Mol Cell Proteomics* 5: 1760-71.
- Ponta H., Sherman L., & Herrlich P. A. (2003) CD44: from adhesion molecules to signalling regulators. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4: 33-45.
- Ramankulov A., Lein M., Kristiansen G., Loening S. A., & Jung K. (2007a) Plasma osteopontin in comparison with bone markers as indicator of bone metastasis and survival outcome in patients with prostate cancer. *Prostate* 67: 330-40.
- Ramankulov A., Lein M., Kristiansen G., Meyer H. A., Loening S. A., & Jung K. (2007b) Elevated plasma osteopontin as marker for distant metastases and poor survival in patients with renal cell carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 133: 643-52.

- Rangaswami H., Bulbule A., & Kundu G. C. (2006) Osteopontin: role in cell signaling and cancer progression. *Trends Cell Biol* 16: 79-87.
- Reed A. H., Henry R. J., & Mason W. B. (1971) Influence of statistical method used on the resulting estimate of normal range. *Clin Chem* 17: 275-84.
- Renkl A. C., Wussler J., Ahrens T., Thoma K., Kon S., Uede T., Martin S. F., Simon J. C., & Weiss J. M. (2005) Osteopontin functionally activates dendritic cells and induces their differentiation toward a Th1-polarizing phenotype. *Blood* 106: 946-55.
- Rossig C., Juergens H., Schrappe M., Moericke A., Henze G., von Stackelberg A., Reinhardt D., Burkhardt B., Woessmann W., Zimmermann M., Gadner H., Mann G., Schellong G., Mauz-Koerholz C., Dirksen U., Bielack S., Berthold F., Graf N., Rutkowski S., Calaminus G., Kaatsch P., & Creutzig U. (2013) Effective childhood cancer treatment: the impact of large scale clinical trials in Germany and Austria. *Pediatr Blood Cancer* 60: 1574-81.
- Rudzki Z. & Jothy S. (1997) CD44 and the adhesion of neoplastic cells. *Mol Pathol* 50: 57-71.
- Ruoslahti E. & Pierschbacher M. D. (1987) New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science* 238: 491-7.
- Schipper M. E., Scheenstra M. R., van Kuik J., van Wichen D. F., van der Weide P., Dullens H. F., Lahpor J., de Jonge N., & De Weger R. A. (2011) Osteopontin: a potential biomarker for heart failure and reverse remodeling after left ventricular assist device support. *J Heart Lung Transplant* 30: 805-10.
- Schnabl K., Chan M. K., Gong Y., & Adeli K. (2008) Closing the gaps in paediatric reference intervals: the CALIPER initiative. *Clin Biochem Rev* 29: 89-96.
- 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 α v β 3 integrin, osteopontin, and thrombin. *Am J Pathol* 149: 293-305.
- Senger D. R., Perruzzi C. A., Gracey C. F., Papadopoulos A., & Tenen D. G. (1988) Secreted phosphoproteins associated with neoplastic transformation: close homology with plasma proteins cleaved during blood coagulation. *Cancer Res* 48: 5770-4.
- Senger D. R., Perruzzi C. A., & Papadopoulos A. (1989a) Elevated expression of secreted phosphoprotein I (osteopontin, 2ar) as a consequence of neoplastic transformation. *Anticancer Res* 9: 1291-9.
- Senger D. R., Perruzzi C. A., & Papadopoulos A. (1989b) Elevated expression of secreted phosphoprotein I (osteopontin, 2ar) as a consequence of neoplastic transformation. *Anticancer Res* 9: 1291-9.
- Senger D. R., Wirth D. F., & Hynes R. O. (1979) Transformed mammalian cells secrete specific proteins and phosphoproteins. *Cell* 16: 885-93.
- Shijubo N., Uede T., Kon S., Nagata M., & Abe S. (2000) Vascular endothelial growth factor and osteopontin in tumor biology. *Crit Rev Oncog* 11: 135-46.
- Shojaei F., Scott N., Kang X., Lappin P. B., Fitzgerald A. A., Karlicek S., Simmons B. H., Wu A., Lee J. H., Bergqvist S., & Kraynov E. (2012) Osteopontin induces growth of metastatic tumors in a preclinical model of non-small lung cancer. *J Exp Clin Cancer Res* 31: 26.
- Singhal H., Bautista D. S., Tonkin K. S., O'Malley F. P., Tuck A. B., Chambers A. F., & Harris J. F. (1997a) Elevated plasma osteopontin in metastatic breast cancer associated with increased tumor burden and decreased survival. *Clin Cancer Res* 3: 605-11.
- Singhal H., Bautista D. S., Tonkin K. S., O'Malley F. P., Tuck A. B., Chambers A. F., & Harris J. F. (1997b) Elevated plasma osteopontin in metastatic breast cancer associated with increased tumor burden and decreased survival. *Clin Cancer Res* 3: 605-11.

