

TUM Fakultät für Medizin

Charakterisierung von Lymphozyten bei Sarkomen

Regina Indra Imgrund

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

Vorsitzende/-r: Prof. Dr. Marcus Makowski

Prüfende/-r der Dissertation:

1. Priv.-Doz. Dr. Peter Prodingner

2. Prof. Dr. Franz Schilling

Die Dissertation wurde am 21.01.2021 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch
die Fakultät für Medizin am 08.06.2021 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	5
1 Einleitung	6
1.1. Maligne, mesenchymale Tumore	6
1.1.1 Diagnostik mesenchymaler Tumoren	6
1.1.2 Staging und Grading	6
1.1.3 TNM- Klassifikation maligner Tumore (UICC)	7
1.1.4 Grading	7
1.1.5 Therapie und Resektionsränder	8
1.1.6 Resektionsränder	8
1.2.1 Osteosarkome	9
1.2.2 Liposarkom	12
1.2.3 Chondrosarkom	14
1.3. Benigne, mesenchymale Tumore	15
1.3.1 Osteochondrom	15
1.3.2 Lipom und multiple Lipome	15
1.3.3 Enchondrom	16
1.4 Das Immunsystem	17
1.4.1 B- Zellen	17
1.4.2 T-Zellen	17
1.4.3 Natürliche Killerzellen	18
1.4.4 Regulation der NK- Zellen	18
1.4.5 Natürliche Killerzell-Rezeptoren	19
1.4.6 Die einzelnen Zellmarker in der Übersicht	21
1.5 Fragestellung	22
2 Material und Methoden	
2.1 Material	23
2.1.1 Patientenkollektiv	23
2.1.2 Geräte	24
2.1.3 Verbrauchsmaterialien	24
2.1.4 Chemikalien	24
2.1.5 Panel für NK Analyse	25
2.1.6 Facs- Antikörper	27
2.2. Methoden	28
2.2.1 Durchführung der venösen Blutabnahmen	28
2.2.2 Transport des Blutes	28
2.2.3 Bearbeitung der Blutprobe	28
2.2.4 Vorbereitung der Proben	28
2.2.5 Bestimmung der Zellzahl	29
2.2.6 Durchflusszytometrische Messung	29
2.2.7 Prinzip der Durchflusszytometrie	30

2.2.8	Isotypenkontrolle	30
2.2.9	Störgrößen	31
2.2.10	Statistik	31
2.2.11	Überlegungen zur Statistik und der experimentellen Methodik	31
3.	Ergebnisse	33
3.1	Osteosarkome	33
3.1.1	Zusammenfassung der Ergebnisse der Patienten mit einem Osteosarkom	33
3.1.2	Einzelergebnisse Osteosarkome	35
3.1.3	Zeitlicher Verlauf der prozentualen Zellzusammensetzung beim Osteosarkom für B-, T- und NK-Zellen	35
3.1.4	Zeitlicher Verlauf der prozentualen Rezeptordichte beim Osteosarkom für B-, T- und NK-Zellen	37
3.1.5	Zeitlicher Verlauf der prozentualen Zellzusammensetzung beim Osteosarkom G2 für B-, T- und NK-Zellen	40
3.1.6	Zeitlicher Verlauf der prozentualen Rezeptordichte beim Osteosarkom G2 für B-, T- und NK-Zellen	41
3.1.7	Zeitlicher Verlauf der prozentualen Zellzusammensetzung beim Osteosarkom G3 für B-, T- und NK-Zellen	43
3.1.8	Zeitlicher Verlauf der prozentualen Rezeptordichte beim Osteosarkom G3 für B-, T- und NK-Zellen	45
3.1.9	Zeitlicher Verlauf der prozentualen Zellzusammensetzung beim Osteosarkom ohne Rezidiv für B-, T- und NK-Zellen	47
3.1.10	Zeitlicher Verlauf der prozentualen Rezeptordichte beim Osteosarkom ohne Rezidiv für B-, T- und NK-Zellen	49
3.1.11	Zeitlicher Verlauf der prozentualen Zellzusammensetzung beim Osteosarkom Rezidiv für B-, T- und NK-Zellen	51
3.1.12	Zeitlicher Verlauf der prozentualen Rezeptordichte beim Osteosarkom Rezidiv für B-, T- und NK-Zellen	53
3.2	Osteochondrome	54
3.2.1	Prozentuale Zellzusammensetzung beim Osteochondrom für B-, T- und NK-Zellen	54
3.2.2	Beschreibung der Rezeptorexpression beim Osteochondrom für B-, T- und NK-Zellen	55
3.3	Liposarkome	56
3.3.1	Zusammenfassung der Ergebnisse der Patienten mit einem Liposarkom	57
3.3.2	Einzelergebnisse der Patienten mit einem Liposarkom	58
3.3.3	Zeitlicher Verlauf der prozentualen Zellzusammensetzung beim Liposarkom für B-, T- und NK-Zellen	58
3.3.4	Zeitlicher Verlauf der prozentualen Rezeptordichte beim Liposarkom für B-, T- und NK-Zelle	60
3.3.5	Zeitlicher Verlauf der prozentualen Zellzusammensetzung beim	

	Liposarkom G1 für B-, T- und NK-Zellen	62
3.3.6	Zeitlicher Verlauf der prozentualen Rezeptordichte beim Liposarkom G1 für B-, T- und NK-Zellen	64
3.3.7	Zeitlicher Verlauf der prozentualen Zellzusammensetzung beim Liposarkom G3 für B-, T- und NK-Zellen	66
3.3.8	Zeitlicher Verlauf der prozentualen Rezeptordichte beim Liposarkom G3 für B-, T- und NK-Zellen	68
3.3.9	Zeitlicher Verlauf der prozentualen Zellzusammensetzung beim Liposarkom Rezidiv für B-, T- und NK-Zellen	69
3.3.10	Zeitlicher Verlauf der prozentualen Rezeptordichte beim Liposarkom Rezidiv für B-, T- und NK-Zellen	70
3.3.11	Zeitlicher Verlauf der prozentualen Zellzusammensetzung beim Liposarkom ohne Rezidiv für B-, T-, und NK-Zellen	71
3.3.12	Zeitlicher Verlauf der prozentualen Rezeptordichte beim Liposarkom ohne Rezidiv für B-, T- und NK-Zellen	73
3.4	Lipome	75
3.4.1	Prozentuale Zellzusammensetzung bei Lipomen für B-,T- und NK-Zellen	75
3.4.2	Beschreibung der Rezeptorexpression bei Lipomen für B-, T- und NK-Zellen	76
3.5	Chondrosarkome	77
3.5.1	Zusammenfassung der Ergebnisse der Patienten mit einem Chondrosarkom	78
3.5.2	Zeitlicher Verlauf der prozentualen Zellzusammensetzung beim Chondrosarkom für B-, T- und NK-Zellen	81
3.5.3	Zeitlicher Verlauf der prozentualen Rezeptordichte beim Chondrosarkom für B-, T- und NK-Zellen	83
3.5.4	Grading	84
3.5.5	Zeitlicher Verlauf der prozentualen Zellzusammensetzung beim Chondrosarkom G1 für B-, T- und NK-Zellen	84
3.5.6	Zeitlicher Verlauf der Rezeptorexpression beim Chondrosarkom G1 für B-, T- und NK-Zellen	87
3.5.7	Zeitlicher Verlauf der prozentualen Zellzusammensetzung beim Chondrosarkom G2 für B-, T- und NK-Zellen	88
3.5.8	Zeitlicher Verlauf der Rezeptorexpression beim Chondrosarkom G2 für B-, T- und NK-Zellen	90
3.5.9	Zeitlicher Verlauf der prozentualen Zellzusammensetzung beim Chondrosarkom G3 für B-, T- und NK-Zellen	92
3.5.10	Zeitlicher Verlauf der Rezeptorexpression beim Chondrosarkom G3 Für B-, T- und NK-Zellen	93
3.5.11	Chondrosarkome ohne Rezidiv	94
3.5.12	Zeitlicher Verlauf der prozentualen Zellzusammensetzung beim Chondrosarkom ohne Rezidiv für B-, T- und NK-Zellen	94
3.5.13	Zeitlicher Verlauf der Rezeptorexpression bei Chondrosarkomen ohne Rezidiv für B-, T- und NK-Zellen	96

3.5.14	Chondrosarkome mit Rezidiv	98
3.5.15	Zeitlicher Verlauf der prozentualen Zellzusammensetzung beim Chondrosarkom mit Rezidiv für B-, T- und NK-Zellen	99
3.5.16	Zeitlicher Verlauf der Rezeptorexpression bei Chondrosarkomen ohne Rezidiv für B-, T- und NK-Zellen	100
3.6	Enchondrome	101
3.6.1	Zeitlicher Verlauf der prozentualen Zellzusammensetzung bei Enchondromen für B-, T- und NK-Zellen	102
3.6.2	Beschreibung der Rezeptorexpression bei Enchondromen für B-, T- und NK-Zellen	103
4	Diskussion	104
4.1	Funktioneller Ausblick	118
5	Anhang	120
5.1	Abkürzungsverzeichnis	120
5.2	Abbildungsverzeichnis	122
5.3	Tabellenverzeichnis	126
5.4	Danksagung	131
5.5	Literaturverzeichnis	132
5.6	Lebenslauf	150

Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden mittels Durchflusszytometrie NK- Zellen, B- und T-Zellen von sechs Patientenkollektiven mit unterschiedlichen, mesenchymalen Tumoren (Lipome und Liposarkome; Osteome und Osteosarkome; Enchondrome und Chondrosarkome) untersucht.

Das Ziel der Arbeit war es, Rückschlüsse über Zahl und Eigenschaften der Lymphozyten vor und nach der Resektion der malignen oder benignen Tumore zu gewinnen.

Es konnte gezeigt werden, dass die Gesamtzahl der Lymphozyten im peripheren Blut bei den untersuchten Sarkomen und bei den benignen Tumoren erniedrigt bis normwertig war.

Darüber hinaus zeigte sich, dass die Zellzahl und die Aktivität der untersuchten Zellen bei Patienten mit Sarkomen tendenziell supprimiert war. Die gemessenen Zellzahlen und Rezeptordichten der Lymphozyten wiesen im Vergleich zu den benignen Tumoren nur geringgradige Unterschiede auf.

Die gemessenen NK-Zellmarker der Chondrosarkome G2 zeigten im Vergleich zu denen der Chondrosarkomen G1 präoperativ eine erhöhte Rezeptordichte. Gerade bei einem Grading G2 könnte ein verstärkter immuntherapeutischer Ansatz interessant sein. Die Chondrosarkome G1 zeigten hingegen eine Suppression der Zellzahl und der Aktivität der Lymphozyten.

Beim Chondrosarkom-Rezidiv zeigten sich tendenziell höhere Zellzahlen als beim Patientenkollektiv der rezidivfreien Chondrosarkome. In Bezug auf die Aktivität der einzelnen Lymphozyten zeigten v.a. die NK-Zellen bei den Patienten mit einem Rezidiv niedrigere Werte als beim Patientenkollektiv der rezidivfreien Chondrosarkome.

Beim Chondrosarkom-Rezidiv zeigte sich postoperativ eine vermehrte Zellaktivität für die NK-Zellmarker NKG2D+ und NKp30+.

Beim Osteosarkom G2 zeigte sich eine verstärkte Aktivität als bei G3 Osteosarkomen. Ähnlich wie bei den Chondrosarkomen G2 zeigte sich auch bei den Osteosarkomen G2 eine deutlichere Immunantwort bei den NK-Zellzahlen.

Bei den G1 Liposarkomen zeigte sich tendenziell eine erhöhte Zellzahl und eine vermehrte Aktivität der einzelnen Zellen, wobei die Aktivität der NK-Zellen zu Beginn der Messung beim G3 Liposarkom im Vergleich zum G1 Liposarkom für den Marker NKp46+ leicht erhöht war.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Aktivität der einzelnen Zellen umso geringer ist, je höher das Grading ist. Lediglich Chondrosarkome G2 und Osteosarkome G2 zeigten eine deutlichere Immunantwort, die sich jedoch bei höheren Gradings nicht mehr finden ließ.

Die Ergebnisse dieser Arbeit geben Ansatzpunkte, wie Sarkome zukünftig mit immuntherapeutischen Verfahren behandelt werden könnten, auch wenn die chirurgische, chemische und strahlentherapeutische Therapie derzeit weiterhin im Vordergrund steht.

Einleitung

Zunächst sollen in der vorliegenden Arbeit einige Grundkenntnisse über die hier untersuchten Sarkome, benignen Tumore und Lymphozyten erörtert werden.

1.1. Maligne, mesenchymale Tumore

Sarkome, als hintergründig zu untersuchende Entität und Inhalt dieser Doktorarbeit, sind maligne Tumore des Mesenchyms. Auch Tumore des peripheren Nervensystems werden darunter subsumiert, da sie in der klinischen Handhabung echten mesodermalen Neubildungen sehr ähneln (WHO-Klassifikation der Knochentumore, Lyon 2002, nach Fletcher et al. 2002). Die Klassifizierung erfolgt nach den führenden mesenchymalen Differenzierungen in z.B. Fett-, Binde- und Muskelgewebe.

Schätzungen zufolge machen Sarkome etwa 1% der malignen Tumore bei Erwachsenen aus. Bei Kindern haben sie eine relative Häufigkeit von etwa 15% aller Malignome (Sandberg et al., 1995). Die primäre Metastasierung von Sarkomen erfolgt hämatogen v.a. in die Lunge (-70%) (Billingsley et al., 1999). Seltener sind Skelett-, Leber-, Hirn-, oder Weichgewebismetastasen. Außer beim Angio- und Klarzellsarkom treten Metastasen in den Lymphknoten nur in 5% aller Fälle auf (Fong et al., 1993). Es wird angenommen, dass in den ersten zwei Jahren nach der Diagnose 90% der Metastasen entstehen.

1.1.1 Diagnostik mesenchymaler Tumoren

Je nach Sarkom treten diese unterschiedlich in Erscheinung und werden bei den einzelnen Entitäten gesondert besprochen. Osteo-, Lipo- und Chondrosarkome können beispielsweise erst relativ spät durch eine meist schmerzlose Schwellung auffallen.

Neben dem klinischen Erscheinungsbild kommt der Bildgebung und der Biopsie eine entscheidende Rolle bei der Diagnosesicherung zu.

Zum Einsatz kommen die Computertomographie (CT) und die Magnetresonanztomographie (MRT). Auch die Sonographie kann erste Hinweise auf die Lokalisation und Ausbreitung des Tumors bringen. Im weiteren Verlauf kann eine Angiographie zur besseren Übersicht über die Gefäßversorgung des Tumors angebracht sein. Eine konventionelle Röntgenaufnahme bzw. ein CT- Thorax können zur Abschätzung der Lungenmetastasierung notwendig sein.

1.1.2 Staging und Grading

Das Staging und Grading ist wesentlich für die Therapieplanung und die Prognose der Erkrankung.

Sarkome können nach histologischen und klinischen Informationen beurteilt werden. Das Staging kann anhand des American Joint Committee on Cancer (AJCC) und der Union Internationale Contre le Cancer (UICC) eingeteilt werden und beinhaltet die TMN-Klassifikation.

Die TMN-Klassifikation berücksichtigt den histopathologischen Malignitätsgrad, die Tumorgöße und –tiefe, den regionalen Lymphknotenstatus und das Vorhandensein von Fernmetastasen.

1.1.3 TNM- Klassifikation maligner Tumore (UICC, 2010)

T	Primärtumor
Tx	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
To	kein Anhalt für Primärtumor
T1	Tumor überschreitet Kortikalis nicht
T2	Tumor infiltriert jenseits der Kortikalis
N	Regionäre Lymphknoten
Nx	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N1	Regionäre Lymphknotenmetastasen
M	Fernmetastasen
Mx	Fernmetastasen können nicht beurteilt werden
Mo	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen

Tabelle 1: Übersicht über die TNM- Klassifikation maligner Tumore (UICC), am Beispiel des Osteosarkoms

1.1.4 Grading

Das Grading beinhaltet Aussagen über den Malignitätsgrad des Tumors und beurteilt den Differenzierungsgrad der Tumorzellen (G1-4, Gx), wobei Tumore mit einem G1 gut differenziert sind. G2 bedeutet eine mäßige Differenzierung. Während G3 schlecht differenziertes Gewebe ist und G4 undifferenzierten bzw. anaplastischen Zellen entspricht. Bei einem Gx ist der Grad der Differenzierung nicht beurteilbar.

Gx	Differenzierungsgrad kann nicht beurteilt werden
G1	gut differenziert
G2	mäßig differenziert
G3	schlecht differenziert
G4	Undifferenziert

Tabelle 2: Übersicht über das Grading

Basierend darauf können maligne Knochentumore stadienabhängig nach UICC gruppiert werden. Dabei gibt es vier Stadien mit entsprechenden Unterteilungen unter Berücksichtigung des Grading, und des TNM- Systems (Witteking et al., 1997), diese werden im Folgenden bei den einzelnen Entitäten dargestellt.

1.1.5 Therapie und Resektionsränder

Je nach Art des Sarkoms bestehen unterschiedliche Therapiekonzepte. In vielen Fällen ist unabhängig vom Konzept eine radikale Operation mit dem Ziel eines R0-Status anzustreben. Auch der (neo)-adjuvanten Chemotherapie, v.a. beim Osteosarkom oder einer Radiatio kommt große Bedeutung zu. Man unterscheidet zwischen einer marginalen, einer radikalen und einer weiten Resektion. Auf einen ausreichenden Sicherheitsabstand sollte geachtet werden. Mitunter muss auch eine Kompartimentresektion oder eine Amputation in Betracht gezogen werden. Schon bei der Biopsie ist es von entscheidender Bedeutung sich den späteren Operationszugang klar zu machen. Denn der, mit malignen Zellen kontaminierte Biopsieweg und ggfs. die Drainageausleitung müssen bei der definitiven Operation mit entfernt werden. Eine Radiatio kann bei einem R1-Status oder bei sehr knappen tumorfreien Rändern indiziert sein. Billingsley zeigte 1999 bereits, dass es bei Patienten mit einem high-grade Tumor (Tumorgroße über 5cm, subfaszial oder extrakompartimental gelegen) in 40-60% zu einer Metastasierung, v.a. in die Lunge kommt. Der Chemotherapie kommt hier eine besondere Bedeutung zu.

1.1.6 Resektionsränder: (Page et al., 2010)

R0	Kein Residualtumor
R1	Residualtumor nur mikroskopisch
R2	Residualtumor makroskopisch nachweisbar

Tabelle 3: Übersicht über die Resektionsränder

1.2.1 Osteosarkom

Laut WHO- Definition ist das Osteosarkom ein hochmaligner Tumor und wird in periostale und parostale Formen untergliedert. Die histologische Untergliederung differenziert zwischen nicht produktiven Formen bzw. produktiven osteoblastischen-, schlecht differenzierten-, chondroblastischen-, fibroblastischen-, teleangiektatischen Formen und Riesenzelltypen. Histologisch charakterisierend ist die Bildung von Osteoid. Der Nachweis von Knochen oder Osteoid sichert die Diagnose eines Osteosarkoms; auch wenn die Genese unklar bleibt (Bielack et al., 2006). Histologisch lassen sich ferner ausgedehnte Tumornekrosen finden (Freyschmidt et al., 2003).

Stadiengruppierung der malignen Knochentumore nach UICC (Sobin et al., 2002)

	G1	T1	N0	M0
Stadium IA	G1	T1	N0	M0
	G2	T1	N0	M0
Stadium IB	G1	T2	N0	M0
	G2	T2	N0	M0
Stadium IIA	G3	T1	N0	M0
	G4	T1	N0	M0
Stadium IIB	G3	T2	N0	M0
	G4	T2	N0	M0
Stadium III	Nicht definiert			
Stadium IVA	Jedes G	Jedes T	N1	M0
Stadium IVB	Jedes G	Jedes T	Jedes N	M1

Tabelle 5: Die Tabelle zeigt die Stadiengruppierung der malignen Knochentumoren nach UICC

Seit 2003 gilt die TMN-Klassifikation nach UICC und AJCC (Witteking et al., 1997; Greene et al., 2002). Der größte Tumordurchmesser bestimmt nun das T-Stadium und nicht mehr das Erreichen der Kortikalis. Im T3-Stadium bestehen Skipmetastasen. Fernmetastasen werden über das M-Stadium erfasst. Diese Tumoren zeigen ein schnelles Wachstum und können zu einer Knochendestruktion im Sinne einer Osteolyse durch vermehrte Osteoklastenaktivität oder zu einer Vermehrung der Konchensubstanz durch vermehrte Osteoblastenaktivität führen. Osteosarkome machen nur 0,1% aller Tumore aus, davon ist das medulläre Osteosarkom mit 29% das häufigste Sarkom aller Knochentumore (Winkelmann et al., 2005). Selten werden Osteosarkome durch eine Strahlenbelastung induziert (Adler et al., 1998; Thomas et al., 1996).

Das Osteosarkom wird auch als Tumor des Wachstumsalters bezeichnet, da es einen Erkrankungsgipfel zwischen dem 15. und 25. Lebensjahr aufweist (Bielack et al., 1999; Bielack et al., 2006). Das Osteosarkom hat eine Inzidenz von 2-3/1.000.000 pro Jahr (Freyschmidt et al., 2003; Freyschmidt et al., 2000).

Nach der Lokalisation des tumorösen Gewebes erfolgt die Klassifikation in einen medullären, juxtakortikalen und in einen intrakortikalen Typ (Bacci, et al., 1998). Vereinzelt können auch extraossäre Osteosarkome oder sekundäre Formen bei einer Ostitis deformans Paget auftreten (Sluga et al., 2002). Das Osteosarkom findet sich bevorzugt kniegelenksnah in den langen Röhrenknochen (Winkler et al., 1993; Bielack et al., 2002) und metastasiert frühzeitig hämatogen in die Lunge. Ein Lymphknotenbefall ist selten (Bieling et al., 1996).

Die Symptome sind unspezifisch und die Erstmanifestation fällt häufig durch lokale Schmerzen zuerst auf. Eine lokale Schwellung oder eine lokale Hyperthermie können die Schmerzsymptomatik begleiten (Picci et al., 1994). Die Diagnose erfolgt anhand der Klinik, der Bildgebung und schließlich über eine Biopsie.

Bei der Therapie richtet man sich nach dem multimodalen Schema des COSS- Protokolls, bestehend aus prä- und postoperativer Chemotherapie und der operativen Resektion. Die fünf-Jahres Überlebensrate liegt bei 50-80% (Korholz et al., 1998; Rodriguez- Galindo et al., 2004; Freyschmidt et al., 2010). Die Resektionsgrenzen und das Ansprechen auf die Chemotherapie beeinflussen die Prognose (Krämer et al., 1998; Meyers et al., 1998; Meyers et al., 2008). Eine schlechte Prognose haben Rezidive, die in 30% der Fälle innerhalb von zwei Jahren auftreten (Schumacher et al., 2000; Rodriguez- Galindo et al., 2004; Korholz et al., 1998; Thomas et al., 1996).



Abbildung 1: Enchondrom. Die seitliche Aufnahme des Knies zeigt eine dichte Läsion, die etwas amorph ist und sich in den Markraum des Knochens projiziert (Pfeile). Die gute Begrenzung der Läsion spricht für ein Enchondrom. Differenzialdiagnostisch muss an ein niedriggradiges medulläres Chondrosarkom gedacht werden (Fred et al., 2005).



Abbildung 2: Osteosarkom der Knieregion. Destruierende, zentral sitzende Läsion im distalen Femur eines 8 Jahre alten Mädchens (Fred et al., 2005).

1.2.2 Liposarkom

Das Liposarkom ist eine maligne Neoplasie, deren Phänotyp Fett „rekapituliert“ (Breitenseher et al., 2008). Histologisch lassen sich atypische Lipoblasten in verschiedenen Differenzierungsstadien finden (Goldmann et al., 1964). Liposarkome werden in myxoid-rundzellige, hochdifferenzierte, dedifferenzierte und pleomorphe Liposarkome eingeteilt. Den größten Anteil nehmen die myxoiden Liposarkome mit 45-55% ein. Myxoid-rundzellige Liposarkome weisen ein dichtes plexiformes Kapillarnetz auf.

Staging-System für Weichteilsarkome (darunter fällt das Liposarkom) AJCC / UICC (Fletcher et al., 2002)

T1	= 5 cm
T1a	superficial to muscular fascia epifazial gelegen
T1b	deep to muscular fascia subfazial gelegen
T2	> 5cm
T2a	epifazial gelegen
T2b	subfazial gelegen
deep to muscular fasci	

Tabelle: 4 Die Tabelle zeigt das Staging-System für Weichteilsarkome nach AJCC / UICC.

Das Liposarkom des Knochens ist ebenfalls ein primär maligner mesenchymaler Tumor. Dieser Tumor muss definitionsgemäß primär im Knochen entstanden sein, d.h. er darf keiner metastatischen Absiedlung entsprechen und nicht vom Paraossalbereich mit sekundärer Beteiligung von Kortex und Knochenmark abstammen (Dawson et al., 1955).

Trotz eines polymorphen Bilds muss für die Diagnose eines Liposarkoms eine Prädominanz von unreifen pleomorphen Lipoblasten vorhanden sein (Goldman et al., 1964). Liposarkome sind mit 10-20% die häufigsten malignen Weichteiltumore des Erwachsenen (Böcker et al., 1997).

Hochdifferenzierte Liposarkome (G1) neigen zu lokalen Rezidiven. Zu Metastasen kommt es nicht, da es sich meist um einen lipomähnlichen Tumor handelt. Zu Kernatypien und Größenunterschieden der adipozytären Tumorzelle kommt es allerdings. Pleomorphe Liposarkome zeigen multivakuäre Lipoblasten und lassen sich so von anderen pleomorphen Liposarkomen abgrenzen (Fletcher et al., 2002, Issels et al., 1998, Reitan et al., 2002). Überwiegend treten Liposarkome in der 6. Lebensdekade auf, wobei der Anteil der Männer mit 3:1,3 leicht überwiegt. Andere Darstellungen sprechen von einer gleichen Häufigkeit in Bezug auf die Geschlechterverteilung in der 3., 4. und 5. Dekade (Zornig et al., 1997). Ein exogener Faktor für die Pathogenese von Liposarkomen kann eine vorangegangene Strahlentherapie darstellen. Zusätzlich tritt ein Liposarkom gehäuft bei Neurofibromatose Typ 1, tuberöser Sklerose, intestinaler Polyposis und beim Gardner-Syndrom auf (Rozenal et al., 2002). Liposarkome verteilen sich vornehmlich auf die untere Extremität, besonders betroffen ist der Oberschenkel. Auch im Retroperitoneum, im Schultergürtel und am Humerus kommen sie vor (Enzinger et al., 1998). Die meisten Liposarkome befinden sich im tieferen und nicht im superfiziellen Weichteilgewebe (Weiss et al., 1998).

Die Patienten stellen sich meist mit einer Weichteilschwellung, seltener mit einer schmerzhaften Bewegungseinschränkung vor (Geer et al., 1992). Die Diagnose wird oft erst in einem späten Stadium gestellt (Demas et al., 1998; Einarsdottir et al., 1999). Die Diagnostik erfolgt mit Hilfe der Magnet-Resonanz-Tomographie (MRT) und/oder der Computer-Tomographie (CT). Diese Verfahren lassen Rückschlüsse auf die lokale Ausbreitung des Tumors und auf eine etwaige hämatogene oder lymphogene Metastasierung zu (Steinau et al., 2001, O'Sullivan et al., 2003). Grading und Staging sind für eine adäquate Therapie die Voraussetzung.

Das Verfahren der Wahl ist eine Resektion im Gesunden mit ausreichendem Sicherheitsabstand. Als Standardtherapie kann man heute die postoperative adjuvante Strahlentherapie in R1-Fällen bei höhergradigen Tumoren ansehen. Die Erfahrung in Bezug auf eine präoperative und auf eine intraoperative Bestrahlung ist begrenzt (Issels et al., 2002; Niewald et al., 2004). Als eine weitere Option ist die Chemotherapie anzusehen (Berger et al., (1997). In erster Linie metastasieren Liposarkome hämatogen, am häufigsten in die Lunge (70%) (Linehan, et al., 2000). Seltener sind Leber- und Hirnmetastasen. Primäre Lebermetastasen finden sich bei fast ausschließlich retroperitoneal und viszerale Sarkomen. Lymphknotenmetastasen machen etwa 5% aus. Liposarkome sind eine heterogene Gruppe maligner Erkrankungen, die bei entsprechender Behandlung auch vollständig remittieren können. Allerdings ist die Diagnose schwierig und der Tumor wird oft erst spät erkannt (Köhler et al., 2003).

1.2.3 Chondrosarkom

Laut der WHO- Einteilung von 2002 wird das Chondrosarkom als maligner Tumor mit rein hyalinknorpeliger Differenzierung bezeichnet. Myxoide Veränderungen, Kalzifikationen oder Ossifikationen kommen vor. Die Zellen des Chondrosarkoms bilden Knorpel, aber keinen Knochen. Der maligne Tumor zeigt im Vergleich zum Chondrom einen stärkeren Zellreichtum und eine stärkere Pleomorphie. Plumpe Zellen mit großen Kernen, Doppelkerne oder Mitosen sind selten (Weber et al., 1988).

Chondrosarkome können in jedem Lebensalter vorkommen, gehäuft aber im Erwachsenenalter (Rössler et al., 1997). In der Regel sind Patienten über 30 Jahren betroffen. Das Chondrosarkom kann von einem lokal aggressiven und nicht metastasierten Tumor (Grad I) bis zu einem unter Umständen tödlich verlaufenden dedifferenzierten Chondrosarkom (Grad IV) reichen.

Das Chondrosarkom macht 20% der malignen Knochentumore aus (Rosenberg et al., 2003) und tritt bevorzugt in den stammnahen Röhrenknochen und dem Becken auf. Bevorzugt werden Femur, Becken, Humerus, Rippen, Tibia und Scapula befallen (Schajowicz et al., 1994). Die Malignität ist umso größer, je zentraler das Chondrosarkom liegt (Grabias et al., 1974). Chondrosarkome werden in primäre und sekundäre Knorpelgeschwülste unterteilt. Die Ätiologie des primären Chondrosarkoms ist nicht geklärt. Zum primären Chondrosarkom gehören, laut WHO-Klassifikation:konventionelles-,dedifferenziertes-,juxtakortikales-, mesenchymales Chondrosarkom und Klarzellchondrosarkom.

Sekundäre Chondrosarkome entstehen durch maligne Entartung aus kartilaginären Exostosen oder Chondromen. Die maligne Entartung aus solitären Exostosen ist selten. Ein erhöhtes Risiko findet sich bei der Enchondromatose, dem Morbus Ollier und beim Mafucci-Syndrom (Steinau et al., 2011). Das Malignitätsrisiko liegt bei solitären Osteochondromen bei 1% und für multiple hereditäre kartilaginäre Exostosen bei 10% (Huvos et al., 1972). Auch wurden Chondrosarkome beim Knocheninfarkt (Weber et al., 1988) dem Morbus Paget und bei fibröser Dysplasie (Evans et al., 1977; Pritchard et al., 1980) beschrieben.

Im Röntgenbild findet man Osteolysen und intratumorale Verkalkungen. Typisch ist eine wolkenartig blasenartige Auftreibung des Knochens mit zentralen Verkalkungen. Symptomatisch wird es durch Schmerzen und oder eine Schwellung. Der Differenzierungsgrad bestimmt die Malignität. Das Chondrosarkom metastasiert vorwiegend hämatogen in die Lunge und selten lymphogen (Campanacci et al., 1968; Bruns et al., 2001).

Das wichtigste Therapieprinzip beim Chondrosarkom ist die operative Tumoresektion. Eine Strahlentherapie ist nur im Einzelfall zu erwägen, da Chondrosarkome wenig strahlensensibel sind. Nicht sicher nachgewiesen ist die Wirksamkeit der adjuvanten Chemotherapie. Erfolgsversprechend scheint eine Chemotherapie bei G3-Chondrosarkomen mit einem hohen Metastasierungsrisiko zu sein (Assenmacher et al., 1999) geben die 10 Jahres Überlebensrate je nach Differenzierungsgrad des Sarkoms wie folgt an: G1: 40- 80%, G2: 40- 60%, G3: 15- 35%. Eine schlechte Prognose haben Chondrosarkome mit abnehmendem Differenzierungsgrad. Auch eine stammnahe Lokalisation ist ungünstig.

1.3 Benigne mesenchymale Tumore

1.3.1 Osteochondrom

Die WHO definiert das Osteochondrom als einen kappenartigen, mit Knorpelgewebe überzogenen, knöchernen Vorsprung auf der Außenfläche des Knochens.

Typischerweise finden sich Osteochondrome in den langen metaphysären Röhrenknochen mit einem starken Längswachstum, z.B. der distalen Femurmetaphyse sowie der proximalen Humerus- und Tibiametaphyse.

Das Osteochondrom ist mit einer Inzidenz von 40% der häufigste aller benignen Knochentumore. Die Dunkelziffer könnte deutlich höher sein, da viele Osteochondrome asymptomatisch bleiben und sich so der Diagnostik entziehen. Meist weisen die Patienten aber multiple Läsionen auf und die Diagnose erfolgt im Kindesalter bzw. bis in die dritte Lebensdekade. Eine Geschlechterbevorzugung ließ sich hier nicht nachweisen.

Symptome können sich als Schmerzen oder als Komplikationen durch eingeklemmte Nerven oder mechanische Obstruktion bemerkbar machen. Nach Abschluss des Knochenwachstums kommt es zu keiner weiteren Tumorzunahme.

Die Diagnose erfolgt aufgrund der Klinik und der Bildgebung. Das Osteochondrom zeigt im Röntgenbild ein pilzförmiges Wachstum mit einer knorpeliger Kappe (Khurana et al., 2002). Sehr selten kann sich aus dem Knorpelüberzug auch ein sekundäres Chondrosarkom entwickeln (Freyschmidt et al., 2003). Eine operative Abtragung erfolgt bei Beschwerden, lokalen Druckerscheinungen im Sinne von Funktionsbehinderungen oder Irritation an Gefäßen oder Nerven und bei raschem Wachstum (Breusch et al., 2009).

1.3.2 Lipom und multiple Lipome

Das Lipom des Knochens ist eine gutartige Neoplasie aus Adipozyten, die sich im Knochenmarksraum, in der Kortikalis und auf der Oberfläche des Knochens entwickeln. Lipome finden sich aber vor allem gehäuft im subkutanen Fettgewebe (epifaszial). Als bevorzugte Lokalisationen kommen der Nacken, die Schultern und der Rücken in Frage. Sie sind nicht schmerzhaft, weich und verschieblich. Grundsätzlich betreffen sie jede Altersgruppe wobei es einen Gipfel zwischen dem 40.-60. Lebensjahr gibt. Multiple Lipome treten 3 mal häufiger bei Männern als bei Frauen auf, 5-8% aller Lipome treten in größerer Anzahl auf. Eine familiäre Häufung scheint zu bestehen, desweiteren ein Zusammenhang mit der Neurofibromatose und dem MEN- Syndrom (Salam et al., 2002; Hofmann et al., 1998). 1946 wurden von Hofmann (Hofmann et al., 1998) infiltrierende intramuskuläre Lipome als eigene Entität kategorisiert. Sie sind oft tief in der Skelettmuskulatur lokalisiert. Monovakuläres Fettgewebe findet sich zwischen den Muskelfasern und verdrängt die Myozyten, dies kann bis zum völligen Ersatz der Muskulatur durch Fettgewebe führen. Klinisch besteht eine schmerzlose Schwellung. Die Abgrenzung zum Liposarkom erfolgt histologisch (Hofmann et al., 1998). Bei Beschwerden oder unter kosmetischen Gesichtspunkten können Lipome operativ entfernt werden.

1.3.3 Enchondrom

Die WHO beschreibt Enchondrome als gutartige Tumore, die durch die Bildung von reifen Knorpelzellen ohne histologische Zeichen des Chondrosarkoms (hohe Zelldichte, Pleomorphie großer Zellen mit Doppelkernen oder Mitosen) charakterisiert sind. Eine Theorie zur Entstehung des Enchondroms geht davon aus, dass dysplastische Chondrozyten der Wachstumsfuge nicht an der Ossifikation teilhaben und im Bereich der Metaphyse verbleiben. Im Rahmen des Knochenwachstums gelangen sie dann in den Schaft des Knochens (Mirra et al., 1989).

Enchondrome bestehen aus hyalinem Knorpelgewebe und sitzen in der Markhöhle des Knochens. Sie machen 10-12% aller benignen Knochentumore aus. Sie wachsen langsam und führen selten zu Beschwerden. Mit 54% sind Männer etwas häufiger als Frauen betroffen (Adler et al., 1983). Enchondrome können solitär oder gehäuft vorkommen. Das Vorhandensein von multiplen Enchondromen kann beim Morbus Ollier oder dem Mafucci-Syndrom beobachtet werden. Beim Morbus Ollier treten die multiplen Enchondrome nur in einer Körperhälfte auf. Beim Mafucci-Syndrom finden sich zusätzlich zu Enchondromen Hämangiome und Tumore in anderen Organen. Beide Tumorentitäten können maligne entarten. Ein erhöhtes Entartungsrisiko haben auch stammnah an den langen Röhrenknochen oder im Becken gelegene Enchondrome. Das Risiko, aus diesen stammnah gelegenen Enchondromen ein Chondrosarkom zu entwickeln wird im Vergleich zu peripher gelegenen Enchondromen mit 50% angegeben.

Häufig finden sich Enchondrome als Zufallsbefund und sind asymptomatisch. V. a. in den Handphalangen kommen sie gehäuft vor, aber auch im Fußskelett (Weber et al., 1979). Prinzipiell können alle Altersgruppen betroffen sein, meist erfolgt eine Diagnose aber im zweiten Lebensjahrzehnt (Buckup et al., 2001). Radiologisch zeigt sich eine scharfe Aufhellung mit dem Bild von „popkornartigen“ Verkalkungen. Eine Therapie im Sinne einer Kürettage und ggfs. Auffüllung mit Spongiosa (Machens et al., 1997) oder Knochenzement (Yasuda et al., 2006) erfolgt bei Frakturgefahr, Funktionsbeeinträchtigung oder der Gefahr der Entartung. Oftmals reichen hier aber Röntgenkontrollen zur weiteren Verlaufsbeobachtung aus.

1.4 Das Immunsystem

Das Immunsystem wird unterteilt in das angeborene (unspezifische) und in das erworbene (spezifische) Abwehrsystem (Janeway et al., 1997).

Zum unspezifischen Immunsystem gehören auf zellulärer Ebene Makrophagen, Mastzellen, Monozyten, Granulozyten und NK-Zellen. Diese Zellen können eingedrungene Erreger unabhängig von einer Antigen-Antikörper-Interaktion phagozytieren und unschädlich machen. Ferner gehören auch Akute-Phase-Proteine, das Komplementsystem und Zytokine dazu. Das unspezifische Immunsystem ist daher in der Lage, schnell auf Erreger zu reagieren; hat aber eine mangelnde Spezifität gegen einzelne Erreger.

Zum spezifischen Immunsystem gehören B- und T-Zellen, die Antigene spezifisch erkennen und mit Hilfe von Zytokinen beseitigen können. Das spezifische Immunsystem ist in der Lage sogenannte Fremd-Antigene zu erkennen und von Selbst-Antigenen zu unterscheiden.

B- und T-Zellen exprimieren auf ihrer Zelloberfläche bestimmte Rezeptoren für ein spezifisches Spektrum von Antigenen.

1.4.1 B- Zellen

B-Zellen entstehen im Knochenmark aus hämatopoetischen Stammzellen und vermitteln die humorale Immunität durch die Fähigkeit, Antikörper zu produzieren. Die ausgereiften B-Zellen befinden sich in den Follikeln der sekundären lymphatischen Organe und können die Follikel über das Blut auch wieder verlassen.

B-Zellen besitzen einen B-Zell Rezeptor (BCR) auf ihrer Oberfläche, der für jede B-Zelle eine eigene Spezifität besitzt. Erkennt die B-Zelle mittels ihres BCRs ihr spezifisches Antigen, kommt es zur primären B-Zellantwort.

Sie differenzieren nach einem Antigen-Kontakt über komplexe Prozesse zu Plasmazellen, die Antikörper sezernieren (Klaus et al., 1978). Die Umwandlung einer B-Zelle zu einer Antikörper produzierenden B-Plasmazelle dauert etwa 7 bis 10 Tage (o. V. Ribosepharm division).

Aktivierte B-Zellen sind außerdem in der Lage, Gedächtniszellen zu produzieren.

1.4.2 T- Zellen

T-Zellen entstehen aus lymphoiden Stammzellen des Knochenmarks. Die weitere Entwicklung erfolgt im Thymus. Bei T-Zellen läuft die Antigen-Präsentation über den T-Zell Rezeptor (TZR) in Kombination mit Molekülen des major histocompatibility complex (MHC) ab. Diese Antigen-Präsentation erfordert ein sogenanntes „processing“, bei dem die nicht löslichen, intakten Antigene in lösliche Peptide zerlegt werden und als Humane-Leukozyten-Antigen-Moleküle (HLA) auf der Oberfläche von Antigen-präsentierenden Zellen (APZ) von den T-Zellen erkannt werden können.

Nach dem Antigenkontakt können sich T-Zellen in spezifische T-Helferzellen mit dem Oberflächenmarker CD4 entwickeln, oder in spezifisch zytotoxische T-Zellen. Die T-Helferzellen können wiederum in zwei Untergruppen eingeteilt werden können. Einmal in die

Th1-Zellen, die Zytokine wie Interleukin-2 oder TNF- α bilden und eine wichtige Rolle bei der Abwehr von T-Killerzellen spielen.

Th2-Zellen sezernieren beispielsweise Interleukin-10 und sind an der B-Zellaktivierung beteiligt.

Die spezifischen zytotoxischen T-Zellen mit dem Oberflächenmarker CD8 sind an der Elimination von infizierten und maligne entarteten Zellen beteiligt (Bonneville et al., 2010).

1.4.3 Natürliche Killerzellen

Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) gehören zum angeborenen Immunsystem und können virusinfizierte Zellen oder Tumorzellen beseitigen. Sie benötigen keine vorherige Sensibilisierung, wie das bei T- und B-Zellen der Fall ist und differenzieren sich unabhängig vom Thymus (Moretta et al., 1996; Lanier et al., 1998). NK-Zellen sind aber eng mit T-Zellen verwandt und entwickeln sich aus einem gemeinsamen lymphoiden Knochenmarksvorläufer (Lanier et al., 1992). Arbeiten von Di Santo und auch von Freud (2006) weisen auf eine NK-Zellentwicklung im Thymus und in Lymphknoten hin (Di Santo et al., 2006). Schon 1975 wurde die Zytotoxizität der NK-Zellen gegenüber Tumorzellen entdeckt (Kiesslin et al., 1975; Heberman et al., 1975; Heberman et al., 1995). Außerdem sind NK-Zellen durch das Fehlen des CD3+T-Zellrezeptors und durch die Expression der Rezeptoren CD56 und CD16 charakterisiert (Cooper et al., 2001).

Als NKT-Zellen werden bestimmte T-Zellpopulationen bezeichnet, die NK-Zelleigenschaften zeigen (Brutkiewicz et al., 2002). NKT-Zellen können die Aktivität von NK-Zellen stimulieren. Im menschlichen Blut machen NK-Zellen 10-15% der Lymphozyten aus und finden sich in größeren Mengen in der Milz, in Lymphknoten, im Knochenmark, in der Lunge, im Gastrointestinaltrakt, in der Lamina propria, als gewebsspezifische Populationen, z. B. in der Leber (Luo et al., 1999) und in der Plazenta (Colucci et al., 2003). Natürliche Killerzellen können einerseits zwischen eigenen und fremden Zellen unterscheiden und vermitteln andererseits auch die Aktivierung von zytotoxischen Effektmechanismen. Zellen mit wenig MHC-I-Molekülen werden von ihnen lysiert und sie fördern die Th1-Antwort und die Bildung von T-Gedächtnis-Zellen (Kelly et al., 2002). Arbeiten von Imai zeigten 2000, dass eine geringe Anzahl an NK-Zellen im peripheren Blut beim Menschen zu einem erhöhten Karzinomrisiko führt (Imai et al., 2002).

1.4.4 Regulation der NK-Zellen

Über aktivierende oder inhibierende Signale, die die entsprechenden NK-Zellrezeptoren erreichen, wird die Aktivität der NK-Zelle reguliert (Lanier et al., 2003). Die NK-Zelle ist inhibiert, wenn überwiegend inhibitorische Liganden vorhanden sind. Sie wird aktiviert, wenn aktivierende Liganden im Übermaß vorhanden sind bzw. inhibierende Liganden fehlen und lysiert dann die Zielzelle (Raulet et al., 2001). NK-Zellen werden durch Th1-Zytokine (IL2, IL12 und IFN- γ) aktiviert. Durch die Aktivierung werden Adhäsionsmoleküle und aktivatorische Rezeptoren hochreguliert. Die Migrationsfähigkeit wird durch weitere inflammatorische Chemokine (- z.B. MIP α/β (*macrophage inflammatory protein*) erhöht (Taub et al., 1995). Ein adhärenter Phänotyp kann bei hohen Konzentrationen von IL-2

(1000 IE/mL) entstehen. Vujanovic et al. beschrieb 1995, dass dieser adhärenzte NK-Zell-Phänotyp ein erhöhtes Migrationsverhalten und Effektorpotential gegenüber Tumorzellen und Metastasen zeigt (Vujanovic et al., 1995).

Maenpaa et al. Zeigte 1993, dass eine IL-2-Aktivierung *in vitro* zu einer veränderten Expression der Adhäsionsmoleküle und eventuell zu einer eingeschränkten migratorischen Fähigkeit führen kann (Maenpaa et al., 1993). NK-Zellen können über die Sekretion von Perforin/Granzym die Zielzelle direkt lysieren oder in Zusammenhang mit Proteinen (Fas), durch TNF- α zur Tumorzellapoptose durch entsprechende Todesrezeptoren führen (Trauth et al., 1989; Takeda et al., 2001).