- Smith L. L., Cheung H. K., Ling L. E., Chen J., Sheppard D., Pytela R., & Giachelli C. M. (1996) Osteopontin N-terminal domain contains a cryptic adhesive sequence recognized by $\alpha 9\beta 1$ integrin. *J Biol Chem* 271: 28485-91.
- Sodek J., Ganss B., & McKee M. D. (2000) Osteopontin. *Crit Rev Oral Biol Med* 11: 279-303.
- Solberg H. E. (2004) The IFCC recommendation on estimation of reference intervals. The RefVal program. *Clin Chem Lab Med* 42: 710-4.
- Standal T., Borset M., & Sundan A. (2004) Role of osteopontin in adhesion, migration, cell survival and bone remodeling. *Exp Oncol* 26: 179-84.
- Takahashi K., Takahashi F., Hiramata M., Tanabe K. K., & Fukuchi Y. (2003) Restoration of CD44S in non-small cell lung cancer cells enhanced their susceptibility to the macrophage cytotoxicity. *Lung Cancer* 41: 145-53.
- Taranta-Janusz K., Wasilewska A., Stypulkowska J., & Sutula M. (2012) Osteopontin and symmetric dimethylarginine plasma levels in solitary functioning kidney in children. *Acta Paediatr* 101: e369-72.
- Thamm M. (2011) Assessing health in children: national surveys and the role of the laboratory. *Clin Biochem* 44: 446-7.
- Thoms J. W., Dal Pra A., Anborgh P. H., Christensen E., Fleshner N., Menard C., Chadwick K., Milosevic M., Catton C., Pintilie M., Chambers A. F., & Bristow R. G. (2012) Plasma osteopontin as a biomarker of prostate cancer aggression: relationship to risk category and treatment response. *Br J Cancer*.
- Tuck A. B. & Chambers A. F. (2001) The role of osteopontin in breast cancer: clinical and experimental studies. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 6: 419-29.
- 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: 859-68.
- van Dijk S., D'Errico J. A., Somerman M. J., Farach-Carson M. C., & Butler W. T. (1993) Evidence that a non-RGD domain in rat osteopontin is involved in cell attachment. *J Bone Miner Res* 8: 1499-506.
- Vordermark D., Said H. M., Katzer A., Kuhnt T., Hansgen G., Dunst J., Flentje M., & Bache M. (2006) Plasma osteopontin levels in patients with head and neck cancer and cervix cancer are critically dependent on the choice of ELISA system. *BMC Cancer* 6: 207.
- Wai P. Y. & Kuo P. C. (2004) The role of Osteopontin in tumor metastasis. *J Surg Res* 121: 228-41.
- Wang H. L., Ruan L. H., & Zhao X. Q. (2011a) [Expression of osteopontin and VEGF in acute leukemia and their relationship with angiogenesis]. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi* 19: 926-9.
- Wang H. L., Ruan L. H., & Zhao X. Q. (2011b) [Expression of osteopontin and VEGF in acute leukemia and their relationship with angiogenesis]. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi* 19: 926-9.
- Wang X., Chao L., Ma G., Chen L., Tian B., Zang Y., & Sun J. (2008) Increased expression of osteopontin in patients with triple-negative breast cancer. *Eur J Clin Invest* 38: 438-46.
- Weber G. F. (2011) The cancer biomarker osteopontin: combination with other markers. *Cancer Genomics Proteomics* 8: 263-88.
- Weber G. F., Ashkar S., & Cantor H. (1997) Interaction between CD44 and osteopontin as a potential basis for metastasis formation. *Proc Assoc Am Physicians* 109: 1-9.
- Weber G. F., Ashkar S., Glimcher M. J., & Cantor H. (1996) Receptor-ligand interaction between CD44 and osteopontin (Eta-1). *Science* 271: 509-12.
- Weber G. F., Lett G. S., & Haubein N. C. (2010a) Osteopontin is a marker for cancer aggressiveness and patient survival. *Br J Cancer* 103: 861-9.