Die Zytokine INF- γ , INF- α , GM-CSF, TGF- β , IL-1 und IL-10 werden von NK-Zellen im Vergleich zu T-Zellen sehr schnell produziert (Trinchieri et al., 1989). Diese Zytokine wiederum aktivieren Makrophagen, die IL-12 sekretieren. Zusammen mit IFN- γ und IL-12 wird die Th1-Antwort stimuliert. MHC-Moleküle werden auf virusinfizierten Zellen durch IFN- γ hochreguliert und sind somit wichtig für die T-Zell Erkennung. Sie stellen die erste Immunantwort gegenüber Pilzen, Parasiten oder Tumorzellen dar und beeinflussen auch die Aktivität von B- und T- Zellen (Hamerman et al., 2005; Biron et al., 2001; Kiesslin et al., 1975). Perforine führen zu einer Öffnung in der Membran der Zielzelle und gelangen durch Granzyme schließlich in die Zelle und leiten die Apoptose ein. NK-Zellen können auf ihrer Oberfläche den Fas-Liganden exprimieren. Der Fas-Ligand reagiert mit dem Fas-Rezeptor der Zielzelle und so erfolgt ebenfalls die Apoptose der Zielzelle (Kärre et al., 2002). NK-Zellen können prinzipiell an alle Körperzellen binden und diese abtöten, wenn ein spezieller Rezeptor für ein bestimmtes Antigen fehlt. Die Aktivität der NK-Zellen wird über MHC-spezifische und überwiegend inhibitorische Rezeptoren reguliert. Um von NK-Zellen nicht abgetötet zu werden, exprimieren nahezu alle gesunden Körperzellen bestimmte Signalproteine (MHC I-Moleküle). Zellen, die von einem Virus infiziert sind oder von einem Tumor betroffen sind, regulieren ihre MHC-I-Moleküle herunter, um so den T-Zellen keinen Angriffspunkt zu liefern. NK- Zellen reagieren auf diese Herunterregulierung der MHC-I-Moleküle mit der Lyse der entsprechenden Zielzelle. Die missing-self-Hypothese beschreibt, dass das Fehlen von MHC-Ia-Moleküle zu einer NK-Zellattacke führt (Ljunggren et al., 1990). Von Karre als "express yourself or die" beschrieben (Karre et al., 1995). Das Überwiegen von aktivierenden Rezeptoren der NK-Zelle führt zur Lyse der Tumorzelle (Korten et al., 1999; Hanke et al. 2001). Tumorzellen schützen sich durch die Expression von HLA-C und nichtklassischen MHC-Ib-Molekülen (HLA-G, -E), um dem Zugriff durch NK-Zellen zu entgehen (Biassoni et al., 1995). NK-Zellen können dort eingreifen, wo Tumorzellen durch geringe MHC-I-Molekülexpression dem Zugriff durch T-Zellen entgehen.

1.4.5 Natürliche Killerzell-Rezeptoren

Jede NK-Zelle exprimiert neben den aktivierenden Rezeptoren auch inhibierende. Inhibitorische Rezeptoren der NK-Zelle sind in der Lage MHC-Klasse-I-Moleküle auf der Zielzelle zu erkennen. So kann dann beispielsweise die Lyse durch die NK-Zelle inhibiert werden. Je nachdem ob das inhibierende oder aktivierende Signal der NK-Zelle überwiegt, kommt es zur Lyse der Zielziele oder nicht. Wichtige Rezeptoren der NK-Zellen sind das zum „cluster of differentiation“ gehörende CD94+ Molekül, die „killer cell immunoglobulin like receptors“ (KIR) beim Menschen und bei der Maus die Ly49-Proteine.

Die meisten Rezeptoren von NK-Zellen werden über MHC-I aktiviert. MHC-I spezifische NK-Zellrezeptoren werden in Lektin- und Immunglobulin-ähnliche unterteilt. NKG2D und NKp46 sind nicht MHC-I abhängig (Moretta et al., 2000). Als Natural Cytotoxicity Receptors (NCRs) werden die NK-Zellrezeptoren NKp46 und NKp30 bezeichnet. Die Rezeptoren NKp46 und NKp30 finden sich auf NK-Zellen bei aktivierten NK-Zellen und nicht auf T-Zellen (Vitale et al., 1998). Ishigami et al. zeigte 2000, dass die Dichte der exprimierten NCRs mit der Zytotoxizität der NK-Zelle korreliert (Ishigami et al., 2000). Über den Rezeptor NKG2D können zytotoxische Lymphozyten (NK-Zellen und CD8+T-Zellen), virusinfizierte und maligne Körperzellen erkennen und so auch eliminieren. NKG2D kann mit seinen MHC Klasse I ähnlichen Liganden MICA, MICB, ULBP1-4 interagieren und so ein Aktivierungssignal auslösen. MICA, MICB und ULBP1-4 werden nicht von normalen Körperzellen exprimiert, konnten aber auf virusinfizierten Zellen und maligne transformierten epithelialen Zellen gefunden werden. Lanier et al. beschrieb die Elimination von Tumoren über NKG2D im Mausmodell und bezeichnete es als „renaissance of the tumor immunosurveillance hypothesis“ (Lanier et al., 2001). NKG2D gehört zur C-Typ V-Lektin-Rezeptor- Superfamilie. Bislang nicht gänzlich geklärt ist, ob NKG2D die Zytotoxizität übernimmt, wenn die anderen NCR in ihrer Funktion eingeschränkt sind (Sivori et al., 1999). NKG2D erkennt MHC-I homologe Dimere MICA, MICB und ULBP1-3 (Falk et al., 2002). Alle NK-Zellen und alle T-Zellen, die über einen CD8+ Rezeptor verfügen, exprimieren NKG2D (Raulet et al., 2003). Bei NK-Zellen wirkt NKG2D als aktivierender Rezeptor. Eine eigenständige Zytotoxizität hat NKG2D auf T-Zellen nicht, hier wirkt dieser Oberflächenrezeptor lediglich kostimulierend bei der Lyse. Als Adaptermolekül dient NKG2D das Molekül DAP10, das über eine Phosphatidylinositol-3 Kinase (PI3K) sein Signal weiterleitet (Billadeau et al., 2003). Verschiedene aktivierende Rezeptoren sind für die Zytotoxizität der NK-Zelle verantwortlich. Zur Gruppe der aktivierenden Rezeptoren gehören die natürlichen Zytotoxizitäts-Rezeptoren (natural cytotoxicity receptors, NCR) (Grabias et al., 1974). Oberflächenmoleküle, die spezifisch von NK-Zellen exprimiert werden, sind die Rezeptoren NKp46+ und NKp30+. NKp46+ findet sich auf allen NK-Zellen (Price et al., 1969; Huvos et al., 1972). Die zytotoxische Aktivität der NK-Zelle korreliert mit der Dichte der NCR auf der Zelloberfläche (Moretta et al., 2000). Intrazelluläre Adaptermoleküle, die Tyrosin-enthaltende aktivierende Motive besitzen (immunoreceptor tyrosin-based activating motifs, ITAM) bilden mit dem Rezeptor einen Komplex und leiten das Signal weiter. Die ITAM werden nach ihrer Aktivierung durch den Rezeptor von Tyrosinkinase phosphoryliert. Dies führt zu einer Rekrutierung von Tyrosinkinase der ZAP70/Syk- Familie, die die Weiterleitung des Signals übernehmen. NKp46 und NKp30 bedienen sich einer CD3-Kette (CD 247). Der Rezeptor NKp46 entfaltet seine Zytotoxizität nicht MHC-I-abhängig (Pende et al., 1999). Wird NKp46 durch spezifische Rezeptoren blockiert, wird auch die NK-Zell vermittelte Lyse reduziert (Vitale et al., 1998). Aktivierte NK-Zellen exprimieren NKp46 und NKp44 und finden sich nur bei NK-Zellen, während NKp44 auch auf einer Subpopulation von T-Zellen vorkommt (Ishigami et al., 2000). Die Dichte der NCR auf der Zelloberfläche korreliert mit der Zytotoxizität in Bezug auf die zu eliminierende Zelle. Bei Patienten mit HIV zeigte De Maria et al. den Zusammenhang der verminderten Rezeptorexpression von NKp46+ und NKp30+Zellen mit der verminderten Zytotoxizität der NK-Zellen (De Maria et al., 2003).

1.4.6 Die einzelnen Zellmarker in der Übersicht: Analyse der Expressionsmuster bei den unterschiedlichen Tumorentitäten

Zellen besitzen Oberflächenmoleküle, die über monoklonale Antikörper identifiziert und damit auch bestimmte Zellentwicklungen zugeordnet werden können. Monoklonale Antikörper, die gleiche Oberflächenstrukturen erkennen, werden in einem „Cluster of Differentiation“ (CD) zugeordnet (8th International Workshop and Conference on Human Leukocyte Differentiation Antigens [HLDA8] , Adelaide, 2004).

Durch die Entwicklung der monoklonalen Antikörper zusammen mit der Durchflusszytometrie können Lymphozyten anhand ihrer Oberflächenantigene (CD) weiter in T-, B- und NK-Zellen unterteilt werden (Sack et al., 2000; Pechhold et al., 1994).

CD3-/CD19+

Pro-B-Lymphozyten und Plasmazellen exprimieren CD19 als Korezeptor. B-Lymphozyten benötigen CD19 im Rahmen der Proliferation und auch für ihre Aktivierung.

Der Normwert für CD3-/CD19+ Lymphozyten liegt bei Gesunden um die 8-16% (Ragan et al., 1946). Der Normbereich von reifen B- Zellen liegt bei 3-13% und der von unreifen B-Zellen wird mit 0-2% im peripheren Blut angegeben.

CD3+/CD56-

Lymphozyten mit diesem Marker gehören zu den zytotoxischen T-Lymphozyten, die MHC I unabhängig zytotoxisch wirken. Diese Zellen werden als NK-ähnliche T-Zellen (NK-like-T-cells) bezeichnet (Schellong et al., 1997).

CD3-/CD56+

CD56+ wird von fast allen NK-Zellen exprimiert (Bürger et al., 2005). In der Literatur wird der Normbereich der NK-Zellen mit 3-31% im peripheren Blut angegeben.

NK-Zellen sind wie schon erwähnt in der Lage ohne weitere Reifung oder Sensibilisierung Tumorzellen oder virusinfizierte Zellen abzutöten (Weber et al., 1979).

CD3-/NKG2D+

NKG2D+ Rezeptor vermittelt können NK-Zellen und CD8+T-Zellen virusinfizierte und maligne Körperzellen identifizieren und eliminieren.

CD3-/NKp30+

NKp30 ist ein aktivierender Rezeptor, der auf NK-Zellen konstitutiv exprimiert wird. Die Expression dieses Rezeptors wurde bisher auch bei aktivierten T-Lymphozyten aus der Nabelschnur beobachtet (Yasuda et al. 2006). NKp30, wie auch NKp44 und NKp46 können

bestimmte Heparansulfat-Mikrodomänen auf Tumorzellen erkennen. Für NKp30 sind humanes HLA-B- assoziiertes Transkript 3 (BAT3) und B7-H6 Liganden. Die Moleküle CD3 ζ und FC ϵ R1 γ besitzen eine ITAM-Domäne und wirken an der Signaltransduktion von NKP30 mit (Machens et al., 1997; Buckup et al., 2001; Adler et al., 1983).

CD3-/NKp46+

NKp46 ist, wie auch NKp30, ein aktivierender Rezeptor und gehört zur Gruppe der Natürlichen-Zytoxizitätsrezeptoren (NCRs).

1.5. Fragestellung

Bei der vorliegenden Promotionsarbeit handelt es sich um eine klinisch-experimentelle Studie, in der Daten an der Klinik für Orthopädie, Klinikum Rechts der Isar, München erhoben und analysiert wurden. Der Untersuchungszeitraum ging vom April 2009 bis April 2012. Insgesamt wurden 46 Patienten, die aufgrund mesenchymaler Neubildungen operiert wurden, untersucht.

Den Patienten wurde zu bestimmten Zeitpunkten EDTA-Blut entnommen und mittels Durchflusszytometrie hinsichtlich der Zellzahl und der Aktivität der einzelnen Lymphozyten hin untersucht.

Die einzelnen Lymphozyten in der Übersicht

Rezeptor	Zelltyp
CD3-/CD19+	B- Zelle
CD3+/CD56-	T- Zelle
CD3-/CD56+	NK- Zelle
CD3-/NKG2D+	NK- Zelle
CD3-/NKp30+	NK- Zelle
CD3-/NKp46+	NK- Zelle

Tabelle 6: Die Tabelle zeigt die hier untersuchten Lymphozyten.

Der Einfluss des Immunsystems auf die Tumorelimination und -entstehung ist Gegenstand vieler Studien. In dieser Arbeit sollte eine Aussage über das Verhalten und daraus schlussfolgernd Aussagen zur Funktion der NK-Zellen, B-Zellen und T-Zellen bei malignen (Osteo-, Lipo- und Chondrosarkomen) und bei benignen, mesenchymalen Tumoren (Osteochondrome, Lipome und Enchondrome) gemacht werden.

Bisher fehlt es in der Literatur an Aussagen über das Verhalten der Immunzellen bei diesen Tumoren.

Die zu ergründenden Fragen bzw. Inhalte der Untersuchung lauten im Einzelnen wie folgt:

- Wie verhalten sich bestimmte Lymphozyten in Bezug auf ihre Zellzahl und Aktivität bei

Osteo-, Chondro- und Liposarkomen?

- Wie verhalten sich bestimmte Lymphozyten in Bezug auf ihre Zellzahl und Aktivität bei Osteochondromen, Enchondromen und Lipomen?
- Wie verhalten sich die einzelnen Lymphozytenzahlen und deren Aktivität vor und nach der Resektion des malignen Tumors?
- Finden sich unterschiedliche Zellzahlen und Aktivitäten der einzelnen Zelle bei Patienten mit einem Rezidiv im Gegensatz zu rezidiv-freien Patienten?
- Finden sich Unterschiede bei der Zellzahl und Aktivität der einzelnen Zelle in Bezug auf das Grading der Tumoren?

2 Patienten, Material und Methoden

2. 1 Patienten und Material

2.1.1 Patientenkollektiv

Zwischen April 2009 und April 2012 wurden in der Orthopädischen Klinik des Klinikum Rechts der Isar, München, männliche und weibliche Patienten, die an verschiedenen muskuloskelettalen Tumoren litten und operativ behandelt wurden in einer Studie zusammengefasst. Untersucht wurden Lipo-, Osteo-, und Chondrosarkome sowie Lipome, Osteochondrome und Enchondrome. In diese Studien flossen Patienten ein, die sich einer Biopsie zur Diagnosesicherung und einer anschließenden primären Tumoroperation unterzogen.

Die Aufnahme der epidemiologischen Daten erfolgte aus der Patientenakte. Aussagen über das Grading wurden aus dem jeweiligen Pathologiebericht entnommen.

Bei allen Patienten in dieser Studie gab es zum Zeitpunkt der Operation keinen Anhaltspunkt für das Vorhandensein von Metastasen.

Die primäre Tumoroperation erfolgte nach sorgfältiger Auswertung aller erhobenen Befunde. Als primäres Verfahren erfolgte bei allen Patienten die Resektion des Tumors.

Den Patienten wurde zu bestimmten Zeitpunkten EDTA-Blut entnommen. Die erste Blutabnahme erfolgte bei allen Patienten zum Zeitpunkt vor der Biopsie des Tumors. Die nächste Blutabnahme erfolgte dann postoperativ bei allen Patienten nach ca. drei Monaten.

Eine weitere Blutabnahme zur Verlaufskontrolle der Lymphozytenzahlen und deren Rezeptorexpression erfolgte dann ca. sechs Monate postoperativ. Bei den Chondrosarkomen wurden statt drei Blutproben, insgesamt vier abgenommen. Die 4. Blutprobe erfolgte nach einem Jahr postoperativ.

Einige Patienten hatten je nach Sarkomklassifizierung bereits eine neoadjuvante Chemotherapie hinter sich. Die Therapie (neo- oder adjuvante Chemotherapie oder Radiatio), das Grading und ein etwaiges Rezidiv des Sarkoms wurden berücksichtigt.

Bei den Tumoruntersuchungen wurden 6 Untersuchungsgruppen gebildet: Osteosarkome, Osteochondrome, Liposarkome, Lipome, Chondrosarkome und Enchondrome.

Die untersuchten Tumore in der Übersicht

Maligne Tumore	Benigne Tumore
Osteosarkome	Osteochondrome
Liposarkome	Lipome
Chondrosarkome	Enchondrome

Tabelle 7: Die Tabelle gibt einen Überblick über die Tumore deren Lymphozyten im peripheren Blut in dieser Arbeit näher untersucht wurden.

2.1.2 Geräte

Die Messung der Proben erfolgte mit einem Calibur- Facs der Firma BD mit CellQuest Software.

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

15 ml Falcon Röhrchen
50 ml Falcon Röhrchen
1.5 ml Eppendorf Tubes

2.1.4 Chemikalien

Lymphocyte Separation Medium LSM 1077 (PAA Cat.No J15-004)

RPMI (Gibco 21875)

FCS steril filtriert (PAA Cat.No. A15-101)

Einfriermedium (20%DSMO in RPMI)

FACS Medium (PBS mit 10% FCS)

FACS Lysing Solution (BD Cat.No. 349202)

Alle übrigen Verbrauchsmaterialien wurden bei den gängigen Distributoren: VWR, Ismaning und Carl Roth GmbH, Karlsruhe bestellt.

2.1.5. Panel für NK Analyse

Antikörper	Volumen	Verdünnung
Rohr1 IgG1-FITC	5uL	pur
IgG1-PE	5uL	pur
IgG1-PerCP	5uL	pur
IgG1-APC	1uL	pur
Rohr2 CD94-FITC	5uL	pur
CD56-PE	5uL	pur
CD3-PerCP	10uL	pur
CD45-APC	1uL	pur
Rohr3 CD56-FITC	5uL	pur
CD19-PE	20uL	pur
CD3-PerCP	10uL	pur
CD45-APC	1uL	pur
Rohr4 CD56-FITC	5uL	pur
CD16-PE	10uL	pur
CD3-PerCP	10uL	pur
CD45-APC	1uL	pur
Rohr5 CD56-FITC	5uL	pur
NKG2D-PE	10uL	pur
CD3-PerCP	10uL	pur
CD69-APC	5uL	pur
Rohr6 CD56-FITC	5uL	pur
NKp30-PE	10uL	pur

	CD3-PerCP	10uL	pur
	CD69-APC	5uL	pur
Rohr7	CD56-FITC	5uL	pur
	NKp44-PE	10uL	pur
	CD3-PerCP	10uL	pur
	CD69-APC	5uL	pur
Rohr8	CD56-FITC	5uL	pur
	NKp46-PE	10uL	pur
	CD3-PerCP	10uL	pur
	CD69-APC	5uL	pur
Rohr9	CD94-FITC	5uL	pur
	NKG2D-PE	10uL	pur
	CD3-PerCP	10uL	pur
	CD56-APC	10uL	pur
Rohr10	CD94-FITC	5uL	pur
	NKp30-PE	10uL	pur
	CD3-PerCP	10uL	pur
	CD56-APC	10uL	pur
Rohr11	CD94-FITC	5uL	pur
	NKp44-PE	10uL	pur
	CD3-PerCP	10uL	pur
	CD56-APC	10uL	pur
Rohr12	CD94-FITC	5uL	pur
	NKp46-PE	10uL	pur
	CD3-PerCP	10uL	pur

CD56-APC	10uL	pur
Rohr13 cmHsp70.1-FITC	5µl	von Charge abhängig
----- kein PE Antikörper -----		
CD14-PerCP	10uL	pur
CD56-APC	10uL	pur

1.1.6 Facs-Antikörper

Antikörper	Katalognummer	Firma
IgG1-FITC	345815	BD
IgG1-PE	345816	BD
IgG1-PerCP	345817	BD
IgG1-APC	MG 105	Caltag
CD3-PerCp	345766	BD
CD16-PE	555407	BD Pharmingen
CD14-PerCP	345786	BD
CD19-PE	555413	BD Pharmingen
CD45-APC	MHCD 45 05	Caltag
CD56-FITC	345811	BD
CD56-PE	345812	BD
CD56-APC	555518	BD
CD69-APC	340560	BD
CD94-FITC	555888	BD Pharmingen
cmHsp70.1-FITC	eigene Herstellung	multimmune
AntiNKp30-PE	PN IM 3709	Beckmann Coulter
AntiNKp44-PE	PN IM 3710	Beckmann Coulter
AntiNKp46-PE	PN IM 3711	Beckmann Coulter
NKG2D-PE	FAB 139P	R&D-Systems

2.2 Methoden

2.2.1 Durchführung der venösen Blutabnahmen

Patienten mit Sarkomen wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten Blut in ein 7 ml EDTA-Blutröhrchen und in ein 7 ml Serum-Röhrchen abgenommen. Die erste Blutabnahme erfolgte kurz vor der Operation. Teilweise hatten sich die Patienten bereits einer neo- oder adjuvanten Chemotherapie und in wenigen Fällen auch einer Bestrahlung unterzogen. Alle Blutabnahmen erfolgten nach vorausgegangener Aufklärung und schriftlich erteiltem Einverständnis. Ein entsprechendes Ethikvotum liegt vor.

2.2.2 Transport des Blutes

Bis auf wenige Ausnahmen erfolgte der Transport unmittelbar nach der Blutabnahme. Die Blutproben wurden in das Labor der Radioonkologie und Strahlentherapie am Krankenhaus Rechts der Isar in München gebracht. Dort wurde das EDTA-Blut unmittelbar nach entsprechender Aufbereitung der Facsanalyse zugeführt.

2.2.3 Lymphozytenseparation und Stimulation

Die Blutröhrchen wurden nicht ausgespült, sondern die Zellen im Abnehmeröhrchen für eine FACS-Analyse verwendet. Zuerst wurde das Blutvolumen notiert. Das Blut wurde 1:1 mit RPMI in 50ml Falcon-Röhrchen verdünnt. Dann füllte man LSM 1077 in Falconröhrchen, abhängig von der Blutmenge. 1- 2 Röhrchen Blut, d.h. 4ml wurden in 15ml Falconröhrchen überführt und 3-5 Röhrchen Blut, d.h. 10ml wurden in 50ml Falconröhrchen überführt. Dann wurde LSM 1077 mit Blut/RPMI vorsichtig überschichtet (das Gesamtvolumen sollte 40-45ml betragen). Nun erfolgte die Zentrifugation bei 850g (2000rpm) für 20 Minuten bei Raumtemperatur und langsamer Beschleunigung (Stufe 4).

Daraufhin wurde der Lymphozytenring mit RPMI abgenommen, in ein neues Tube überführt und mit RPMI aufgefüllt. Es folgte wieder die Zentrifugation bei 700g (1800rpm) für 10 Minuten wieder bei Raumtemperatur und mit Bremse (Stufe 9).

RPMI wurde abgenommen und mit 5ml RPMI resuspendiert. An diesem Punkt erfolgte die Zellzahlbestimmung mit Trypanblau und Essigsäure (oder mit Türck'scher Lösung). Erwartet wurden ca. 2Mio Zellen/ml Blut.

2.2.4 Vorbereitung der Proben

Das Blut wurde mit PBS verdünnt. Pro Blutprobe wurden 13 FACS-Röhrchen benötigt. 100uL Blut/Blut-PBS-Gemisch/Ansatz pro FACS-Tube wurde pipettiert. Dann wurden die einzelnen Antikörper zugegeben und die Tubes wurden aufgeratscht. Es folgte eine

Inkubationszeit von 15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln. Daraufhin wurde mit 2ml 10%igem-Facs- Puffer bei 500g (=1500rpm) für 5 Minuten bei Raumtemperatur alles gewaschen. Der Überstand wurde vollständig abgeschüttet, und das Pellet wurde aufgeratscht. Dann gibt man 2ml Lyse- Puffer-Lösung (BD Lysing Solution Cat. 349 202) hinzu. Die Tubes wurden kurz sanft gevortext (Stufe 4, <1 Sek.). Es wurde überprüft, ob das Pellet resuspendiert war. Dann erfolgte eine Inkubation für 10 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln. Daraufhin wurden die Eppendorf Tubes bei 500g für 5 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Das Pellet wurde wieder vorsichtig aufgeratscht. Es folgte das Waschen mit 3ml 10%-igem-Facs-Puffer und eine erneute Zentrifugation bei 500g für 5 Minuten bei Raumtemperatur. Der Überstand wurde abgeschüttet bzw. abgesaugt, das Pellet wurde erneut aufgeratscht und es wurde 500µl FACS-Puffer hinzugegeben. Innerhalb von einer Stunde wurde alles gefacst.

2.2.5 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahlbestimmung erfolgte mit Trypanblau und Essigsäure (oder mit Türck'scher Lösung); erwartet wurden ca. 2 Mio Zellen/ml Blut. Alle Zellzählungen erfolgten in einer Neubauer Zählkammer. Um zwischen toten und lebenden Zellen differenzieren zu können, wird Trypanblau verwendet. Vitale Zellen erscheinen unter dem Lichtmikroskop hellblau, tote Zellen dunkelblau (Trypanblau kann bei toten Zellen eindringen und färbt sie somit dunkler). Um die vitalen Zellen zu zählen, wurden zu 20 µl Zellsuspension 20 µl einer 0,1%igen Trypanblaulösung gegeben. Es folgte die Suspension der Zellen und das Überführen in die Neubauer Zählkammer. Mit einem Lichtmikroskop wurde die Anzahl der lebenden Zellen in den vier Eckquadranten der Zählkammer ausgezählt und gemittelt. Die Auswertung muss innerhalb von 3 bis 5 Minuten erfolgen, da Trypanblau zytotoxisch für die Zellen ist. Die Zellzahl in der Zellsuspension wurde anhand folgender Formel bestimmt:

$$\text{Zellen/mL} = (\text{Anzahl} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10,000) / \text{gezählte Quadranten}$$

2.2.6 Durchflusszytometrische Messung

Die durchflusszytometrischen Messungen wurden an einem Calibur Facs der Firma BD. durchgeführt. Zur primären Auswertung der Daten bedient man sich der cellquest software der Firma BD. Die bei diesen Messungen ermittelten Werte sind relative Signalgrößen der gemessenen Zellen zueinander. Die Durchflusszytometrie wurde in dieser Arbeit zur Bestimmung der Lymphozyten genutzt.

2.2.7 Prinzip der Durchflusszytometrie

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie werden Zellen oder andere Partikel in einem Flüssigkeitsstrom gezählt oder charakterisiert. Aus dem Probengefäß werden die zu untersuchenden Zellen in einer laminaren Strömung aufgereiht und in den optischen Messbereich gebracht. Im optischen Messbereich wird jede einzelne Zelle von einem gebündelten Laserstrahl angestrahlt. Dabei kommt es an der Zelle zur Lichtstreuung. Die Lichtstreuung wird von entsprechenden Detektoren gemessen und man bekommt so Informationen über die Größe (Forward scatter, FCS) und über die Granularität (Side scatter, SSC) der Zelle. Die Beugung des Lichts im flachen Winkel wird mittels des Vorwärtsstreulichts (Forward scatter, FCS) gemessen und hängt vom Volumen der Zelle ab. Informationen über die Brechung des Lichtes im rechten Winkel erhält man über das Seitwärtsstreulicht (Side scatter, SSC). Das Seitwärtsstreulicht ist von der Granularität, Größe und Struktur des Zellkerns und der innerhalb der Zelle befindlichen Vesikel abhängig. Eine große Anzahl an Zellen wird innerhalb eines kurzen Zeitintervalls ($> 1000/s$) analysiert. Dadurch erhält man repräsentative Informationen über die Zellpopulationen. Viel Licht streuen Granulozyten mit ihrer rauen Oberfläche und den in ihnen befindlichen Vesikeln, im Vergleich zu den eher glatten T- Zellen. Eine weitere Differenzierung der Zellen erfolgt über die Markierung bestimmter Strukturen mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen. Diese Fluoreszenzfarbstoffe werden durch den Laserstrahl angeregt. Bei der Rückkehr in ihren energetischen Grundzustand emittieren sie Fluoreszenzlicht einer bestimmten Wellenlänge. Dieses Fluoreszenzlicht wird von Photozellen detektiert. Bestimmte Zellen einer Population können so anhand ihrer Merkmale identifiziert werden (Ferlazzo et al. 2004).

2.2.8 Isotypenkontrolle

Die Isotypenkontrolle ist ein Zellansatz, der parallel zu den anderen zu messenden Ansätzen angesetzt wird. Die Zellen in der Isotypenkontrolle werden mit unspezifischen Antikörpern der gleichen Klasse und des gleichen Fluoreszenzfarbstoffes inkubiert. So wird die höchste Fluoreszenz bestimmt, die eine für dieses Merkmal negative Zelle noch generieren darf. Die Möglichkeit einer unspezifischen Bindung des Primärantikörpers wird somit erfasst.

Für jeden zu untersuchenden Zellansatz wurde bei dieser Arbeit bei jeder durchflusszytometrischen Messung eine Isotypenkontrolle durchgeführt. Positiv für einen Zellansatz waren Messungen, deren Intensität über den Werten der Isotypenkontrolle lag. Die Isotypenkontrolle wurde wie oben beschrieben für die einzelnen Zellansätze durchgeführt. Die Fluoreszenzmerkmale müssen in vorhandene und in nicht-vorhandene Merkmale klassifiziert werden, um eine qualitative Aussage über die durchflusszytometrischen Messungen treffen zu können. Dafür bedient man sich der Isotypenkontrolle.

2.2.9 Störgrößen

Zwei Störgrößen, die bei der Durchflusszytometrie eine Rolle spielen sind die Autofluoreszenz und die unspezifische Antikörperbindung. Einige der analysierten Zellen können aufgrund von Störgrößen ein messbares Signal zeigen, obwohl das nachzuweisende Merkmal bei ihnen nicht oder nur sehr gering ausgeprägt ist. Eine geringfügige Autofluoreszenz lässt sich bei fast allen Zellen finden. Allein die Anregung durch den Laserstrahl kann durch ihre chemische Verbindung zur Emission von Licht verschiedener Wellenlängen führen. So kann das aufgrund der Autofluoreszenz emittierte Licht ein schwaches Signal verursachen, das von den Fluoreszenzkanälen gemessen wird. Eine geringe Affinität zu unspezifischen zellulären Molekülen weisen auch die fluoreszenzgekoppelten Antikörper auf, die nicht nur an die spezifischen Antigene binden.

2.2.10 Statistik

Statistische Analysen wurden mit dem Programm IBM SPSS Statistics 20 durchgeführt. Ferner wurde mittels Microsoft Office Excel 2007 die Grafiken erstellt. Bei den dargestellten Werten handelt es sich um Mittelwerte aus drei bzw. bei Chondrosarkomen um vier unabhängige Experimente, wobei die Standardabweichung als Fehlerindikator eingesetzt wurde. Signifikanzen wurden mit dem studentischen T-Test berechnet. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ wurde als signifikant gewertet. Bei Testergebnissen ohne Signifikanz wurden diese nicht gesondert erwähnt.

2.2.11. Überlegungen zur Statistik und der experimentellen Methodik

Die für die vorliegende Arbeit bearbeiteten und untersuchten Blutproben stammen von Patienten aus der Klinik für Orthopädie, Klinikum Rechts der Isar, München, und wurden in der Klinik für Strahlenonkologie Rechts der Isar München einer Immunphänotypisierung unterzogen. Ein eventueller Selektionseffekt kann aufgetreten sein, da die Patienten nicht nach Alter, Geschlecht oder anderen Faktoren ausgeschlossen wurden. Die Selektion erfolgte hier diagnoseabhängig. Die Patienten wurden zu kleinen diagnostischen Gruppen zusammengefasst. Diese Einteilung mag zwar hinsichtlich ihres Umfanges her gering sein, war aber für eine explorative Datenanalyse ausreichend. Zumal man die Inzidenz der einzelnen Entitäten beachten muss. Die Analyse zielt nicht auf beweisende statistische Aussagen ab. Die Statistik erfolgte mit dem studentischem T-Test und mit Microsoft Office Excel 2007. Mit Hilfe der Durchflusszytometrie konnten die Blutproben, nach entsprechender Aufarbeitung auf die jeweiligen Zelltypen hin untersucht werden. Dabei wurden die Zellen mit spezifischen farbkonjugierten Antikörpern gefärbt und entsprechend gated.

Beim Arbeiten mit Pufferlösung kann sich immer eine Verunreinigung einschleichen, die sich auf einige Blutproben dann auswirkt. Auch aufgrund des Vorkommens von Erythrozyten in

der Facs-Analyse und somit verunreinigten Messungen kann es zu falschen Messergebnissen kommen.

3 Ergebnisse

3.1 Osteosarkome

Patientenkollektiv

Bei 12 Patienten mit Osteosarkomen wurde wie schon beschrieben zu verschiedenen Zeitpunkten Blut in EDTA- und Serum-Röhrchen abgenommen. Von den initial 12 Blutproben konnten jedoch in der ersten Messung nur 11 verwendet werden. Die erste Blutabnahme erfolgte kurz vor der Tumorresektion bereits im Operationssaal. Die zweite Blutabnahme erfolgte dann ca. 3 Monate nach der Tumorresektion. Die dritte Blutprobe wurde ca. 6 Monate nach der Operation vorgenommen.

Therapieverfahren

Von diesen 12 Patienten unterzogen sich alle Patienten zum Zeitpunkt der ersten, präoperativen Blutabnahme einer neoadjuvanten Chemotherapie.

Alter der Patienten

Der jüngste Patient dieser Studie war 7, der älteste 55 Jahre. Gemittelt hatte diese Patientengruppe ein durchschnittliches Alter von 26 Jahren. Das mittlere Erkrankungsalter liegt zwischen dem 15. und 25. Lebensjahr und deckt sich mit dem gemittelten Alter der Patienten in dieser Studie.

Geschlechterverteilung

4 Patientinnen und 8 männliche Patienten nahmen an dieser Studie teil. Dies ähnelt der bekannten Geschlechterverteilung bei Osteosarkomen, wonach Jungen etwas häufiger betroffen sind als Mädchen.

3.1.1 Zusammenfassung der Ergebnisse Osteosarkom

Im untersuchten Setting erfolgte eine Vielzahl von Untersuchungen. In der Einzeldarstellung sind diese Ergebnisse zu komplex, daher wurden die wesentlichen Ergebnisse vorweg abgefasst. Über die ausführlichen Ergebnisse geben die nachfolgenden detaillierten Punkte Rückschlüsse.

Zellzahl und Rezeptorexpression der Patienten mit einem Osteosarkom im zeitlichen Verlauf

Die B-Zellzahl nahm von der ersten (präoperativen) zur zweiten (postoperativen) Blutabnahme signifikant ab ($p=0,03$). Die Rezeptorexpression zeigte tendenziell dazu ebenfalls eine Abnahme. Die T-Zellzahl und Rezeptorexpression nahm von der ersten bis zur dritten Blutprobe tendenziell zu.

Die NK-Zellzahlen zeigten in der zweiten Blutabnahme nach der Resektion des Tumors zunächst einen Anstieg. Im weiteren zeitlichen Verlauf nahm die Zellzahl jedoch wieder ab. Die Rezeptorexpression verhielt sich dazu ähnlich. Auch hier kam es in der postoperativen Blutabnahme zunächst zu einer Zunahme der Aktivität. Im weiteren zeitlichen Verlauf war die Rezeptorexpression wieder rückläufig. Für die Rezeptorexpression des Markers CD3/NKp46+ zeigte sich von der zweiten zur dritten Blutabnahme eine signifikante Abnahme ($p=0,05$).

Zellzahl und Rezeptorexpression der Osteosarkome G2 und der Osteosarkome G3 im Vergleich

Zusammenfassend lässt sich in Bezug auf die Zellzahl und die Rezeptorexpression der Osteosarkome G2 ($n=2$) und G3 ($n=9$) folgendes sagen.

Bei den Osteosarkomen G2 zeigten sich im Vergleich der ersten Blutabnahmen ähnliche bis teilweise niedrigere NK-Zellzahlen als bei den Osteosarkomen G3. Die B-Zellzahl und die T-Zellzahl war bei den Osteosarkomen G3 geringfügig höher.

Die Rezeptordichte zeigte für die Osteosarkome G2 in Bezug auf die NK-Zellmarker höhere Werte in der ersten Messung (präoperativ). In der zweiten Messung zeigten sich bei den Osteosarkomen G2 in Bezug auf die NK-Rezeptorexpression geringere Werte. Aussagen über die dritte Messung bzw. den weiteren Verlauf konnte aufgrund der geringen Fallzahl der Osteosarkome G2 ($n=2$) und aufgrund fehlender Compliance nicht getroffen werden.

Im Allgemeinen scheinen die Osteosarkome G2 gegenüber den Osteosarkomen G3 initial eine leicht erhöhte B- und T-Zellzahl und Aktivität zu besitzen.

Die Zellzahlen der einzelnen Lymphozyten subsets zeigten keine signifikanten Unterschiede. Die B-Zellzahl und die Zellen mit dem Marker NKG2D+, NKp30+ und NKp46+ waren beim Osteosarkom G2 postoperativ rückläufig.

Genau umgekehrt verhielt es sich bei den Osteosarkomen G3. Hier war unmittelbar postoperativ die B-Zellzahl signifikant fallend ($p=0,05$), während die NK-Zellzahlen nach der Resektion des Sarkoms zunächst zunahmen. Erst im weiteren postoperativen Verlauf kam es hier wieder zu einem leichten Rückgang der NK-Zellzahl.

Die Rezeptorexpression der Osteosarkome G2 zeigte eine signifikante Abnahme für die B-Zellen ($p=0,02$). Für die T-Zellen zeigte sich eine signifikante Zunahme der Rezeptorexpression ($p=0,03$). Auch bei den NKG2 D+ Zellen zeigte sich eine signifikante Zunahme der Rezeptorexpression ($p=0,01$). Die NKp30+ Zellen zeigten beim Osteosarkom G2 einen signifikanten Rückgang der Rezeptoraktivität ($p=0,04$).

Die Rezeptorexpression der Osteosarkome G3 zeigte keine signifikanten Werte in Bezug auf die B- oder T-Zell-Rezeptorexpression. Die Rezeptorexpression der B-Zellen nahm postoperativ nach sechs Monaten etwas zu, während die der T-Zellen nahezu gleich blieb.

Lediglich für den NK-Zellmarker CD3-/CD56+ zeigte sich eine signifikante Zunahme der Rezeptorexpression ($p=0,02$) bei den Osteosarkomen G3.

Vergleich der Zellzahl und Rezeptorexpression der Osteosarkome ohne und mit Rezidiv

Beim Rezidiv war die B- Zellzahl und die Aktivität der B- Zellen von Beginn der ersten Blutprobe an höher als bei dem rezidivfreien Patientenkollektiv. Die T-Zellzahl und Rezeptorexpression des Rezidivs war zu Beginn an niedriger als beim rezidivfreien Patientenkollektiv.

Die Zellzahl der CD3-/NKG2D+ und der CD3-/NKp30+ Zellen waren beim Rezidiv ganz geringfügig höher als beim rezidivfreien Patientenkollektiv. Auch die Rezeptorexpression war bei diesen NK- Zellmarkern höher als beim rezidivfreien Patientenkollektiv.

Die Zellzahlen und die Rezeptorexpression der CD3-/CD56+ und der CD3-/NKp46+ Zellen waren beim Rezidiv geringer als beim rezidivfreien Patientenkollektiv.

Eine deutlich vermehrte Aktivität zeigten die B-Zellen beim Osteosarkom Rezidiv. In der zweiten Blutprobe, d.h. drei Monate postoperativ nahm die Aktivität der B-Zellen sogar noch zu. Alle NK-Zellen, außer den CD3-/NKp46+ und den CD3-/CD56+ Zellen zeigten beim Rezidiv bereits in der ersten Messung eine höhere Aktivität als bei den rezidivfreien Patienten.

3.1.2 Einzelergebnisse

3.1.3 Zeitlicher Verlauf der prozentualen Zellzusammensetzung beim Osteosarkom für B-, T- und NK-Zellen (Abb.3, Abb.4, Tab.8, Tab.9, Tab.10, Tab.11)

Bei Betrachtung der prozentualen Zusammensetzung der untersuchten Zellen beim Osteosarkom ergibt sich im Vergleich zwischen prä- und postoperativen Entnahmepunkten ein recht homogenes Bild. Eine Ausnahme bildet lediglich die Zellzahl der B-Zellen.

Die B-Zellzahl nahm von der ersten (präoperativen) zur zweiten (postoperativen) Blutabnahme signifikant zu ($p=0,03$). Die Rezeptorexpression zeigte tendenziell dazu ebenfalls eine Zunahme.

Der Normwert für CD3-/CD19+ Lymphozyten liegt bei Gesunden um die 8-16%. Der Normbereich von reifen B- Zellen liegt bei 3-13% und der von unreifen B- Zellen wird mit 0-2% im peripheren Blut angegeben (Sack, Tárnok, 2006).

Die Zellzahl, wie auch die Aktivität der einzelnen B-Zelle war bei den Patienten mit einem Osteosarkom damit mutmaßlich supprimiert.

Die T-Zellzahl und Rezeptorexpression nahm von der ersten bis zur dritten Blutprobe tendenziell zu.

Die NK-Zellzahlen zeigten in der zweiten Blutabnahme nach der Resektion des Tumors zunächst einen Anstieg. Im weiteren zeitlichen Verlauf nahm die Zellzahl jedoch wieder ab. Die Rezeptorexpression verhielt sich dazu ähnlich. Auch hier kam es in der postoperativen Blutabnahme zunächst zu einer Zunahme der Aktivität. Im weiteren zeitlichen Verlauf war die Rezeptorexpression wieder rückläufig.

In der Literatur findet sich ein Anteil von T-Zellen von 55-83% im peripheren Blut (Comans-Bitter et al. 1997). Die T-Zellen der Osteosarkome ergaben zum präoperativen Zeitpunkt einen gemittelten Anteil von 69,0% .

In der Literatur wird der Normbereich der NK-Zellen mit 5-15% im peripheren Blut angegeben (Claus et al. 2008). Die Patienten mit einem Osteosarkom zeigten präoperativ einen gemittelten Anteil der CD3-/CD56+ Zellen von 7,19%. Hier zeigte sich bei den Sarkomen eine erniedrigte Aktivität der Lymphozyten bei niedriger Zellzahl.

Der gemittelte Anteil der CD3-/NKG2D+ bei den Osteosarkomen betrug 7,97%.

Die Osteosarkome zeigten für CD3-/NKp30+ einen gemittelten Anteil von 6,16%.

Der gemittelte Anteil der CD3-/NKp46+ Zellen lag bei 7,32%.

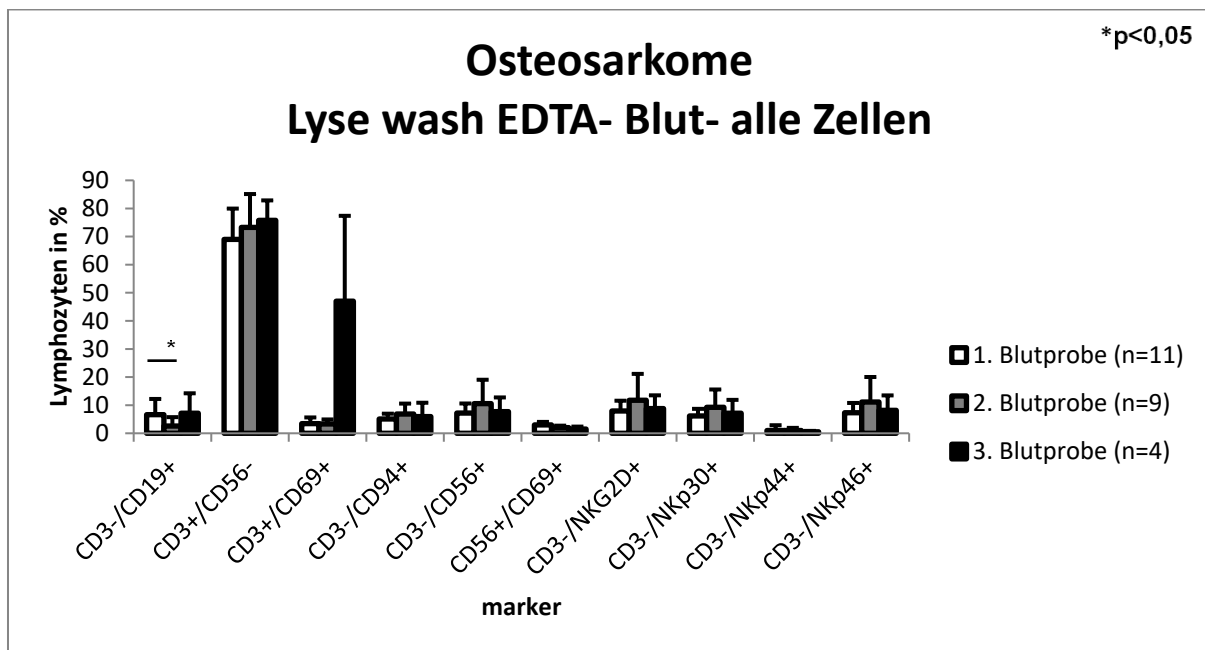


Abbildung 3: Prozentualer Anteil der Lymphozyten aus dem peripheren Blut bei Patienten mit Osteosarkomen. Die Grafik zeigt die Mittelwerte mit Standardabweichungen für die Zellzahl der gemessenen Zellen in der Durchflusszytometrie für die drei Blutproben. Die Balken zeigen die Mittelwerte der mittels Durchflusszytometrie gemessenen Zellen im zeitlichen Verlauf. Die Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen. Signifikante Abnahme der CD3-/CD19+ Zellen von der ersten zur zweiten Blutprobe (* p= 0,03).

Zeitlicher Verlauf der Durchschnittswerte für die B- Zellzahl (CD3-/CD19+) und die T- Zellzahl (CD3+/CD56-) beim Osteosarkom

Die folgende Tabelle zeigt die durchschnittlichen Zellzahlen der B- und T-Zellen im zeitlichen Verlauf. Von der ersten, präoperativen bis zu den postoperativen Blutabnahmen. Wie schon erwähnt, zeigt sich hier eine signifikante Abnahme der Zellzahl für die B-Zellen (CD3-/CD19+) nach der Resektion des Osteosarkoms.

Die Zellzahlen der T- Zellen zeigen, trotz Resektion, ähnliche Werte.

Zellmarker	1. Blutprobe (Zellzahl/ μ l)	2. Blutprobe (Zellzahl/ μ l)	3. Blutprobe (Zellzahl/ μ l)	Signifikanz
CD3-/CD19+	6,65 (5,57+/-)	2,59 (3,17+/-)	7,16 (7,07+/-)	p(1/2) = 0,03 p(2/3) = 0,07 p(1/3) = 0,44
CD3+/ CD56-	69 (10,97+/-)	73,28 (11,86+/-)	75,78 (7,1+/-)	p(1/2) = 0,2 p(2/3) = 0,36 p(1/3) = 0,14

Tabelle 8: Die Tabelle zeigt die Durchschnittswerte für die Zellzahl der ersten beiden Populationen und entspricht den B- und T-Zellen im zeitlichen Verlauf von der ersten präoperativen Blutentnahme bis zu den beiden postoperativen Blutabnahmen.

Zeitlicher Verlauf der Durchschnittswerte der Natürlichen Killerzellzahlen beim Osteosarkom

Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die zeitliche Entwicklung der einzelnen NK-Zellmarker.

Bei den einzelnen Zellzahlen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. Tendenziell zeigte die Zellzahl aller untersuchten NK-Zellmarker in der zweiten Blutprobe, ca. drei Monate nach der Resektion des Osteosarkoms, eine leichte Zunahme.

Die letzte Blutprobe, ca. sechs Monate nach der Resektion des Osteosarkoms zeigte ähnliche Werte wie die erste Messung zum präoperativen Zeitpunkt.