- Weber G. F., Lett G. S., & Haubein N. C. (2010b) Osteopontin is a marker for cancer aggressiveness and patient survival. *Br J Cancer* 103: 861-9.
- Weber G. F., Lett G. S., & Haubein N. C. (2011a) Categorical meta-analysis of Osteopontin as a clinical cancer marker. *Oncol Rep* 25: 433-41.
- Weber G. F., Lett G. S., & Haubein N. C. (2011b) Categorical meta-analysis of Osteopontin as a clinical cancer marker. *Oncol Rep* 25: 433-41.
- Weber G. F., Zawaideh S., Hikita S., Kumar V. A., Cantor H., & Ashkar S. (2002) Phosphorylation-dependent interaction of osteopontin with its receptors regulates macrophage migration and activation. *J Leukoc Biol* 72: 752-61.
- Wright E. M. & Royston P. (1999) Calculating reference intervals for laboratory measurements. *Stat Methods Med Res* 8: 93-112.
- Wu C. Y., Wu M. S., Chiang E. P., Wu C. C., Chen Y. J., Chen C. J., Chi N. H., Chen G. H., & Lin J. T. (2007) Elevated plasma osteopontin associated with gastric cancer development, invasion and survival. *Gut* 56: 782-9.
- Young M. F., Kerr J. M., Ibaraki K., Heegaard A. M., & Robey P. G. (1992) Structure, expression, and regulation of the major noncollagenous matrix proteins of bone. *Clin Orthop Relat Res* 275-94.
- Young M. F., Kerr J. M., Termine J. D., Wewer U. M., Wang M. G., McBride O. W., & Fisher L. W. (1990) cDNA cloning, mRNA distribution and heterogeneity, chromosomal location, and RFLP analysis of human osteopontin (OPN). *Genomics* 7: 491-502.
- Yue T. L., McKenna P. J., Ohlstein E. H., Farach-Carson M. C., Butler W. T., Johanson K., McDevitt P., Feuerstein G. Z., & Stadel J. M. (1994) Osteopontin-stimulated vascular smooth muscle cell migration is mediated by beta 3 integrin. *Exp Cell Res* 214: 459-64.
- Zhang L., Hou X., Lu S., Rao H., Hou J., Luo R., Huang H., Zhao H., Jian H., Chen Z., Liao M., & Wang X. (2010) Predictive significance of bone sialoprotein and osteopontin for bone metastases in resected Chinese non-small-cell lung cancer patients: a large cohort retrospective study. *Lung Cancer* 67: 114-9.
- 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: 1061-70.
- 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: 118-30.

7. Anhang

7.1 Patientencharakteristika des Kontrollkollektivs

Tabelle 7.1a: Patientencharakteristika des Kontrollkollektivs

Klinik	Fall-Nr	Geschlecht	Alter [J]	Diagnose	OPN Blut [ng/ml]	OPN Liquor [ng/ml]