Zellmarker	1. Blutprobe (Zellzahl/ μ l)	2. Blutprobe (Zellzahl/ μ l)	3. Blutprobe (Zellzahl/ μ l)	Signifikanz
CD3-/CD56+	7,19 (3,42+/-)	10,55 (8,51+/-)	7,72 (5,04+/-)	p(1/2) = 0,12 p(2/3) = 0,28 p(1/3) = 0,41
CD3-/NKG2D+	7,97 (3,62 +/-)	11,76 (9,38 +/-)	8,78 (4,73 +/-)	p(1/2) = 0,11 p(2/3) = 0,28 p(1/3) = 0,36
CD3-/NKp30+	6,16 (2,55 +/-)	9,26 (6,33 +/-)	7,12 (4,76 +/-)	p(1/2) = 0,07 p(2/3) = 0,28 p(1/3) = 0,3
CD3-/NKp46+	7,32 (3,47 +/-)	11,15 (8,88 +/-)	8,18 (5,3 +/-)	p(1/2) = 0,1 p(2/3) = 0,27 p(1/3) = 0,36

Tabelle 9: Die Tabelle zeigt die Durchschnittswerte für die Zellzahl der einzelnen Populationen der NK-Zellen im zeitlichen Verlauf von der ersten präoperativen Blutentnahme bis zu den beiden postoperativen Blutabnahmen.

3.1.4 Zeitlicher Verlauf der prozentualen Rezeptordichte beim Osteosarkom für B-, T- und NK-Zelle

Die folgende Grafik soll einen Überblick über die Rezeptorexpression der einzelnen Lymphozyten im zeitlichen Verlauf geben.

Die B-Zellen zeigten nach ca. sechs Monaten postoperativ tendenziell die größte Aktivität mit einer Zunahme von 620,53% im Vergleich zum präoperativen Wert mit 464,5%.

Die Rezeptorexpression der T-Zellen zeigte für alle drei Messung ähnliche Werte. Es zeigte sich keine Tendenz. Signifikante Unterschiede ließen sich nicht finden.

Der NK-Zellmarker CD3-/CD56+ zeigte in der zweiten Messung eine minimale Erhöhung der Rezeptorexpression. Signifikante Unterschiede ließen sich auch hier nicht finden.

Die Rezeptorexpression der CD3-/NKG2D+ zeigte von der ersten, d.h. präoperativen Messung im Vergleich zur zweiten, postoperativen Messung einen Anstieg ($p=0,06$). In der nächsten folgenden Messung, d.h. sechs Monate nach der Resektion blieb die Rezeptordichte im Vergleich zum Ausgangswert auf einem ähnlichen, höheren Niveau.

Auch die Rezeptorexpression der CD3-/NKp30+ Zellen zeigte von der ersten zur zweiten Messung tendenziell eine Aktivitätszunahme ($p=0,06$). In der letzten Messung blieb die Rezeptordichte auf einem ähnlichen Niveau wie in der zweiten Untersuchung.

Einen signifikanten Unterschied zeigte die Rezeptorexpression bei den CD3-/NKp46+ Zellen, wenn man die zweite mit der dritten Messung vergleicht ($p=0,05$). Die zunächst höhere Rezeptorexpression vor Resektion des Osteosarkoms, die auch drei Monate postoperativ noch bestand nahm in der dritten Messung signifikant ab. Sechs Monate nach der Resektion des Osteosarkoms kam es also zu einer signifikanten Abnahme der Rezeptorexpression der CD3-/NKp46+ Zellen.

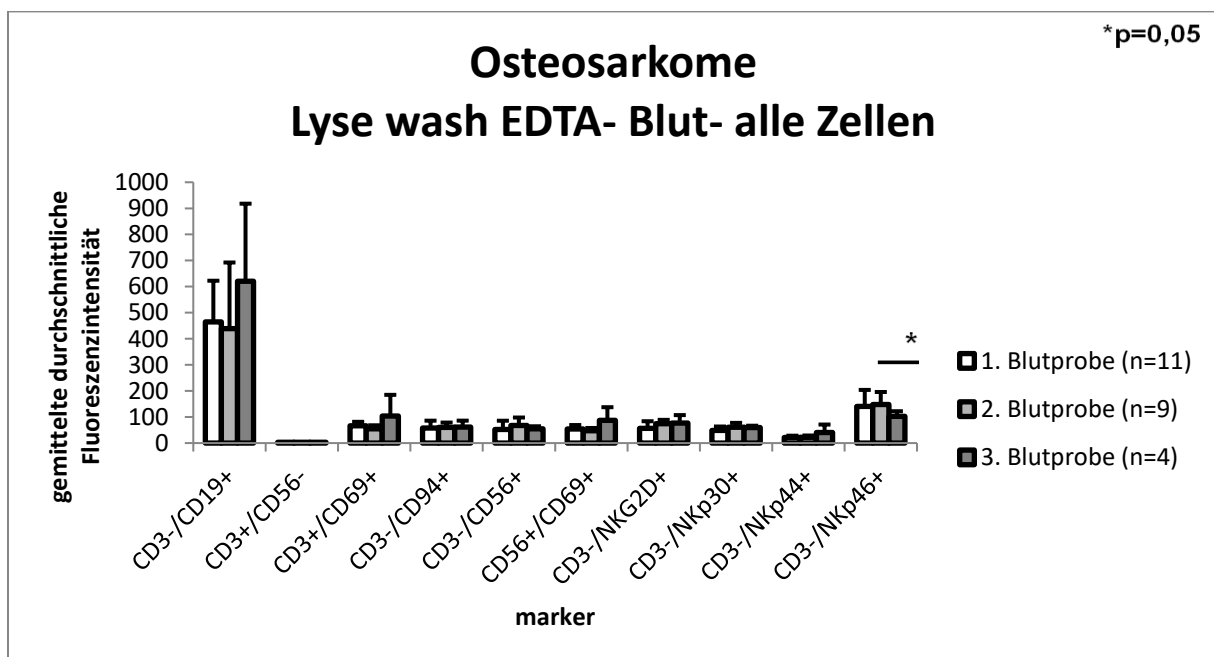


Abbildung 4: Mittlere Rezeptordichte (Mean fluorescence intensity, mfi) der Lymphozyten aus dem peripheren Blut bei Patienten mit Osteosarkomen. Die Grafik zeigt die Mittelwerte mit Standardabweichungen für die Rezeptorexpression der gemessenen Zellen in der Durchflusszytometrie für die drei Blutproben. Die Balken zeigen die Mittelwerte der mittels Durchflusszytometrie gemessenen Rezeptordichte im zeitlichen Verlauf. Die Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen. Die CD3-/NKp46+ Zellen zeigten von der zweiten zur dritten Messung eine signifikante Abnahme der mittleren Rezeptordichte ($p=0,05$).

Zeitlicher Verlauf der Durchschnittswerte für die Rezeptordichte der B-Zellen (CD3-/CD19+) und die Rezeptordichte der T-Zellen (CD3+/CD56-) bei Osteosarkomen

Die folgende Tabelle zeigt die Durchschnittswerte der Rezeptorexpression der ersten beiden Populationen und entspricht den B- und T-Zellen.

Signifikante Unterschiede ließen sich hier nicht finden. Lediglich die B-Zellen zeigten in der dritten Messung eine Zunahme der Rezeptorexpression im Vergleich zum Ausgangswert. Bei den T-Zellen ließ sich keine Tendenz erkennen.

Zellmarker	1. Blutprobe (Zellzahl/ μ l)	2. Blutprobe (Zellzahl/ μ l)	3. Blutprobe (Zellzahl/ μ l)	Signifikanz
CD3-/CD19+	464,5 (157,96 +/-)	438,79 (253,57 +/-)	620,53 (297,38 +/-)	p(1/2) = 0,39 p(2/3) = 0,15 p(1/3) = 0,11
CD3+ / CD56-	3,06 (0,59 +/-)	3,28 (0,56 +/-)	3,2 (0,62 +/-)	p(1/2) = 0,21 p(2/3) = 0,41 p(1/3) = 0,37

Tabelle 10: Die Tabelle zeigt die Durchschnittswerte für die Rezeptordichte der ersten beiden Populationen und entspricht den B- und T-Zellen im zeitlichen Verlauf von der ersten präoperativen Blutentnahme bis zu den beiden postoperativen Blutabnahmen.

Zeitlicher Verlauf der Durchschnittswerte für die Rezeptordichte der einzelnen NK-Zellen bei Osteosarkomen

In der folgenden Tabelle ist die durchschnittliche Rezeptorexpression der einzelnen NK-Zellmarker dargestellt. Signifikante Unterschiede zeigten die CD3-/NKp46+. Hier kam es von der ersten postoperativen Messung im Vergleich zur letzten postoperativen Messung zu einem signifikanten Rückgang der Rezeptorexpression ($p=0,05$).

Tendenziell zeigte sich eine Zunahme der Rezeptorexpression bei den CD3-/NKG2D+ Zellen und bei den CD3-/NKp30+ Zellen von der ersten (präoperativen) Messung zur zweiten (postoperativen) Messung ($p=0,06$).

Zellmarker	1. Blutprobe (Zellzahl/ μ l)	2. Blutprobe (Zellzahl/ μ l)	3. Blutprobe (Zellzahl/ μ l)	Signifikanz
CD3-/CD56+	52,06 (33,65 +/-)	67,53 (30,49 +/-)	54,46 (10,01 +/-)	p(1/2) = 0,15 p(2/3) = 0,21 p(1/3) = 0,44
CD3-/NKG2D+	56,66 (27,09 +/-)	74,0 (15,13 +/-)	76,81 (30,45 +/-)	p(1/2) = 0,06 p(2/3) = 0,42 p(1/3) = 0,11
CD3-/NKp30+	48,36 (15,11 +/-)	60,56 (16,89 +/-)	59,25 (7,29 +/-)	p(1/2) = 0,06 p(2/3) = 0,44 p(1/3) = 0,1
CD3-/NKp46+	140,29 (63,53 +/-)	148,16 (47,68 +/-)	102,4 (19,76 +/-)	p(1/2) = 0,39 p(2/3) = 0,05 p(1/3) = 0,13

Tabelle 11: Die Tabelle zeigt die Durchschnittswerte für die Rezeptorexpression der einzelnen Populationen der NK-Zellen im zeitlichen Verlauf von der ersten präoperativen Blutentnahme bis zu den beiden postoperativen Blutabnahmen. Hier zeigte sich für die mittlere Rezeptordichte der CD3-/NKp46+ Zellen von der zweiten zur dritten Blutprobe eine signifikante Abnahme ($p=0,05$).

3.1.5 Zeitlicher Verlauf der prozentualen Zellzusammensetzung beim Osteosarkom G2 für B-, T- und NK-Zellen (Abb.5, Abb.6, Tab. 12, Tab. 13, Tab.14, Tab.15)

Die folgende Grafik zeigt die durchschnittliche Zellzahl der B- und T-Zellen im Verlauf der ersten beiden Messungen.

Zwei Patienten hatten ein Osteosarkom G2. Hier konnte aufgrund fehlender Compliance nur die erste (präoperative) Blutabnahme und die erste (postoperative) Blutprobe gewonnen werden.

Die Zellzahlen der einzelnen Lymphozyten subsets zeigten keine signifikanten Unterschiede. Die B-Zellzahl und die Zellen mit dem Marker NKG2D+, NKp30+ und NKp46+ waren postoperativ rückläufig. Leider fehlt hier der weitere zeitliche Verlauf um zu sehen, ob es wieder zu einer Zu- oder Abnahme der Rezeptorexpression kam.

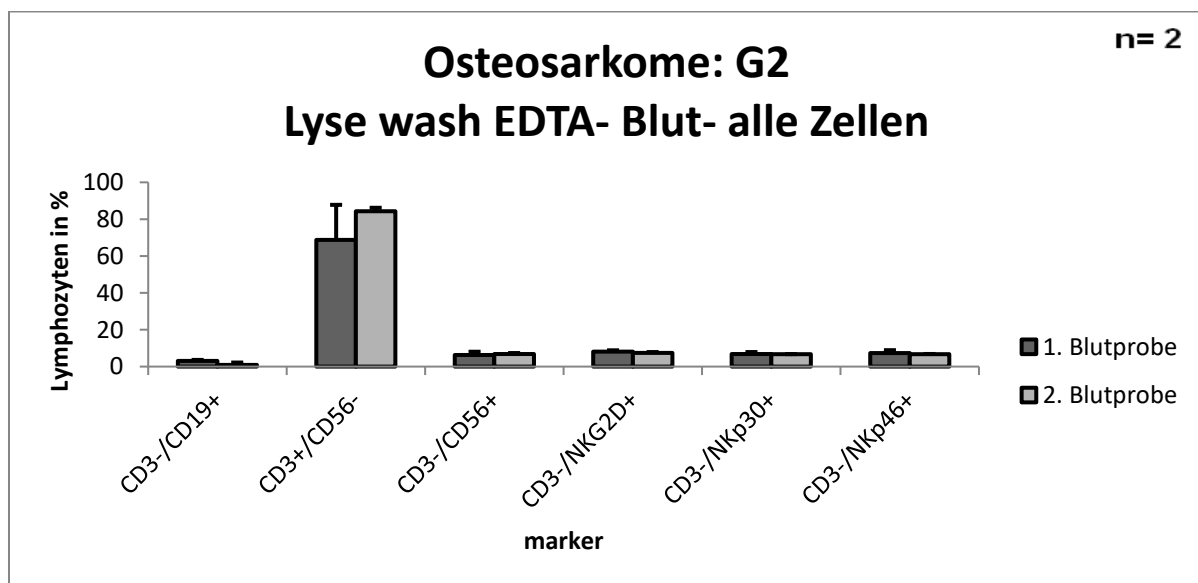


Abbildung 5: Prozentualer Anteil der Lymphozyten aus dem peripheren Blut bei Patienten mit Osteosarkomen G2. Die Grafik zeigt die Mittelwerte mit Standardabweichungen für die Zellzahl der gemessenen Zellen in der Durchflusszytometrie für die zwei Blutproben. Die Balken zeigen die Mittelwerte der mittels Durchflusszytometrie gemessenen Zellen im zeitlichen Verlauf. Die Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen.

Zeitlicher Verlauf der Durchschnittswerte für die B- Zellzahl (CD3-/CD19+) und die T- Zellzahl (CD3+/CD56-) bei Osteosarkomen G2

Die folgende Tabelle zeigt die durchschnittlichen Werte der Zellzahl der B- und T-Zellen. Tendenziell nahm die B-Zellzahl postoperativ von 3,05 auf 0,88 ab. Die T-Zellzahl stieg nach der Resektion des Tumors leicht an. Signifikante Unterschiede zeigten sich nicht.

Zellmarker	1. Blutprobe (Zellzahl/ μ l)	2. Blutprobe (Zellzahl/ μ l)	Signifikanz
CD3-/CD19+	3,05 (0,56+/-)	0,88 (1,31+/-)	p(1/2) = 0,09
CD3+/CD56-	68,8(18,99+/-)	84,32 (1,87+/-)	p(1/2) = 0,18

Tabelle 12: Die Tabelle zeigt die Durchschnittswerte für die Zellzahl der ersten beiden Populationen und entspricht den B- und T-Zellen im zeitlichen Verlauf von der ersten präoperativen Blutentnahme bis zur zweiten postoperativen Blutabnahmen.

Zeitlicher Verlauf der Durchschnittswerte der Natürlichen-Killerzellzahl bei Osteosarkomen G2

Die folgende Tabelle zeigt die Durchschnittswerte für die Rezeptordichte der einzelnen NK-Zellen. Signifikante Unterschiede zeigten sich hier nicht.

Zeitlicher Verlauf der Natürlichen Killerzellzahl bei Osteosarkomen G2

Zellmarker	1. Blutprobe (Zellzahl/ μ l)	2. Blutprobe (Zellzahl/ μ l)	Signifikanz
CD3-/CD56+	6,32 (1,73+/-)	6,8 (0,56+/-)	p(1/2) = 0,38
CD3-/NKG2D+	8,16 (0,66+/-)	7,45 (0,45+/-)	p(1/2) = 0,17
CD3-/NKp30+	6,79 (1,1+/-)	6,77 (0+/-)	p(1/2) = 0,49
CD3-/NKp46+	7,37 (1,53+/-)	6,75 (0,09+/-)	p(1/2) = 0,32

Tabelle 13: Die Tabelle zeigt die Durchschnittswerte für die Zellzahl der einzelnen Populationen der NK-Zellen im zeitlichen Verlauf von der ersten präoperativen Blutentnahme bis zu den beiden postoperativen Blutabnahmen.

3.1.6 Zeitlicher Verlauf der prozentualen Rezeptordichte beim Osteosarkom G2 für B-, T- und NK-Zelle

Die Rezeptorexpression zeigte eine signifikante Abnahme für die B- Zellen (p=0,02). Die gemittelte durchschnittliche Rezeptorexpression der T- Zellen zeigte für die postoperative Messung eine Zunahme (p=0,03). Bei den NKG2D+ Zellen zeigte sich eine signifikante Zunahme der Rezeptorexpression (p=0,01). Die NKp30+ Zellen zeigten ebenfalls eine signifikante Zunahme der Rezeptoraktivität (p=0,04).

Aufgrund der extrem geringen Fallzahl sind die signifikanten Unterschiede nur sehr eingeschränkt zu betrachten.

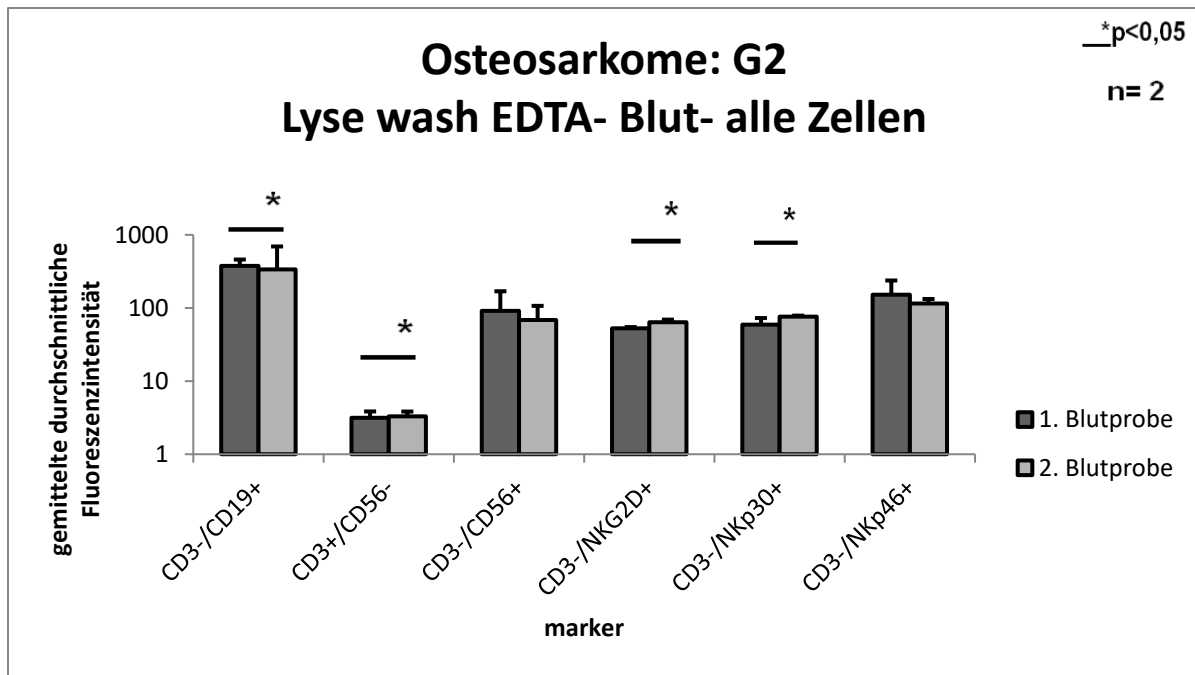


Abbildung 6: Mittlere Rezeptordichte (Mean fluorescence intensity, mfi) der Lymphozyten aus dem peripheren Blut bei Patienten mit Osteosarkomen G2. Die Grafik zeigt die Mittelwerte mit Standardabweichungen für die mittlere Rezeptordichte der gemessenen Zellen in der Durchflusszytometrie für die zwei Blutproben. Die Balken zeigen die Mittelwerte der mittels Durchflusszytometrie gemessenen Rezeptordichte im zeitlichen Verlauf. Die Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen. Die gemittelte Rezeptordichte der CD3-/CD19+ Zellen zeigte postoperativ einen signifikanten Rückgang ($p=0,02$). Die gemittelte durchschnittliche Rezeptorexpression der CD3-/CD56+ Zellen zeigte postoperativ eine Zunahme ($p=0,03$). Die gemittelte durchschnittliche Rezeptorexpression der NK-Zellen mit den Markern CD3-/NKG2D+ ($p=0,01$) und CD3-/NKp30+ ($p=0,04$) zeigten postoperativ ebenfalls eine signifikante Zunahme.

Zeitlicher Verlauf der Durchschnittswerte für die Rezeptordichte der B-Zellen (CD3-/CD19+) und die Rezeptordichte der T-Zellen (CD3+/CD56-) der Osteosarkome G2

Die folgende Tabelle zeigt die Durchschnittswerte der Rezeptorexpression der ersten beiden Populationen und entspricht den B- und T- Zellen.

Die Rezeptorexpression der B- Zellen nahm nach der Resektion des Tumors ab ($p= 0,02$). Bei den T- Zellen kam es nach der Resektion des Tumors zu einer Zunahme der Rezeptorexpression ($p= 0,03$).

Zellmarker	1. Blutprobe (Zellzahl/ μ l)	2. Blutprobe (Zellzahl/ μ l)	Signifikanz
CD3-/CD19+	375,4 (83,84 +/-)	336,83 (356,13 +/-)	$p(1/2) = 0,02$
CD3+/ CD56-	3,16 (0,7+/-)	3,3 (0,54+/-)	$p(1/2) = 0,03$

Tabelle 14: Die Tabelle zeigt die Durchschnittswerte für die Rezeptordichte der ersten beiden Populationen und entspricht den B- und T-Zellen im zeitlichen Verlauf von der ersten präoperativen Blutentnahme bis zur postoperativen Blutabnahme.

Zeitlicher Verlauf der Durchschnittswerte für die Rezeptordichte der einzelnen NK-Zellen der Osteosarkome G2

In der folgenden Tabelle ist die durchschnittliche Rezeptorexpression der einzelnen NK-Zellmarker dargestellt.

Die CD3-/NKG2D+ Zellen zeigten im Vergleich zum präoperativen Zeitpunkt eine deutliche Zunahme der Rezeptorexpression nach der Resektion des Osteosarkoms G2 ($p=0,01$).

Die CD3-/NKp30+ Zellen zeigten postoperativ eine Abnahme der Rezeptorexpression ($p=0,04$).

Bei den CD3-/CD56+ Zellen und bei den CD3-/NKp46+ Zellen zeigte ein Abnahme.

Zellmarker	1. Blutprobe (Zellzahl/ μ l)	2. Blutprobe (Zellzahl/ μ l)	Signifikanz
CD3-/CD56+	91,08 (78,14+/-)	39,88 (4,18+/-)	$p(1/2) = 0,22$
CD3-/NKG2D+	52,58 (2,1 +/-)	76,17 (2,43+/-)	$p(1/2) = 0,01$
CD3-/NKp30+	59,23 (13,61+/-)	20,17 (4,79+/-)	$p(1/2) = 0,04$
CD3-/NKp46+	152,04 (85,53+/-)	115,11 (17,5+/-)	$p(1/2) = 0,3$

Tabelle 15: Die Tabelle zeigt die Durchschnittswerte für die Rezeptorexpression der einzelnen Populationen der NK-Zellen im zeitlichen Verlauf von der ersten präoperativen Blutentnahme bis zu den postoperativen Blutabnahmen bei Osteosarkomen G2.