Neonatologie	121	männlich	0	Reifgeborenes	3049	-
	122	weiblich	0	Reifgeborenes	3078	-
	133	männlich	0	Reifgeborenes	3667	-
	138	männlich	0	Reifgeborenes	3042	-
	148	männlich	0	Reifgeborenes	2941	-
	157	weiblich	0	Reifgeborenes	1911	-
	158	männlich	0	Reifgeborenes	2676	-
	160	weiblich	0	Reifgeborenes	2680	-
	161	männlich	0	Reifgeborenes	2389	-
	167	männlich	0	Reifgeborenes	2750	-
	169	weiblich	0	Reifgeborenes	2234	-
	170	männlich	0	Reifgeborenes	2337	-
	177	männlich	0	Reifgeborenes	3157	-
	178	männlich	0	Reifgeborenes	2128	-
	179	männlich	0	Reifgeborenes	2123	-
	180	männlich	0	Reifgeborenes	1794	-
	181	weiblich	0	Reifgeborenes	2554	-
	182	männlich	0	Reifgeborenes	2784	-
	189	männlich	0	Reifgeborenes	1984	-
	190	weiblich	0	Reifgeborenes	2406	-
	191	männlich	0	Reifgeborenes	1903	-
	192	männlich	0	Reifgeborenes	1836	-
	193	weiblich	0	Reifgeborenes	1301	-
	196	männlich	0	Reifgeborenes	3098	-
	204	weiblich	0	Reifgeborenes	1997	-
	205	männlich	0	Reifgeborenes	1845	-
	206	weiblich	0	Reifgeborenes	2051	-
	212	weiblich	0	Reifgeborenes	2137	-
	213	männlich	0	Reifgeborenes	1885	-
	215	weiblich	0	Reifgeborenes	843	-
	220	männlich	0	Reifgeborenes	1917	-
	222	männlich	0	Reifgeborenes	2538	-
	224	männlich	0	Reifgeborenes	2858	-
	226	männlich	0	Reifgeborenes	2653	-
	227	männlich	0	Reifgeborenes	1282	-
	228	weiblich	0	Reifgeborenes	2468	-
	229	weiblich	0	Reifgeborenes	2162	-
Allg. Pädiatrie	20	weiblich	12	Gerinnungsdefekt	1640	-
	27	männlich	10	Autoimmunerkrankung	758	-
	32	weiblich	13	Infektionserkrankung	-	1462
	33	weiblich	7	Infektionserkrankung	-	3200
	36	männlich	11	Infektionserkrankung	-	1836
	37	weiblich	16	Autoimmunerkrankung	-	1751
	41	männlich	12	Epilepsie	-	1410
	42	weiblich	12	Epilepsie	-	361
	45	weiblich	10	Epilepsie	-	363
	46	weiblich	6	Infektionserkrankung	-	3181
	48	weiblich	11	Epilepsie	-	484
	51	männlich	0	Infektionserkrankung	-	472
	53	weiblich	0	Premature Thelarche	-	1724
	54	männlich	12	Epilepsie	-	2248
	58	weiblich	9	Epilepsie	-	2068
	59	männlich	1	Coxitis fugax & Gangataxie	-	586
	62	weiblich	14	Epilepsie	-	1350
	63	männlich	8	Epilepsie	-	3200
	68	weiblich	4	Epilepsie	-	482
	70	männlich	9	Epilepsie	-	750
	71	männlich	3	Epilepsie	-	324
	72	weiblich	7	Epilepsie	-	534
	73	männlich	10	Epilepsie	-	1411
	75	männlich	10	Epilepsie	-	429
	77	männlich	13	Infektionserkrankung	-	3113
	79	weiblich	-	Autoimmunerkrankung	-	1422
	81	männlich	7	Infektionserkrankung	-	409
	83	männlich	0	Infektionserkrankung	-	235
	84	männlich	4	Epilepsie	-	1060
	86	weiblich	15	Autoimmunerkrankung	-	327
	88	weiblich	9	Epilepsie	-	704
	90	männlich	12	Epilepsie	-	1129
	91	männlich	0	Nephropathie	-	574
	92	männlich	6	Epilepsie	-	651
	96	weiblich	14	Infektionserkrankung	-	2211
	98	weiblich	14	Autoimmunerkrankung	-	483
	99	männlich	14	Epilepsie	-	954
	100	weiblich	1	Infektionserkrankung	-	271
	102	männlich	13	Epilepsie	-	2841
	104	männlich	15	Infektionserkrankung	-	1219
	108	weiblich	16	Infektionserkrankung	-	1247
	109	männlich	7	Infektionserkrankung	-	2683
	112	weiblich	14	Autoimmunerkrankung	1271	-
	113	männlich	15	Autoimmunerkrankung	975	-
	114	weiblich	10	Infektionserkrankung	586	-
	115	männlich	7	Bauchtrauma	174	-
	116	männlich	5	Infektionserkrankung	2274	-
	117	männlich	10	Epilepsie	1429	-
	119	weiblich	12	Infektionserkrankung	1071	-