3.1.7 Zeitlicher Verlauf der prozentualen Zellzusammensetzung beim Osteosarkom G3 für B-, T- und NK-Zellen (Abb. 7, Abb.8, Tab.16, Tab. 17)

Die folgende Grafik zeigt die prozentuale Zellzahl im Verlauf der drei Messungen.

10 Patienten hatten ein Osteosarkom G3. Hier zeigte sich lediglich für die B-Zellzahl eine signifikante Abnahme von der ersten (präoperativen) zur zweiten Blutprobe (postoperativ). Die T-Zellzahl nahm tendenziell nach der Resektion des Sarkoms zu. Die NK-Zellzahlen zeigten nach der Resektion eine Zunahme und im weiteren zeitlichen Verlauf wieder einen Rückgang.

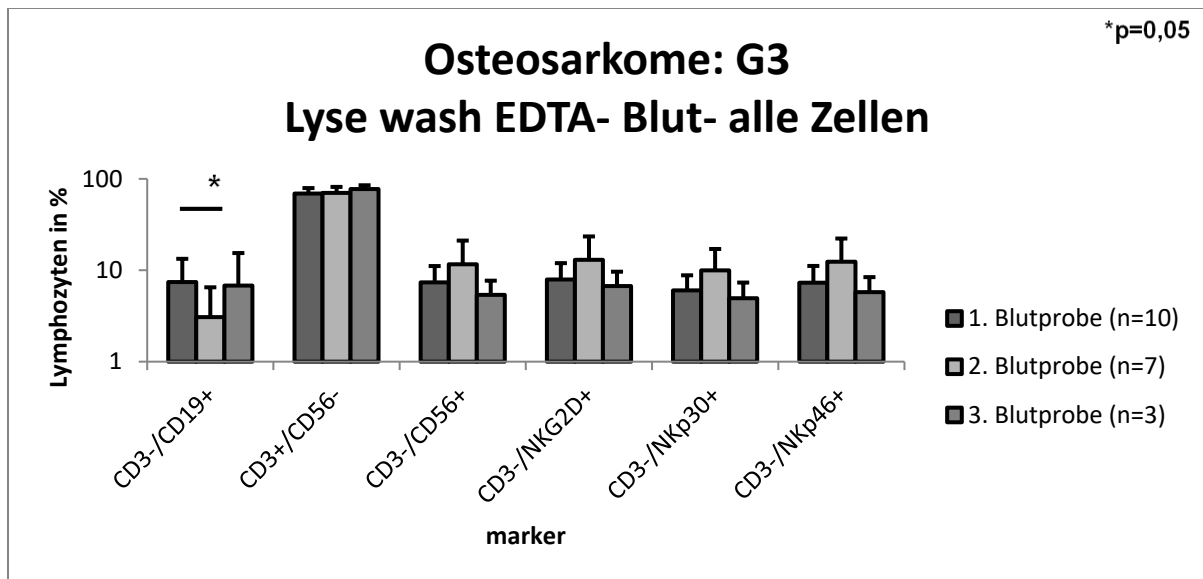


Abbildung 7: Prozentualer Anteil der Lymphozyten aus dem peripheren Blut bei Patienten mit Osteosarkomen G3. Die Grafik zeigt die Mittelwerte mit Standardabweichungen für die Zellzahl der gemessenen Zellen in der Durchflusszytometrie für drei Blutproben. Die Balken zeigen die Mittelwerte der mittels Durchflusszytometrie gemessenen Zellen im zeitlichen Verlauf. Die Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen. Signifikante Abnahme der CD3-/CD19+ Zellen von der ersten zur zweiten Blutprobe (* p= 0,05).

Zeitlicher Verlauf der Durchschnittswerte für die B-Zellzahl (CD3-/CD19+) und die T-Zellzahl (CD3+/CD56-) bei Osteosarkomen G3

Die folgende Tabelle zeigt die durchschnittlichen Werte der Zellzahl der B- und T-Zellen. Die B-Zellzahl zeigte von der ersten zur zweiten Messung eine signifikante Abnahme ($p=0,05$). In der dritten Messung nahm die B-Zellzahl tendenziell wieder zu.

In Bezug auf die T-Zellzahl zeigte sich keine Signifikanz. Die Zellzahl der T-Zellen zeigte vor und nach Resektion des Sarkoms ähnliche Werte.

Zellmarker	1. Blutprobe (Zellzahl x 10 ³)	2. Blutprobe (Zellzahl x 10 ³)	3. Blutprobe (Zellzahl x 10 ³)	Signifikanz
CD3-/CD19+	7,44 (5,91+/-)	3,07 (3,44+/-)	6,8 (8,62+/-)	p(1/2) = 0,05 p(2/3) = 0,16 p(1/3) = 0,44
CD3+/ CD56-	69,04 (10,25+/-)	70,11 (11,6+/-)	77,32 (7,82+/-)	p(1/2) = 0,42 p(2/3) = 0,18 p(1/3) = 0,12

Tabelle 16: Die Tabelle zeigt die Durchschnittswerte für die Zellzahl der ersten beiden Populationen und entspricht den B- und T- Zellen im zeitlichen Verlauf von der ersten präoperativen Blutentnahme bis zu den beiden postoperativen Blutabnahmen der Osteosarkome G3.

Zeitlicher Verlauf der Durchschnittswerte der Natürlichen Killerzellzahlen bei Osteosarkomen G3

Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die zeitliche Entwicklung der einzelnen NK-Zellmarker. Hier zeigten sich keine signifikanten Unterschiede bei den einzelnen NK-Zellmarkern.

Tendenziell scheint es in der ersten postoperativen Messung zu einer Zunahme der Zellzahl zu kommen. Im weiteren Verlauf war die Zellzahl dann tendenziell wieder rückläufig.

Zellmarker	1. Blutprobe (Zellzahl x 10 ³)	2. Blutprobe (Zellzahl x 10 ³)	3. Blutprobe (Zellzahl x 10 ³)	Signifikanz
CD3-/CD56+	7,38 (3,75+/-)	11,63 (9,5+/-)	5,39 (2,32+/-)	p(1/2) = 0,11 p(2/3) = 0,15 p(1/3) = 0,2
CD3-/NKG2D+	7,91 (4,04+/-)	13,0 (10,45+/-)	6,73 (2,91+/-)	p(1/2) = 0,1 p(2/3) = 0,18 p(1/3) = 0,33
CD3-/NKp30+	6,01 (2,79+/-)	9,96 (7,12 +/-)	4,95 (2,38+/-)	p(1/2) = 0,08 p(2/3) = 0,14 p(1/3) = 0,28
CD3-/NKp46+	7,3 (3,85+/-)	12,41 (9,85 +/-)	5,76 (2,65+/-)	p(1/2) = 0,09 p(2/3) = 0,15 p(1/3) = 0,27

Tabelle 17: Die Tabelle zeigt die Durchschnittswerte für die Zellzahl der einzelnen Populationen der NK- Zellen im zeitlichen Verlauf von der ersten präoperativen Blutentnahme bis zu den beiden postoperativen Blutabnahmen bei Osteosarkomen G3.

3.1.8 Zeitlicher Verlauf der prozentualen Rezeptordichte beim Osteosarkom G3 für B-, T- und NK-Zelle

Die Rezeptorexpression der B- und T-Zellen ergab keine signifikanten Unterschiede.

Eine signifikante Zunahme der Rezeptorexpression zeigte sich von der ersten zur zweiten Blutprobe nur für den NK-Zellmarker CD3-/CD56+ ($p = 0,02$).

Die NK-Zellen mit dem Marker CD3-/NKG2D+ zeigten von der ersten zur zweiten Messung eine Zunahme der exprimierten Rezeptoren ($p = 0,08$).

Ebenfalls zeigte sich eine Zunahme der Rezeptorexpression bei den CD3-/NKp30+ und den CD3-/NKp46+ Zellen von der ersten zur zweiten Messung.

Scheinbar kommt es hier postoperativ zunächst zu einem reaktivem Anstieg der NK-Zellzahlen, ohne jedoch auch dauerhaft zu einer vermehrten Rezeptorexpression zu führen. Auch hier sind die signifikanten Unterschiede aufgrund der geringen Fallzahl nur sehr eingeschränkt zu bewerten.

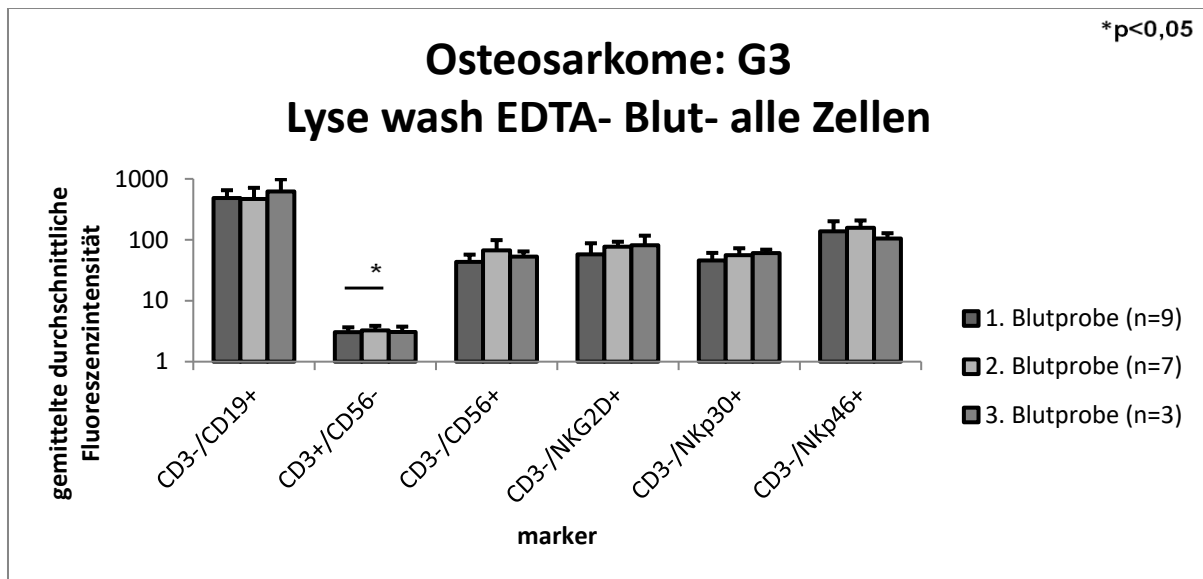


Abbildung 8: Mittlere Rezeptordichte (mean fluorescence intensity, mfi) der Lymphozyten aus dem peripheren Blut bei Patienten mit Osteosarkomen G3. Die Grafik zeigt die Mittelwerte mit Standardabweichungen für die mittlere Rezeptordichte der gemessenen Zellen in der Durchflusszytometrie für drei Blutproben. Die Balken zeigen die Mittelwerte der mittels Durchflusszytometrie gemessenen Zellen im zeitlichen Verlauf. Die Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen. Signifikante Zunahme der gemittelten durchschnittlichen Rezeptorexpression der CD3-/CD56+ Zellen von der ersten zur zweiten Blutprobe (* p= 0,02).

Zeitlicher Verlauf der Durchschnittswerte für die Rezeptordichte der B-Zellen (CD3-/CD19+) und der T-Zellen (CD3+/CD56-) bei Osteosarkomen G3

Die folgende Tabelle zeigt die durchschnittlichen Werte der Zellzahl der B- und T-Zellen. Bei den B-Zellen, wie auch bei den T-Zellen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.

Zellmarker	1. Blutprobe (Zellzahl x 10 ³)	2. Blutprobe (Zellzahl x 10 ³)	3. Blutprobe (Zellzahl x 10 ³)	Signifikanz
CD3-/CD19+	484,35 (167,0+/-)	467,92 (245,22+/-)	620,79 (364,23+/-)	p(1/2) = 0,44 p(2/3) = 0,23 p(1/3) = 0,18
CD3+/CD56-	3,05 (0,61+/-)	3,26 (0,6+/-)	3,07 (0,7+/-)	p(1/2) = 0,25 p(2/3) = 0,33 p(1/3) = 0,49

Tabelle 18: Die Tabelle zeigt die Durchschnittswerte für die Rezeptordichte der ersten beiden Populationen und entspricht den B- und T-Zellen im zeitlichen Verlauf von der ersten präoperativen Blutentnahme bis zu den beiden postoperativen Blutabnahmen der Osteosarkomen G3.

Zeitlicher Verlauf der Durchschnittswerte für die Rezeptordichte der einzelnen Natürlichen Killerzellen bei Osteosarkomen G3

In der folgenden Tabelle ist die durchschnittliche Rezeptorexpression der einzelnen NK-Zellmarker dargestellt.

Eine signifikante Zunahme der Rezeptorexpression von der ersten zur zweiten Blutprobe zeigte sich nur für den NK-Zellmarker CD3-/CD56+ ($p=0,02$).

Die NK-Zellen mit dem Marker CD3-/NKG2D+ zeigten postoperativ eine Zunahme der exprimierten Rezeptoren.

Ebenfalls zeigte postoperativ eine Zunahme der Rezeptorexpression bei den CD3-/NKp30+ Zellen. Die CD3-/NKp46+ Zellen zeigten postoperativ zunächst eine Zunahme. Im weiteren postoperativen Verlauf kam es jedoch wieder zu einer Abnahme der Rezeptorexpression.

Zellmarker	1. Blutprobe (Zellzahl x 10 ³)	2. Blutprobe (Zellzahl x 10 ³)	3. Blutprobe (Zellzahl x 10 ³)	Signifikanz
CD3-/CD56+	43,39 (13,69+/-)	67,24 (31,54+/-)	52,84 (11,62+/-)	$p(1/2) = 0,02$ $p(2/3) = 0,24$ $p(1/3) = 0,15$
CD3-/NKG2D+	57,57 (30,19+/-)	76,88 (16,03+/-)	81,25 (35,68+/-)	$p(1/2) = 0,08$ $p(2/3) = 0,4$ $p(1/3) = 0,14$
CD3-/NKp30+	45,93 (15,05+/-)	56,09 (16,57+/-)	60,38 (8,48+/-)	$p(1/2) = 0,11$ $p(2/3) = 0,35$ $p(1/3) = 0,08$
CD3-/NKp46+	137,67 (63,95+/-)	157,61 (50,11+/-)	104,79 (23,48+/-)	$p(1/2) = 0,25$ $p(2/3) = 0,07$ $p(1/3) = 0,21$

Tabelle 19: Die Tabelle zeigt die Durchschnittswerte für die Rezeptordichte der NK-Zellen im zeitlichen Verlauf von der ersten präoperativen Blutentnahme bis zu den beiden postoperativen Blutabnahmen der Osteosarkomen G3.

3.1.9 Zeitlicher Verlauf der prozentualen Zellzusammensetzung beim Osteosarkom ohne Rezidiv für B-, T- und NK-Zellen (Abb 9, Abb.10, Tab.20, Tab.21, Tab. 22, Tab. 23)

Die folgende Grafik zeigt die prozentuale Zellzahl im Verlauf der drei Messungen.

Von den 10 Patienten, die rezidivfrei blieben, zeigten sich nur bei der B-Zellzahl und bei der Rezeptorexpression signifikante Unterschiede.

Tendenziell nahm die B-Zellzahl und Rezeptorexpression nach der Resektion des Sarkoms wieder zu. In den ersten drei postoperativen Monaten nahm die B-Zellzahl zunächst signifikant ab ($p=0,01$) ab und erreichte sechs Monate postoperativ wieder eine deutliche Zunahme ($p=0,02$).

Dies lässt vermuten, dass es unter dem Sarkom bzw. der durchgeführten Therapie zu einer vermehrten Immunsuppression kommt, v.a. der B-Zellen. Hierauf wird im Rahmen der Diskussion eingegangen.

Die T-Zellzahl und Rezeptorexpression nahm tendenziell minimal zu. Signifikante Unterschiede ließen sich nicht finden.

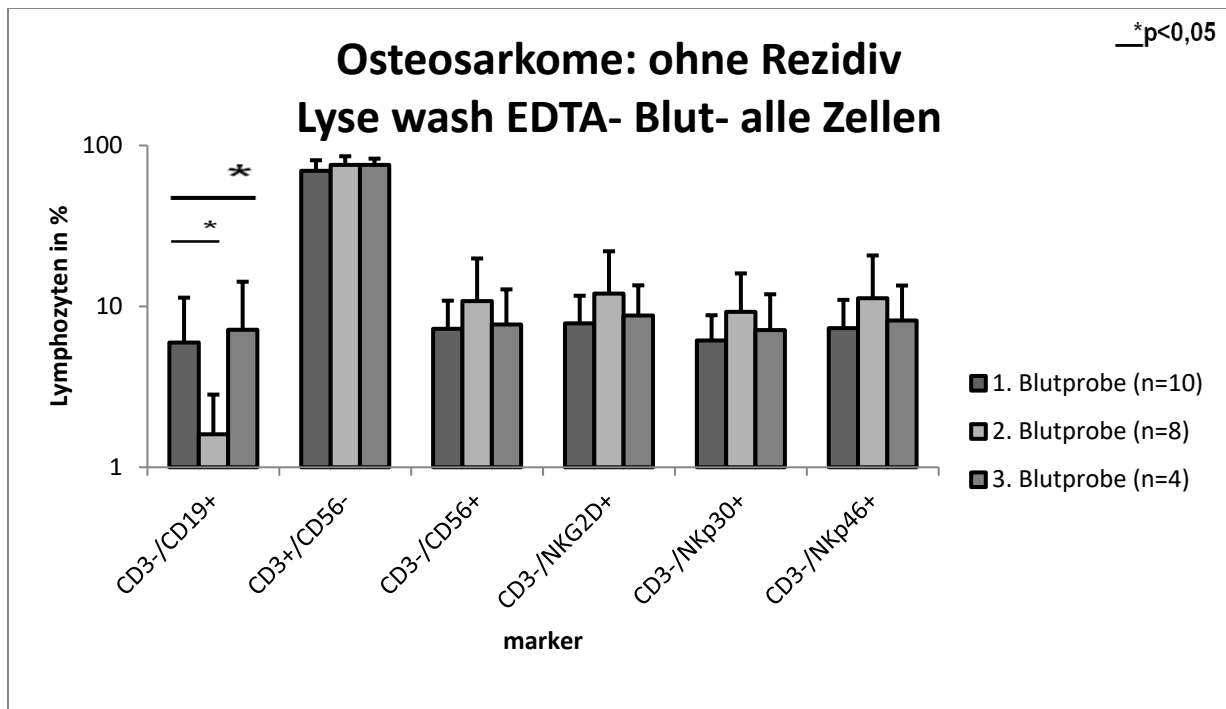


Abbildung 9: Prozentualer Anteil der Lymphozyten aus dem peripheren Blut bei Patienten mit Osteosarkomen ohne Rezidiv. Die Grafik zeigt die Mittelwerte mit Standardabweichungen für die Zellzahl der gemessenen Zellen in der Durchflusszytometrie für drei Blutproben. Die Balken zeigen die Mittelwerte der mittels Durchflusszytometrie gemessenen Zellen im zeitlichen Verlauf. Die Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen. Die CD3-/CD19+ Zellen zeigten von der ersten zur zweiten Messung eine signifikante Abnahme ($p = 0,01$). Von der ersten zur dritten Messung zeigte sich jedoch eine signifikante Zunahme dieses Zelltyps ($p = 0,02$).

Zeitlicher Verlauf der Durchschnittswerte für die B-Zellzahl (CD3-/CD19+) und die T-Zellzahl (CD3+/CD56-) bei Osteosarkomen ohne Rezidiv

Die folgende Tabelle zeigt die durchschnittlichen Werte der Zellzahl der B- und T-Zellen. Die B- Zellen zeigten in der ersten postoperativen Blutprobe einen signifikanten Rückgang der Zellzahl ($p = 0,01$). In der zweiten postoperativen Messung zeigte sich ein signifikanter Anstieg der B-Zellzahl ($p = 0,02$).

Für die T-Zellzahl zeigten sich keine signifikanten Werte.

Zellmarker	1. Blutprobe (Zellzahl x 10 ³)	2. Blutprobe (Zellzahl x 10 ³)	3. Blutprobe (Zellzahl x 10 ³)	Signifikanz
CD3-/CD19+	5,96 (5,36+/-)	1,61 (1,23+/-)	7,16 (7,07+/-)	p(1/2) = 0,01 p(2/3) = 0,02 p(1/3) = 0,37
CD3+/ CD56-	69,62 (11,35+/-)	75,7 (10,03+/-)	75,78 (7,1+/-)	p(1/2) = 0,12 p(2/3) = 0,49 p(1/3) = 0,17

Tabelle 20: Die Tabelle zeigt die Durchschnittswerte für die Zellzahl der ersten beiden Populationen und entspricht den B- und T- Zellen im zeitlichen Verlauf von der ersten präoperativen Blutentnahme bis zu den beiden postoperativen Blutabnahmen der Osteosarkome ohne Rezidiv.

Zeitlicher Verlauf der Durchschnittswerte der Natürlichen Killerzellzahlen bei Osteosarkomen ohne Rezidiv

Die folgende Tabelle zeigt die durchschnittliche Zellzahl der NK-Zellen im zeitlichen Verlauf. Die NK-Zellzahl und Rezeptorexpression zeigte tendenziell eine Zunahme nach der Resektion des Sarkoms und fiel im weiteren zeitlichen Verlauf wieder. Auch diese Aussagen sind aufgrund der kleinen Fallzahl nur eingeschränkt zu betrachten.

Zellmarker	1. Blutprobe (Zellzahl x 10 ³)	2. Blutprobe (Zellzahl x 10 ³)	3. Blutprobe (Zellzahl x 10 ³)	Signifikanz
CD3-/CD56+	7,25 (3,59+/-)	10,8 (9,05+/-)	7,72 (5,04+/-)	p(1/2) = 0,13 p(2/3) = 0,27 p(1/3) = 0,43
CD3-/NKG2D+	7,85 (3,81+/-)	12,02 (10,0+/-)	8,78 (4,73+/-)	p(1/2) = 0,13 p(2/3) = 0,27 p(1/3) = 0,35
CD3-/NKp30+	6,13 (2,67+/-)	9,26 (6,77+/-)	7,13 (4,76+/-)	p(1/2) = 0,09 p(2/3) = 0,29 p(1/3) = 0,32
CD3-/NKp46+	7,32 (3,66+/-)	11,24 (9,5+/-)	8,18 (5,3+/-)	p(1/2) = 0,12 p(2/3) = 0,28 p(1/3) = 0,37

Tabelle 21: Die Tabelle zeigt die Durchschnittswerte für die Zellzahl der NK-Zellen im zeitlichen Verlauf von der ersten präoperativen Blutentnahme bis zu den beiden postoperativen Blutabnahmen der Osteosarkome ohne Rezidiv.

3.1.10 Zeitlicher Verlauf der prozentualen Rezeptordichte beim Osteosarkom ohne Rezidiv für B-, T- und NK-Zelle

Die folgende Grafik zeigt die prozentuale Rezeptordichte im zeitlichen Ablauf bei Osteosarkomen ohne Rezidiv.

Die B-Zellzahl zeigte in der ersten postoperativen Messung eine signifikante Abnahme (p= 0,04). Im weiteren postoperativen Verlauf nahm die B-Zellzahl wieder zu.

Die T-Zellzahl ergab keine signifikanten Werte.