Klinik	Fall-Nr	Geschlecht	Alter [J]	Diagnose	OPN Blut [ng/ml]	OPN Liquor [ng/ml]
Allg. Pädiatrie (Fortsetzung)	120	männlich	0	Frühgeborenes	2737	-
	128	weiblich	2	Epilepsie	783	-
	129	weiblich	0	Frühgeborenes	5361	-
	130	weiblich	0	Frühgeborenes	4986	-
	142	männlich	0	Infektionserkrankung	1470	-
	143	männlich	10	Gerinnungsdefekt	943	-
	144	männlich	13	Wachstumstest	459	-
	145	weiblich	0	Bauchtrauma	1170	-
	146	männlich	5	Infektionserkrankung	638	-
	166	männlich	11	Stoffwechselsstörung	539	-
	171	männlich	3	Infektionserkrankung	994	-
	172	weiblich	0	Cataracta congenita	2044	-
	173	männlich	0	Nabel-und Leistenhernie	3235	-
	174	männlich	1	Infektionserkrankung	1773	-
	176	männlich	0	Frühgeborenes	4470	-
	185	männlich	9	Wachstumstest	714	-
	187	männlich	0	Nephropathie	4209	-
	188	weiblich	12	Infektionserkrankung	1067	-
	194	weiblich	2	Infektionserkrankung	1276	-
	195	weiblich	5	Infektionserkrankung	879	-
	197	männlich	0	Infektionserkrankung	3009	-
	200	männlich	10	Gerinnungsdefekt	684	-
	202	männlich	14	Gerinnungsdefekt	818	-
	208	männlich	5	Epilepsie	985	-
	209	männlich	13	Infektionserkrankung	1046	-
	210	männlich	2	Epilepsie	3010	3015
	214	weiblich	1	Intoxikation	1351	-
	217	männlich	5	Stoffwechselsstörung	519	-
	218	weiblich	3	Infektionserkrankung	1455	-
	219	männlich	11	Kleinwuchs	399	-
	221	weiblich	18	Wachstumshormonmangel	474	-
	223	männlich	7	Kleinwuchs	846	-
	225	weiblich	16	Vocal Cord Syndrom	269	-
	232	weiblich	3	Infektionserkrankung	1202	-
	233	weiblich	11	Autoimmunerkrankung	1237	-
	234	männlich	0	Klumpfüße beidseits	3342	-
	235	weiblich	7	Infektionserkrankung	1040	-
	236	weiblich	14	Autoimmunerkrankung	976	-
237	weiblich	5	Kleinwuchs	1034	-	
238	männlich	4	Unterschenkelfraktur	663	-	
239	weiblich	7	Infektionserkrankung	1472	-	
241	männlich	13	Infektionserkrankung	1191	-	
242	männlich	4	Epilepsie	776	-	
243	männlich	0	Stoffwechselsstörung	2792	-	
244	weiblich	5	Kleinwuchs	1014	-	
245	männlich	12	Kleinwuchs	715	-	
246	männlich	1	Infektionserkrankung	2892	-	
247	männlich	2	Infektionserkrankung	2786	-	
248	männlich	17	Infektionserkrankung	563	-	
249	weiblich	5	Kleinwuchs	1470	-	
250	männlich	4	Kleinwuchs	492	-	
251	weiblich	1	Infektionserkrankung	2324	-	
252	männlich	12	Bauchschmerzen	479	-	
253	männlich	9	Kleinwuchs	510	-	
254	männlich	1	Infektionserkrankung	730	-	
255	männlich	15	Epilepsie	805	-	
256	männlich	4	Wachstumshormonmangel	594	-	
257	männlich	10	Infektionserkrankung	1122	-	
258	weiblich	4	Infektionserkrankung	906	-	
259	männlich	2	Infektionserkrankung	1239	-	
260	männlich	6	Stoffwechselsstörung	923	-	
261	weiblich	3	Coxitis fugax	1383	-	
263	weiblich	17	Wachstumshormonmangel	635	-	
264	männlich	17	Infektionserkrankung	510	-	
265	männlich	1	Kryptorchismus beidseits	1059	-	
266	weiblich	17	Wachstumshormonmangel	464	-	
267	weiblich	2	Infektionserkrankung	1085	-	
268	weiblich	15	Infektionserkrankung	346	-	
269	weiblich	13	Autoimmunerkrankung	674	-	
270	männlich	4	Autoimmunerkrankung	714	-	
271	weiblich	6	Infektionserkrankung	2053	-	
272	weiblich	16	Epilepsie	447	-	
273	männlich	3	Epilepsie	366	-	
274	männlich	16	Epilepsie	327	-	
275	männlich	4	Infektionserkrankung	1315	-	
276	männlich	5	Epilepsie	847	-	
277	männlich	6	Epilepsie	633	-	
278	männlich	8	Infektionserkrankung	587	-	
279	männlich	16	Intoxikation	587	-	
280	männlich	6	Infektionserkrankung	788	-	
281	weiblich	6	Kleinwuchs	666	-	
282	weiblich	2	Epilepsie	741	-	
283	männlich	7	Epilepsie	952	-	
284	männlich	3	Infektionserkrankung	931	-	
287	männlich	8	Kleinwuchs	650	-	
288	männlich	5	Kleinwuchs	688	-	
289	männlich	6	Infektionserkrankung	1197	-	
290	männlich	6	Epilepsie	991	1673	
291	weiblich	14	Intoxikation	714	-	
292	weiblich	9	Epilepsie	498	-	
293	männlich	14	Peptischer Ulcus	732	-	
294	männlich	9	Epilepsie	641	-	
295	weiblich	18	Gesund	481	-	
296	weiblich	18	Gesund	283	-	
297	weiblich	18	Gesund	376	-	
298	männlich	9	Gesund	847	-	
300	männlich	9	Unterschenkelfraktur	836	-	
301	männlich	9	Infektionserkrankung	1950	-	
303	männlich	10	Infektionserkrankung	829	-	
305	männlich	10	Kleinwuchs	770	-	
307	männlich	8	Kleinwuchs	502	-	
308	männlich	8	Epilepsie	547	-	

7.2 Ethikvotum

Der Vorsitzende

Ärztekammer des Saarlandes - Postfach 10 02 62 - 66002 Saarbrücken
Ethik-Kommission

Herrn Professor
Dr. med. N. Graf
Direktor der Klinik für Pädiatrische Onkologie
und Hämatologie
Universitätsklinikum des Saarlandes
66421 Homburg

Ärztekammer
des Saarlandes
Körperschaft
des öffentlichen Rechts



Ethik-Kommission

Geschäftsstelle

Falkenstraße 4
66111 Saarbrücken
Telefon Durchwahl (06 61) 40 03 - 378
Telefax (06 61) 46 03 - 304
E-Mail: ethikkommission@arzte-saar.de
Internet: www.arzte-saar.de

Unter Zeichen:

Ihr Schreiben vom:

Ihr Zeichen:

Datum:

159/06

02. Okt. 2012

**Osteopontin als Tumormarker bei Rhabdoidtumoren bei Diagnose und im Verlauf
Erstellung von Referenzwerten von Osteopontin bei pädiatrischen Patienten**
Unsere Kenn-Nr. 159/06 (siehe stets angeben)

Sehr geehrter Herr Kollege Graf!

Die Ethik-Kommission hat sich in ihrer Sitzung am 21.09.2006 mit Ihrem Antrag vom
05.09.2006, Eingang hier: 07.09.2006, auf Prüfung des o.a. Forschungsvorhabens befasst
und diskutiert.
Die von uns am 25.09.2006 übermittelte Mängelliste wurde von Ihnen mit Schreiben vom
10.08.2012 beantwortet, sodass die Kommission nun ein positives Votum erteilen kann.

**Unter Bezugnahme auf § 2 des Statuts der Ethik-Kommission
bei der Ärztekammer des Saarlandes bestehen gegen die
Durchführung des beabsichtigten Forschungsvorhabens
keine Bedenken.**

Wir machen darauf aufmerksam, dass die Ethik-Kommission mit ihrer Stellungnahme
lediglich eine Hilfestellung bei der Beurteilung ethischer und rechtlicher Gesichtspunkte
eines geplanten Forschungsvorhabens gibt. Verantwortlich für die Planung
und Durchführung bleibt der zuständige ärztliche Leiter des Forschungsvorhabens.