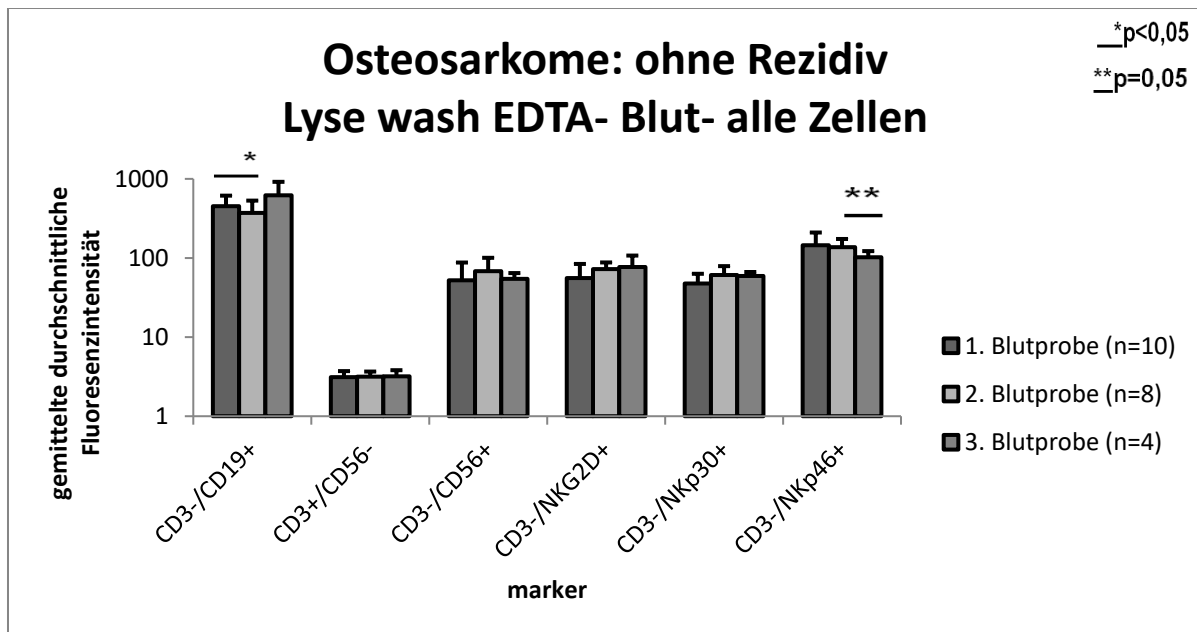


Abbildung 10: Mittlere Rezeptordichte (mean fluorescence intensity, mfi) der Lymphozyten aus dem peripheren Blut bei Patienten mit Osteosarkomen ohne Rezidiv. Die Grafik zeigt die Mittelwerte mit Standardabweichungen für die mittlere Rezeptordichte der gemessenen Zellen in der Durchflusszytometrie für drei Blutproben. Die Balken zeigen die Mittelwerte der mittels Durchflusszytometrie gemessenen Zellen im zeitlichen Verlauf. Die Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen. Signifikante Abnahme der gemittelten durchschnittlichen Rezeptorexpression der B-Zellen von der ersten zur zweiten Messung ($p=0,04$). Signifikante Abnahme der gemittelten durchschnittlichen Rezeptorexpression der CD3-/Nkp46+ Zellen ($p=0,05$).

Zeitlicher Verlauf der Durchschnittswerte für die Rezeptordichte der B-Zellen (CD3-/CD19+) und der T-Zellen (CD3+/CD56-) bei Osteosarkomen ohne Rezidiv

Die folgende Tabelle zeigt die Durchschnittswerte für die Rezeptordichte der B- und T-Zellen.

Die B-Zellen zeigten in der ersten Blutprobe nach der Resektion des Tumors zunächst einen signifikanten Rückgang der Rezeptorexpression ($p=0,04$) im weiteren zeitlich Verlauf nahm die Rezeptorexpression tendenziell wieder zu.

Signifikante Unterschiede bzgl. der Rezeptorexpression zeigten sich bei den T-Zellen nicht.

Zellmarker	1. Blutprobe (Zellzahl x 10 ³)	2. Blutprobe (Zellzahl x 10 ³)	3. Blutprobe (Zellzahl x 10 ³)	Signifikanz
CD3-/CD19+	452,52 (161,11+/-)	370,65 (160,37+/-)	620,53 (297,38+/-)	$p(1/2) = 0,14$ $p(2/3) = 0,04$ $p(1/3) = 0,09$
CD3+/CD56-	3,13 (0,6+/-)	3,17 (0,49 +/-)	3,2 (0,62+/-)	$p(1/2) = 0,43$ $p(2/3) = 0,47$ $p(1/3) = 0,42$

Tabelle 22: Die Tabelle zeigt die Durchschnittswerte für die Rezeptordichte der ersten beiden Populationen und entspricht den B- und T-Zellen im zeitlichen Verlauf von der ersten präoperativen Blutentnahme bis zu den beiden postoperativen Blutabnahmen der Osteosarkome ohne Rezidiv.

Zeitlicher Verlauf der Durchschnittswerte für die Rezeptordichte der einzelnen NK-Zellen bei Osteosarkomen ohne Rezidiv

Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die durchschnittliche Rezeptorexpression der einzelnen NK-Zellmarker.

Bei allen NK-Zellen zeigten sich in Bezug auf die Rezeptorexpression keine signifikanten Werte. Tendenziell nahmen die NK-Zellmarker, mit Ausnahme des CD3-/NKp46+ Markers in der ersten postoperativen Messung zu. Im weiteren zeitlichen Verlauf war tendenziell ein Rückgang zu sehen.

Lediglich die CD3-/NKp46+ Zellen zeigten tendenziell nach der Resektion eine stetige Abnahme der Rezeptorexpression.

Zellmarker	1. Blutprobe (Zellzahl x 10 ³)	2. Blutprobe (Zellzahl x 10 ³)	3. Blutprobe Zellzahl x 10 ³)	Signifikanz
CD3-/CD56+	52,15 (35,48+/-)	67,98 (32,57+/-)	54,46 (10,01+/-)	p(1/2) = 0,18 p(2/3) = 0,22 p(1/3) = 0,45
CD3-/NKG2D+	55,72 (28,37+/-)	72,45 (15,39+/-)	76,81 (30,45+/-)	p(1/2) = 0,08 p(2/3) = 0,38 p(1/3) = 0,12
CD3-/NKp30+	47,5 (15,64+/-)	60,87 (18,03+/-)	59,25 (7,29+/-)	p(1/2) = 0,06 p(2/3) = 0,44 p(1/3) = 0,09
CD3-/NKp46+	145,07 (64,84+/-)	137,17 (36,8+/-)	102,41 (19,76+/-)	p(1/2) = 0,38 p(2/3) = 0,05 p(1/3) = 0,12

Tabelle 23: Die Tabelle zeigt die Durchschnittswerte für die Rezeptordichte der NK-Zellen im zeitlichen Verlauf von der ersten präoperativen Blutentnahme bis zu den beiden postoperativen Blutabnahmen der Osteosarkome ohne Rezidiv.

3.1.11 Zeitlicher Verlauf der prozentualen Zellzusammensetzung beim Osteosarkom mit Rezidiv für B-, T- und NK-Zellen (Abb.11, Abb.12, Tab.24, Tab.25, Tab.26, Tab.27)

Bei einem Patienten zeigte sich im späteren zeitlichen Verlauf ein Rezidiv. Hier konnte nur eine präoperative und eine postoperative Blutprobe gewonnen werden (lost to follow up).

Die B- und T-Zellzahlen nahmen ab.

Tendenziell kam es nach der Resektion des Sarkoms zu einer Zunahme der NK-Zellzahl.

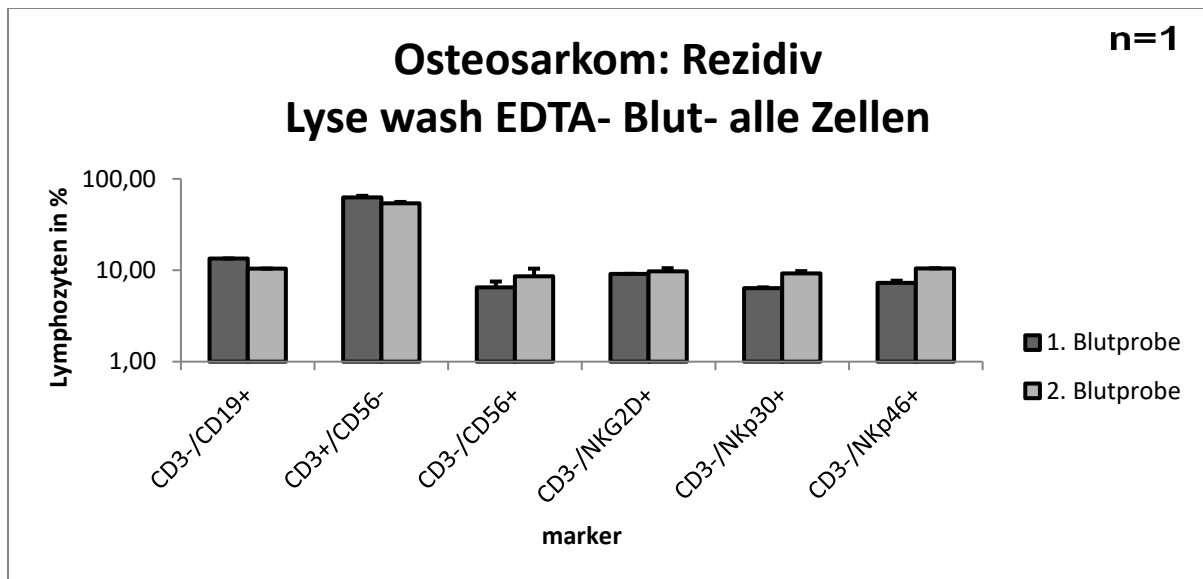


Abbildung 11: Prozentualer Anteil der Lymphozyten aus dem peripheren Blut beim Patienten mit Osteosarkom Rezidiv. Die Grafik zeigt die Mittelwerte mit Standardabweichungen für die Zellzahl der gemessenen Zellen in der Durchflusszytometrie für drei Blutproben. Die Balken zeigen die Mittelwerte der mittels Durchflusszytometrie gemessenen Zellen im zeitlichen Verlauf. Die Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen.

Zeitlicher Verlauf der Durchschnittswerte für die B-Zellzahl (CD3-/ CD19+) und die T-Zellzahl (CD3+/CD56-) beim Osteosarkom mit Rezidiv

Die folgende Tabelle zeigt die durchschnittlichen Werte der Zellzahl der B- und T-Zellen vor und nach der Resektion des Tumors.

Innerhalb der ersten drei postoperativen Monate kam es tendenziell zu einem Rückgang der B- und T-Zellzahlen.

Zellmarker	1. Blutprobe (Zellzahl x 10 ³)	2. Blutprobe (Zellzahl x 10 ³)
CD3-/CD19+	13,46 (0,0+/-)	10,44 (0,0+/-)
CD3+/CD56-	62,78 (2,48+/-)	53,94 (1,98+/-)

Tabelle 24: Die Tabelle zeigt die Durchschnittswerte für die Zellzahl der ersten beiden Populationen und entspricht den B- und T-Zellen im zeitlichen Verlauf von der ersten präoperativen Blutentnahme bis zur postoperativen Blutabnahme des Osteosarkoms mit Rezidiv.

Zeitlicher Verlauf der Durchschnittswerte der Natürlichen Killerzellzahlen beim Osteosarkom mit Rezidiv

Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die zeitliche Entwicklung der einzelnen NK-Zellmarker.

Anders als bei den B- und T-Zellen nahm die Anzahl der NK-Zellen nach der Resektion des Tumors tendenziell zu.

Zellmarker	1. Blutprobe (Zellzahl x 10 ³)	2. Blutprobe (Zellzahl x 10 ³)
CD3-/CD56+	6,51 (1,02+/-)	8,59 (1,83+/-)
CD3-/NKG2D+	9,11 (0,02+/-)	9,75 (0,79+/-)
CD3-/NKp30+	6,38 (0,13+/-)	9,25 (0,54+/-)
CD3-/NKp46+	7,27 (0,42+/-)	10,46 (0,05+/-)

Tabelle 25: Die Tabelle zeigt die Durchschnittswerte für die Zellzahl der einzelnen Populationen der NK-Zellen im zeitlichen Verlauf von der ersten präoperativen Blutentnahme bis zur postoperativen Blutabnahme des Osteosarkoms mit Rezidiv.

3.1.12 Zeitlicher Verlauf der prozentualen Rezeptordichte beim Osteosarkom Rezidiv für B-, T- und NK-Zelle

Die folgende Grafik zeigt die prozentuale Rezeptordichte vor und nach der Resektion des Osteosarkoms mit einem späteren Rezidiv.

Die Anzahl der B- und T-Zellen scheint postoperativ zugenommen zu haben.

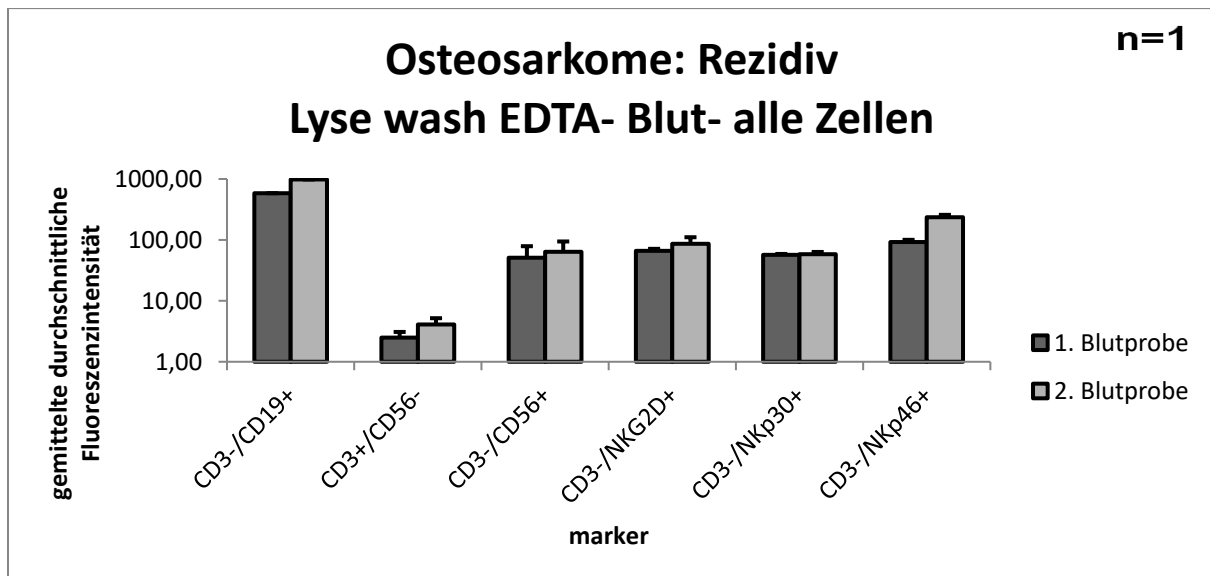


Abbildung 12 : Mittlere Rezeptordichte(mean fluorescence intensity, mfi) der Lymphozyten aus dem peripheren Blut beim Osteosarkom Patienten mit einem Rezidiv. Die Grafik zeigt die Mittelwerte mit Standardabweichungen für die mittlere Rezeptordichte der gemessenen Zellen in der Durchflusszytometrie für zwei Blutproben. Die Balken zeigen die Mittelwerte der mittels Durchflusszytometrie gemessenen Zellen im zeitlichen Verlauf. Die Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen.

Zeitlicher Verlauf der Durchschnittswerte für die Rezeptordichte der B- Zellen (CD3-/CD19+) und der T- Zellen (CD3+/CD56-) beim Osteosarkom mit Rezidiv

Die folgende Tabelle zeigt die Rezeptordichte der B- und T-Zellen prä- und postoperativ. Nach der Resektion hat die Anzahl der Rezeptoren der B- und T-Zellen scheinbar zugenommen.

Zellmarker	1. Blutprobe (Zellzahl x 10 ³)	2. Blutprobe (Zellzahl x 10 ³)
CD3-/CD19+	584,8 (0,0+/-)	983,95 (0,0+/-)
CD3+/CD56-	2,49 (0,6+/-)	4,1 (1,09+/-)

Tabelle 26: Die Tabelle zeigt die Durchschnittswerte für die gemessene Rezeptordichte der ersten beiden Populationen und entspricht den B- und T-Zellen im zeitlichen Verlauf von der ersten präoperativen Blutentnahme bis zur postoperativen Blutabnahmen des Patienten mit Osteosarkom-Rezidiv.

Zeitlicher Verlauf der Durchschnittswerte der Rezeptordichte der Natürlichen Killerzellen beim Osteosarkom mit Rezidiv

Die Rezeptordichte der einzelnen NK-Zellmarker scheint nach der Resektion des Osteosarkoms zugenommen zu haben.

Leider liegt keine weitere postoperative Blutprobe vor.

Zellmarker	1. Blutprobe (Zellzahl x 10 ³)	2. Blutprobe (Zellzahl x 10 ³)
CD3-/CD56+	51,16 (27,66+/-)	63,98 (30,25+/-)
CD3-/NKG2D+	66,04 (5,35+/-)	86,47 (24,18+/-)
CD3-/NKp30+	56,99 (1,82+/-)	58,12 (5,3+/-)
CD3-/NKp46+	92,35 (8,01+/-)	236,17 (21,66+/-)

Tabelle 27: Die Tabelle zeigt die Durchschnittswerte für die Rezeptordichte der NK-Zellen im zeitlichen Verlauf von der ersten präoperativen Blutentnahme bis zur zweiten postoperativen Blutabnahmen des Patienten mit Osteosarkom-Rezidiv.

3.2 Osteochondrome (Abb. 13, Abb. 14)

Patientenkollektiv

Bei drei Patienten im Alter von sechs bis 35 Jahren wurde ein Osteochondrom entfernt. Bei diesen Patientinnen wurde unmittelbar vor der Resektion des Tumors Blut in EDTA-Röhrchen abgenommen. Die Werte dieses Blutes dienen als Vergleichswert für die Werte aus den Blutabnahmen der Osteosarkom-Patienten.

Alter der Patienten

Die jüngste Patientin dieser Studie war sechs Jahre alt und die älteste Patientin war 35 Jahre alt. Gemittelt hatte diese Patientengruppe ein durchschnittliches Alter von 17 Jahren.

Geschlechterverteilung

Die drei Patienten mit einem Osteochondrom waren alle Frauen.

3.2.1 Prozentualen Zellzusammensetzung beim Osteochondrom für B-, T- und NK-Zellen

Die durchschnittliche B-Zellzahl lag beim Osteochondrom bei 14,27 (5,98+/-) und die T-Zellzahl bei 67,22 (4,37+/-).

Im Vergleich zum Osteosarkom war die B- Zellzahl der Patienten mit einem Osteochondrom doppelt so hoch.

Die T-Zellzahl war bei den Osteochondromen im Vergleich zu den Osteosarkomen etwas geringer gewesen.

Die NK-Zellen mit dem Marker CD3-/CD56+ zeigten eine gemittelte Zellzahl von 7,51 (1,99+/-). Die durchschnittliche Zellzahl, der CD3-/NKG2D+ Zellen lag bei den Osteochondromen bei 9,12 (3,05+/-). Für den Marker CD3-/NKp30+ betrug die durchschnittliche Zellzahl 7,61 (2,23+/-) und für die NK-Zellen mit dem Marker CD3-/NKp46+ zeigte sich eine durchschnittliche Zellzahl von 8,26 (2,39+/-) bei den Osteochondromen.

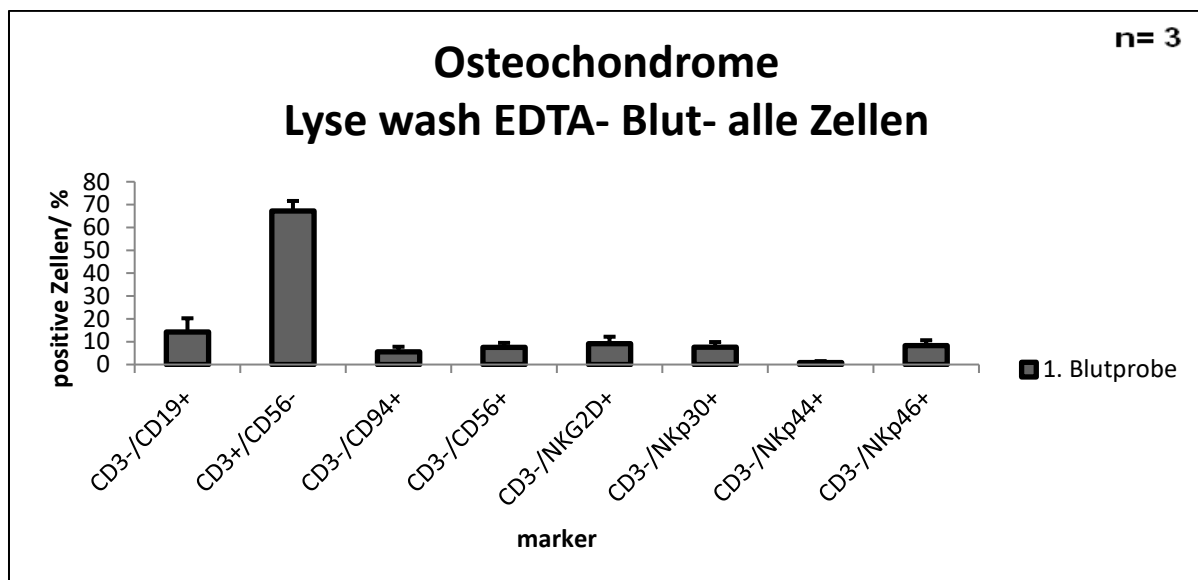


Abbildung 13: Prozentualer Anteil der Lymphozyten aus dem peripheren Blut bei Patienten mit Osteochondrom. Die Grafik zeigt die Mittelwerte mit Standardabweichungen für die Zellzahl der gemessenen Zellen in der Durchflusszytometrie für eine Blutprobe. Die Balken zeigen die Mittelwerte der mittels Durchflusszytometrie gemessenen Zellen. Die Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen.

3.2.2 Beschreibung der Rezeptorexpression beim Osteochondrom für B-, T- und NK-Zellen

Die B-Zellen hatten eine durchschnittliche Rezeptorexpression von 663,72 (130,41+/-). Beim Osteosarkom lag die Rezeptorexpression der B-Zellen präoperativ bei 464,5 und betrug sechs Monate postoperativ 620,53.

Die durchschnittliche Rezeptorexpression der T-Zellen war bei den Osteochondromen 2,88 (0,46+/-). Bei den Osteosarkomen lag die durchschnittliche Rezeptorexpression der T-Zellen präoperativ bei 3,06. Die Rezeptorexpression der T-Zellen war bei den Osteosarkomen zu Beginn an höher und lag auch sechs Monate postoperativ bei 3,2.

Die Rezeptorexpression der einzelnen NK-Zellen war bei den Osteochondromen im Vergleich zu den Osteosarkomen im Verlauf etwas geringer.

Die NK-Zellen mit dem Marker CD3-/CD56+ wiesen bei den Osteochondromen eine Rezeptorexpression von 56,89 (15,63+/-) auf. Die durchschnittliche Rezeptorexpression der Osteochondrome mit dem Marker CD3-/NKG2D+ betrug 82,85 (6,52+/-). Bei den CD3-/NKp30+ Zellen zeigte sich bei den Osteochondromen eine Rezeptorexpression von 52,92 (4,25+/-). Die durchschnittliche Rezeptorexpression der CD3-/NKp46+ Zellen betrug beim Osteochondrom 146,51 (27,19+/-).