Bei Änderungen des Forschungsvorhabens vor oder während der Durchführung be-
darf es nochmals eines entsprechenden Antrages vor der Änderung.

Wir machen ausdrücklich darauf aufmerksam, dass bei erkennbarer Trendwende mit
negativem Ergebnis des Forschungsvorhabens abubrechen ist.

-2-

Die Ethik-Kommission bei der Ärztekammer des Saarlandes ist unter Beachtung der internationalen Richtlinien der ICH, GCP u. der 12. Novelle
AMG 1986, nach Landesrecht (Saarländisches Heilberufekammergesetz, § 5 Abs. 1) anerkannt und beim Bundesinstitut für Arzneimittel und
Medizinprodukte gem. § 22 des Medizinproduktegesetzes sowie beim Bundesamt für Strahlenschutz nach § 92 der Strahlenschutzverordnung
und nach § 26g der Röntgenverordnung registriert.

Commerzbank Saarbrücken
Kto.-Nr. 33 09 200
BLZ 330 400 00

DL Apotheken- und Ärztebank Saarbrücken
Kto.-Nr. 0 001 920 200
BLZ 560 906 26

Postbank Saarbrücken
Kto.-Nr. 85 13 600
BLZ 660 100 66

Bank 1 Saar Saarbrücken
Kto.-Nr. 157 9007
BLZ 561 900 00

7.3 Statistisches Datenblatt: Intraassay und Interassay

Interne Qualitätssicherung
Kontrollserien Boehringer Mannheim



Statistisches Rechenblatt *INTRASSAY*

Datum Serie	n	x_i	$x_i - \bar{x}$	$(x_i - \bar{x})^2$
28.02.08	1	68,182	-1,451	2,105
"	2	71,311	1,678	2,816
"	3	71,199	1,566	2,452
"	4	71,925	2,292	5,253
"	5	73,769	4,136	17,106
"	6	73,657	4,024	16,193
"	7	69,858	0,225	0,051
"	8	70,249	0,616	0,379
"	9	73,266	3,633	13,199
"	10	66,059	-3,574	12,773
"	11	67,400	-2,233	4,986
"	12	70,864	1,231	1,515
"	13	67,958	-1,675	2,806
"	14	69,243	-0,390	0,152
"	15	70,640	1,007	1,014
"	16	71,031	1,398	1,954
"	17	64,941	-4,692	22,015
"	18	66,673	-2,960	8,762
"	19	67,064	-2,569	6,600
"	20	70,026	0,393	0,154
"	21	65,779	-3,854	14,853
"	22	69,467	-0,166	0,028
"	23	71,087	1,454	2,114
"	24	71,367	1,734	3,007
"	25	68,238	-1,395	1,946
"	26	66,841	-2,792	7,735
"	27	70,361	0,728	0,530
"	28	71,758	2,125	4,516
"	29	67,791	-1,842	3,393
"	30	68,517	-1,116	1,245
"	31	69,970	0,337	0,114
"	32	69,467	-0,166	0,028
"	33	70,193	0,560	0,314
"	34	70,640	1,007	1,014
"	35	68,685	-0,948	0,899
"	36	71,311	1,678	2,816

Bestandteil: *Human-Osteopontin*
Methode: *Elica*
Kontrollserum: *Standard (80 ng/ml) - POOL*
Maßeinheit: *ng/ml*

1. Mittelwert

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n} = \frac{2506,787}{36} = \underline{\underline{69,633}}$$

2. Standardabweichung

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} = \sqrt{\frac{167,443}{35}} = \sqrt{4,784} = \underline{\underline{2,19}}$$

3. Variationskoeffizient

$$VK = \frac{s \cdot 100}{\bar{x}} = \frac{2,19}{69,633} = \underline{\underline{3,15\%}}$$

4. Warngrenzen
 obere: $\bar{x} + 2s = \underline{\underline{74,013}}$
 untere: $\bar{x} - 2s = \underline{\underline{65,253}}$

5. Kontrollgrenzen
 obere: $\bar{x} + 3s = \underline{\underline{76,203}}$
 untere: $\bar{x} - 3s = \underline{\underline{63,063}}$

Bemerkungen: *Für den Standard-Pool wurden alle Standards gesammelt und am Messstag gemischt => Werte etwas niedriger!*

28.03.08

Datum: $\sum x_i = 2506,787$ $\sum (x_i - \bar{x})^2 = 167,443$

Umschritt



Statistisches Rechenblatt

INTERASSAY

Datum Serie	n	x_i	$x_i - \bar{x}$	$(x_i - \bar{x})^2$
22.11.06	1	84,825	3,491	12,187
29.11.06	2	75,555	-5,779	33,397
13.12.06	3	76,410	-2,924	8,550
16.01.07	4	81,075	-0,259	0,067
17.01.07	5	83,673	2,339	5,471
15.02.07	6	84,432	3,098	9,598
15.03.07	7	97,168	15,834	250,716
17.04.07	8	75,175	-6,159	37,933
20.04.07	9	87,629	6,215	38,636
25.04.07	10	72,203	-9,131	83,375
28.06.07	11	65,114	-16,220	263,088
27.09.07	12	94,953	13,619	185,477
19.12.07	13	81,030	-0,304	0,092
26.02.08	14	77,460	-3,814	14,508
	15			
	16			
	17			
	18			
	19			
	20			
	21			
	22			
	23			
	24			
	25			
	26			
	27			
	28			
	29			
	30			
	31			

$\Sigma x_i = 1138,682$ $\Sigma (x_i - \bar{x})^2 = 944,335$

Bestandteil: Human-Osteopodin
 Methode: Elisa
 Kontrollserie: Standard (80 ng/ml)
 Chargen-Nr.: _____
 Maßeinheit: ng/ml

1. Mittelwert

$$\bar{x} = \frac{\Sigma x_i}{n} = \frac{1138,682}{14} = \underline{\underline{81,334}}$$

2. Standardabweichung

$$s = \sqrt{\frac{\Sigma (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} = \sqrt{\frac{944,335}{13}}$$

$$= \sqrt{72,641} = \underline{\underline{8,523}}$$

3. Variationskoeffizient

$$VK = \frac{s \cdot 100}{\bar{x}} = \frac{852,3}{81,334} = \underline{\underline{10,48\%}}$$

4. Warngrenzen
 obere: $\bar{x} + 2s = \underline{\underline{102,294}}$
 untere: $\bar{x} - 2s = \underline{\underline{60,374}}$

5. Kontrollgrenzen
 obere: $\bar{x} + 3s = \underline{\underline{112,774}}$
 untere: $\bar{x} - 3s = \underline{\underline{49,894}}$

Bemerkungen: _____

28.03.08

Datum

Unterschrift

7.4 Publikationen

Die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten wurden bisher auf nationalen und internationalen Kongressen in Form von Vorträgen und Postern präsentiert:

Vortrag im Rahmen der pädiatrischen Forschungstage „48th Workshop of Pediatric Research“ in Hamburg, 12-13.09.2012

Veröffentlichung des Abstracts:

Osteopontin in childhood cancer

N. Nourkami-Tutdibi, E.Tutdibi, R.Baier, N. Graf

European Journal of Pediatrics, Volume 171, Number 9, September 2012

Posterpräsentation im Rahmen des “44th Congress of International Society of Pediatric Oncology (SIOP) 2012” in London, United Kingdom, 05.10-08.10.2012

Veröffentlichung des Abstracts:

Osteopontin as a potential clinical tumour marker for childhood cancer

N. Nourkami-Tutdibi, E.Tutdibi, R.Baier, N. Graf

Pediatric Blood & Cancer, Volume 59, Issue 6, December 1, 2012

7.5 Erklärung an Eides Statt

Ich, Nasenien Nourkami-Tutdibi, geboren am 10.01.1981 in Speyer, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Osteopontin im Kindesalter bei Kindern mit und ohne Tumorerkrankung: Erstellung altersspezifischer Referenzwerte für Osteopontin in Liquor und Blutplasma“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.