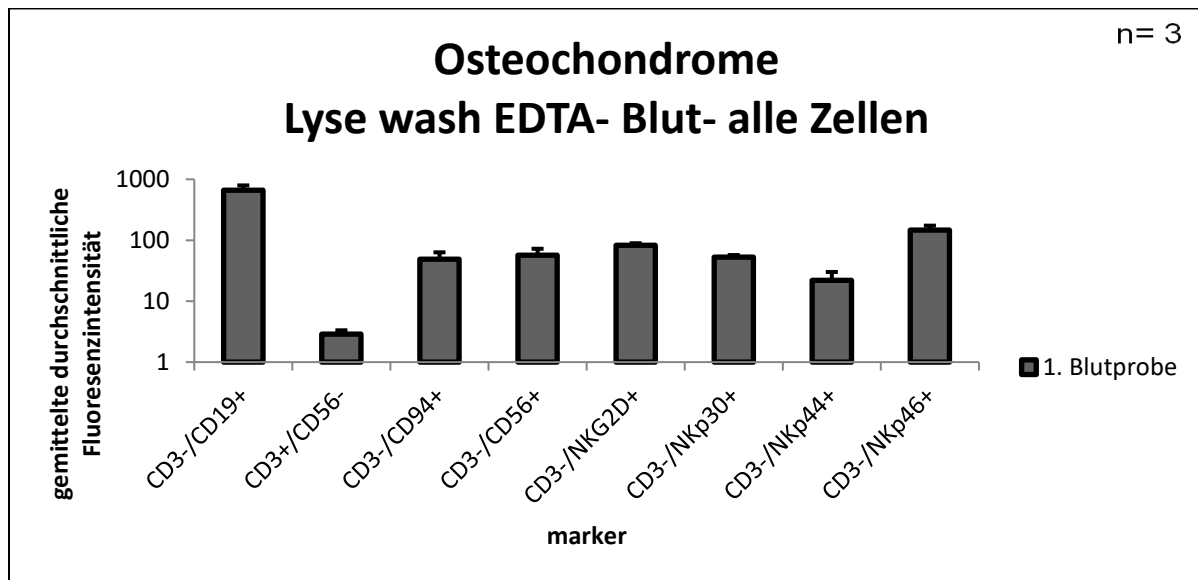


Abbildung 14: Mittlere Rezeptordichte (mean fluorescence intensity, mfi) der Lymphozyten aus dem peripheren Blut bei Patienten mit Osteochondrom. Die Grafik zeigt die Mittelwerte mit Standardabweichungen für die Rezeptorexpression der gemessenen Zellen in der Durchflusszytometrie für die Blutprobe. Die Balken zeigen die Mittelwerte der mittels Durchflusszytometrie gemessenen Zellen. Die Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen.

3.3 Liposarkome

Patientenkollektiv

Bei 13 Patienten mit Liposarkomen wurde wie schon beschrieben zu verschiedenen Zeitpunkten Blut in EDTA-Röhrchen abgenommen.

Therapieverfahren

Von diesen 13 Patienten unterzog sich ein Patient einer neoadjuvanten Chemotherapie. Alle anderen Patienten dieser Gruppe hatten zum Zeitpunkt der Messungen weder eine Chemotherapie noch eine Bestrahlung prä- oder postoperativ erhalten.

Die durchschnittliche Zellzahl und Rezeptorexpression war bei diesem Patienten zum Zeitpunkt der ersten präoperativen Messung ähnlich, wie die der Patienten ohne eine neoadjuvante Chemotherapie. Daher ging dieser Patient in die vorliegenden Messergebnisse mit ein.

Alter der Patienten

Die jüngste Patientin dieser Studie war 33 Jahre alt und der älteste Patient war 80 Jahre alt. Gemittelt hatte diese Patientengruppe ein durchschnittliches Alter von 58 Jahren. Das

Liposarkom kann in jedem Alter entstehen, tritt aber gehäuft zwischen dem 45. und 55. Lebensjahr oder unter 15 Jahren auf.

Geschlechterverteilung

Sieben Frauen und sechs Männer wurden in der Studie erfasst.

3.3.1 Zusammenfassung der Patienten mit einem Liposarkom

Zellzahl und Rezeptorexpression der Patienten mit einem Liposarkom im zeitlichen Verlauf

Tendenziell kam es in Bezug auf die B- und die T-Zellzahl von der ersten bis zur dritten Blutprobe zu einer Abnahme. Signifikante Unterschiede in Bezug zur Zellzahl zeigten sich nicht.

Die NK-Zellzahl der untersuchten NK-Zellen verhielt sich gegenläufig und nahm von der ersten bis zur dritten Blutprobe zu. Auch hier zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. In Bezug auf die Rezeptordichte zeigte sich eine Abnahme der Rezeptorexpression der B-Zellen.

Die Aktivität der einzelnen T-Zelle zeigte einen leichten Einbruch in der zweiten Blutprobe und erreichte in der dritten Untersuchung einen ähnlichen Wert wie in der ersten Blutprobe. T-Zellen scheinen auf ein Liposarkom nur mit einer geringen Immunantwort zu reagieren. Die Zellzahl wie auch die Rezeptorexpression der CD3-/CD56+, der CD3-/NKG2D+, der CD3-/NKp30+ und der CD3-/NKp46+ Zellen zeigten bezogen auf die 3. Messung tendenziell eine Zunahme.

Zellzahl und Rezeptorexpression der Liposarkome G1 und G3 im Vergleich

Die B-Zellzahl und die Aktivität der B-Zellen sind bei den Liposarkomen G1 höher als bei den Liposarkomen G3, d.h. mit zunehmender Dedifferenzierung des Liposarkoms kommt es mutmaßlich zu einer zunehmenden Immunsuppression der B-Zellen.

In Bezug auf die T-Zellzahl verhält es sich jedoch gegenläufig. Die T-Zellzahl ist bei den Liposarkomen G3 höher als bei den Liposarkomen G1. Vergleicht man hierzu jedoch die Aktivität der einzelnen T-Zellen fällt auf, dass die Aktivität der einzelnen T-Zelle der Liposarkome G3 minimal geringer ist, als bei den Liposarkomen G1. Das Immunsystem scheint bei den Liposarkomen G3 durch eine Zunahme der T-Zellzahl dem malignen Geschehen entgegen zu wirken, ohne jedoch auch eine vermehrte Aktivität der einzelnen T-Zellen zu erreichen.

Die NK-Zellzahlen sind bei den Liposarkomen G3 im Vergleich zu denen der Liposarkome G1 von Beginn an deutlich reduziert. Betrachtet man hierzu die Aktivität der einzelnen gemessenen NK-Zellmarker fällt auf, dass sie sich zum präoperativen Zeitpunkt nicht wesentlich voneinander unterscheiden. Bereits ein Liposarkom G1 führt zu einer ähnlichen Aktivitätsabnahme der einzelnen NK-Zellen wie ein Liposarkom G3.

Betrachtet man den weiteren postoperativen Verlauf der NK-Zellaktivität zeigt sich, dass es postoperativ bei den Liposarkomen G3 im Vergleich zu den Liposarkomen G1 zu einer erhöhten Aktivität der CD3-/NKG2D+ und der CD3-/NKp46+ Zellen kommt. Die Anzahl der

NK-Zellen scheint sechs Monate postoperativ bei den Liposarkomen G1 und G3 recht ähnliche Werte aufzuweisen.

Vergleich der Zellzahl und Rezeptorexpression der Liposarkome ohne und mit Rezidiv

Hier ist nur möglich eine Aussage zum präoperativen Zeitpunkt zu treffen. Die Aussage ist aufgrund der Fallzahl (Liposarkom mit Rezidiv, n=1) allenfalls beschreibend. Die B- und T-Zellzahl zeigt beim Patienten mit Rezidiv ähnliche Werte wie bei den Patienten ohne Liposarkom Rezidiv. Auch hinsichtlich der Aktivität zeigen sich keine großen Unterschiede für die B- und T-Zellen. Ähnlich verhält es sich auch mit der Anzahl der gemessenen NK-Zellen und deren Aktivität. Hier zeigten sich zum präoperativen Zeitpunkt ebenfalls recht ähnliche Werte. Hier wäre eine Verlaufsbeobachtung und ein größeres Patientenkollektiv für weitere Aussagen sinnvoll gewesen. Erfreulicherweise trat aber nur bei einem Patienten ein Rezidiv auf.

Vergleich der Zellzahl und Rezeptorexpression der Liposarkome mit den Lipomen

Bei den Lipomen fanden sich ähnliche Zellzahlen für die B-Zellen. Lediglich die T-Zellzahl war im Vergleich zu den anderen Lymphozytenzellzahlen bei den Liposarkomen erhöht. In Bezug auf die Rezeptorexpression der T-Zellen zeigten sich bei den Lipomen und Liposarkomen ähnliche Werte. Die B-Zellexpression waren bei den Lipomen im Vergleich zu den Liposarkomen etwas erhöht.

Die NK-Zellzahl war bei den Lipomen im Vergleich zu denen der Liposarkome geringfügig erhöht. Vergleicht man dazu die Aktivität so zeigte sich, dass die Rezeptorexpression der NK-Zellen bei den Lipomen ebenfalls tendenziell erhöht war.

Unter einem Lipom kommt es scheinbar nicht zu einer Immunsuppression wie dies für das Liposarkom zu vermuten ist.

3.3.2 Einzelergebnisse

3.3.3 Zeitlicher Verlauf der prozentualen Zellzusammensetzung beim Liposarkom für B-, T- und NK-Zellen (Abb.15, Abb.16, Tab.28, Tab. 29, Tab. 30, Tab.31)

Tendenziell kam es in Bezug auf die B- und die T-Zellzahl von der ersten bis zur dritten Blutprobe zu einer Abnahme. Signifikante Unterschiede in Bezug zur Zellzahl zeigten sich nicht.

Die NK-Zellzahl der untersuchten NK-Zellen verhielt sich gegenläufig und nahm von der ersten bis zur dritten Blutprobe zu. Auch hier zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.

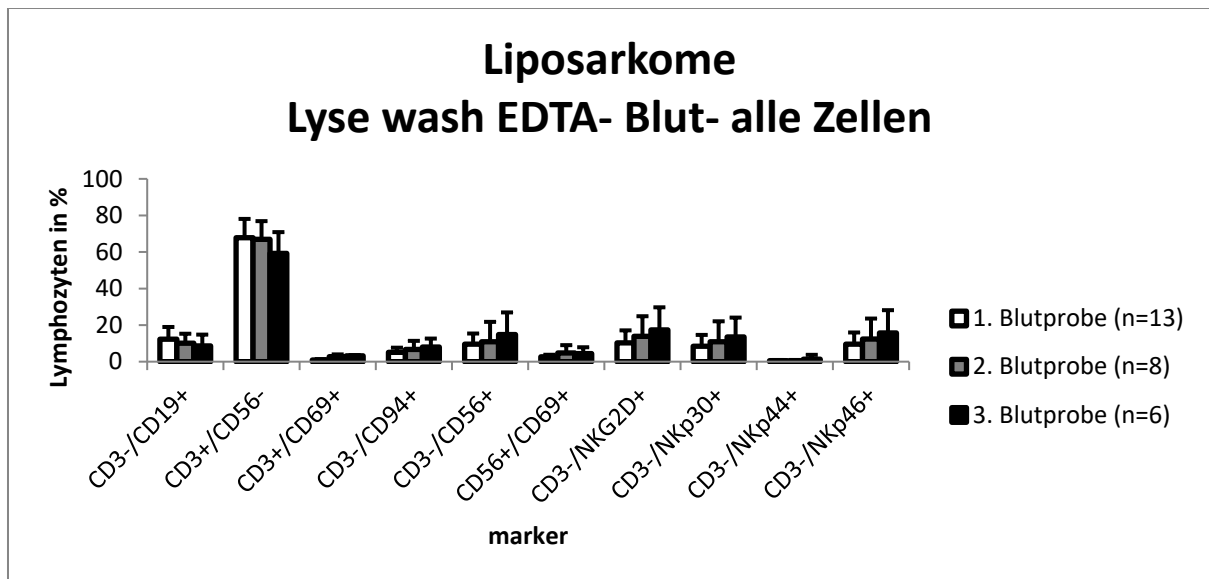


Abbildung 15: Prozentualer Anteil der Lymphozyten aus dem peripheren Blut bei Patienten mit Liposarkom. Die Grafik zeigt die Mittelwerte mit Standardabweichungen für die Zellzahl der gemessenen Zellen in der Durchflusszytometrie für drei Blutproben. Die Balken zeigen die Mittelwerte der mittels Durchflusszytometrie gemessenen Zellen im zeitlichen Verlauf. Die Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen.

Zeitlicher Verlauf der Durchschnittswerte für die B- Zellzahl (CD3-/CD19+) und die T- Zellzahl (CD3+/CD56-) bei Liposarkomen

Die folgende Tabelle zeigt die durchschnittlichen Werte der Zellzahl der B- und T-Zellen. Signifikante Unterschiede zeigten sich weder bei der Zellzahl der B-Zellen, noch bei der Zellzahl der T-Zellen.

Zellmarker	1. Blutprobe (Zellzahl x 10 ³)	2. Blutprobe (Zellzahl x 10 ³)	3. Blutprobe (Zellzahl x 10 ³)	Signifikanz
CD3-/CD19+	9,0 (5,03+/-)	9,62 (5,24+/-)	8,61 (6,17+/-)	p(1/2) = 0,22 p(2/3) = 0,32 p(1/3) = 0,14
CD3+/ CD56-	73,22 (9,14 +/-)	71,08 (6,91+/-)	59,24 (11,65+/-)	p(1/2) = 0,42 p(2/3) = 0,11 p(1/3) = 0,07

Tabelle 28: Die Tabelle zeigt die Durchschnittswerte für die Zellzahl der ersten beiden Populationen und entspricht den B- und T-Zellen im zeitlichen Verlauf von der ersten präoperativen Blutentnahme bis zu den beiden postoperativen Blutabnahme der Liposarkome.

Zeitlicher Verlauf der Durchschnittswerte der Natürlichen Killerzellzahlen bei Liposarkomen

Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die zeitliche Entwicklung der einzelnen NK-Zellmarker.

Signifikante Unterschiede zeigten sich im Hinblick auf die Zellzahl nicht. Anders als die Zellzahlen der B- und T- Zellen kam es tendenziell bei den NK- Zellen zu einer Zunahme der Zellzahl im postoperativen Verlauf.

Zellmarker	1. Blutprobe (Zellzahl x 10 ³)	2. Blutprobe (Zellzahl x 10 ³)	3. Blutprobe (Zellzahl x 10 ³)	Signifikanz
CD3-/CD56+	9,61 (5,8+/-)	10,9 (10,87+/-)	14,79 (12,15+/-)	p(1/2) = 0,36 p(2/3) = 0,28 p(1/3) = 0,11
CD3- /NKG2D+	7,52 (4,81 +/-)	9,43 (5,88 +/-)	17,33 (12,4+/-)	p(1/2) = 0,18 p(2/3) = 0,29 p(1/3) = 0,07
CD3-/NKp30+	6,38 (4,12+/-)	6,68 (4,27+/-)	13,54 (10,58+/-)	p(1/2) = 0,25 p(2/3) = 0,32 p(1/3) = 0,11
CD3-/NKp46+	7,87 (4,57+/-)	7,81 (6,03+/-)	15,66 (12,49+/-)	p(1/2) = 0,25 p(2/3) = 0,3 p(1/3) = 0,09

Tabelle 29: Die Tabelle zeigt die Durchschnittswerte für die Zellzahl der einzelnen Populationen der NK- Zellen im zeitlichen Verlauf von der ersten präoperativen Blutentnahme bis zu den beiden postoperativen Blutabnahmen bei Liposarkomen.

3.3.4 Zeitlicher Verlauf der prozentualen Rezeptordichte beim Liposarkom für B-, T- und NK-Zellen

In Bezug auf die Rezeptordichte zeigte sich eine Abnahme der Rezeptorexpression der B-Zellen.

Die Aktivität der einzelnen T-Zelle zeigte einen signifikanten Einbruch in der zweiten Blutprobe (p= 0,05). In der dritten Untersuchung zeigte sich dann ein ähnlicher Wert wie in der ersten Blutprobe.

Die Zellen mit den Markern CD3-/NKG2D+, CD3-/NKp30+ und CD3/NKp46+ zeigten tendenziell postoperativ eine Zunahme der Rezeptorexpression. Sechs Monate postoperativ hat sich die durchschnittliche Rezeptorexpression bei diesen NK- Zellen im Vergleich zum Ausgangswert verdoppelt.

Der NK- Zellmarker CD3-/CD56+ zeigte keine Signifikanzen und keine Tendenz im zeitlichen Verlauf.

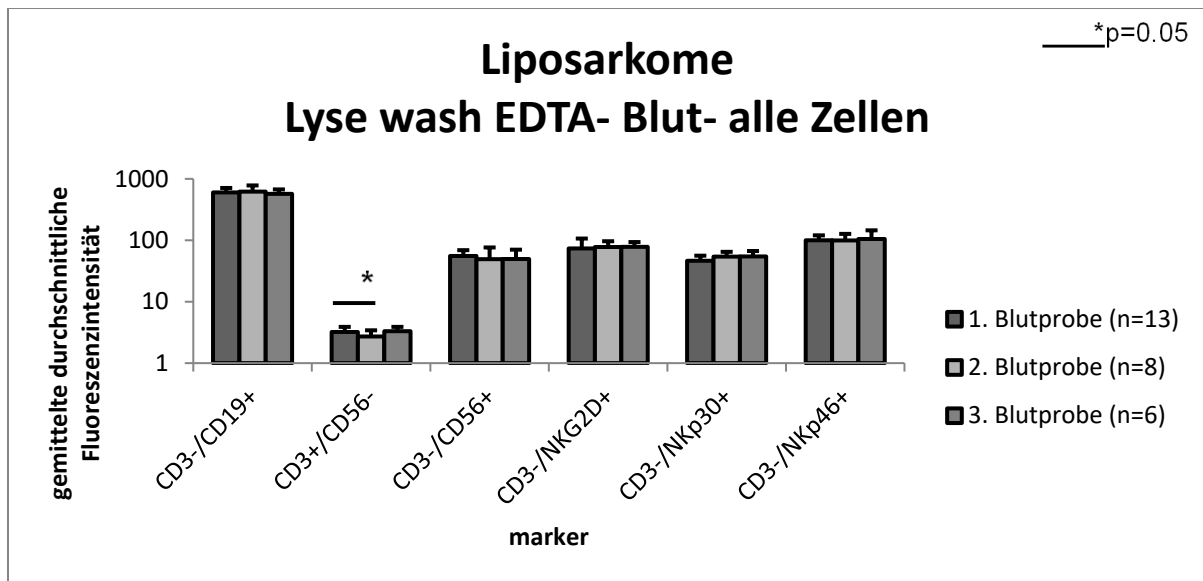


Abbildung 16: Mittlere Rezeptordichte (Mean fluorescence intensity, mfi) der Lymphozyten aus dem peripheren Blut bei Patienten mit Liposarkomen. Die Grafik zeigt die Mittelwerte mit Standardabweichungen für die Rezeptordichte der gemessenen Zellen in der Durchflusszytometrie für drei Blutproben. Die Balken zeigen die Mittelwerte der mittels Durchflusszytometrie gemessenen Zellen im zeitlichen Verlauf. Die Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen. Die gemittelte durchschnittliche Rezeptorexpression der CD3-/CD56+ Zellen zeigte in der ersten postoperativen Messung einen Rückgang (*p=0,05).

Zeitlicher Verlauf der Durchschnittswerte für die Rezeptordichte der B- Zellen (CD3-/ CD19+) und der T- Zellen (CD3+/CD56-) bei Liposarkomen

Die folgende Tabelle zeigt die durchschnittliche Rezeptorexpression der B- und T-Zellen im zeitlichen Verlauf.

Bei den T-Zellen kam es in der ersten postoperativen Blutprobe zu einem signifikanten Rückgang der Rezeptorexpression.

Zellmarker	1. Blutprobe (Zellzahl x 10 ³)	2. Blutprobe (Zellzahl x 10 ³)	3. Blutprobe (Zellzahl x 10 ³)	Signifikanz
CD3-/CD19+	600,77 (110,3+/-)	619,8 (161,97+/-)	536,21 (102,13+/-)	p(1/2) = 0,39 p(2/3) = 0,43 p(1/3) = 0,49
CD3+/ CD56-	3,23 (0,68 +/-)	2,72 (0,71+/-)	3,28 (0,62+/-)	p(1/2) = 0,07 p(2/3) = 0,05 p(1/3) = 0,37

Tabelle 30: Die Tabelle zeigt die Durchschnittswerte für die Rezeptorexpression der ersten beiden Populationen und entspricht den B- und T- Zellen im zeitlichen Verlauf von der ersten präoperativen Blutentnahme bis zu den beiden postoperativen Blutabnahmen der Liposarkome.

Zeitlicher Verlauf der Durchschnittswerte der Natürlichen Killerzellzahlen bei Liposarkomen

Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die zeitliche Entwicklung der einzelnen NK-Zellmarker.

Bei den NK-Zellen zeigten sich im Hinblick auf die Rezeptorexpression keine Signifikanzen. Tendenziell scheinen die NK-Zellen nach der Resektion eine Zunahme ihrer Rezeptorexpression entwickelt zu haben.

Zellmarker	1. Blutprobe (Zellzahl x 10 ³)	2. Blutprobe (Zellzahl x 10 ³)	3. Blutprobe (Zellzahl x 10 ³)	Signifikanz
CD3-/CD56+	55,46 (13,55+/-)	49,25 (27,19+/-)	49,51 (20,85+/-)	p(1/2) = 0,25 p(2/3) = 0,49 p(1/3) = 0,22
CD3-/NKG2D+	73,59 (33,15+/-)	77,63 (18,88+/-)	78,12 (15,42+/-)	p(1/2) = 0,4 p(2/3) = 0,49 p(1/3) = 0,37
CD3-/NKp30+	46,49 (9,68+/-)	54,34 (10,56+/-)	54,48 (12,47+/-)	p(1/2) = 0,07 p(2/3) = 0,49 p(1/3) = 0,07
CD3-/NKp46+	100,33 (20,09+/-)	99,58 (27,62+/-)	104,89 (40,45+/-)	p(1/2) = 0,48 p(2/3) = 0,39 p(1/3) = 0,37

Tabelle 31: Die Tabelle zeigt die Durchschnittswerte für die Rezeptorexpression der einzelnen Populationen der NK- Zellen im zeitlichen Verlauf von der ersten präoperativen Blutentnahme bis zu den beiden postoperativen Blutabnahmen bei Liposarkomen.

3.3.5 Zeitlicher Verlauf der prozentualen Zellzusammensetzung beim Liposarkom G1 für B-, T- und NK-Zellen (Abb.17, Abb.18, Tab. 32, Tab.33, Tab.34, Tab.35)

Das Patientenkollektiv der Liposarkome konnten in Bezug auf das Grading in zwei Gruppen eingeteilt werden. Eine Gruppe erhielt von der Pathologie das Grading G1 während die andere Gruppe der Patienten ein G3 hatten. Neun Patienten wurden mit G1 klassifiziert und vier mit G3. Ein Grading von G2 kam in der Gruppe der Liposarkome nicht vor.

Zeitlicher Verlauf der Durchschnittswerte für die B- Zellzahl (CD3-/ CD19+) und die T- Zellzahl (CD3+/CD56-) bei Liposarkomen G1

Die folgende Tabelle zeigt die durchschnittlichen Werte der Zellzahl der B- und T-Zellen. Signifikante Werte ließen sich für die Zellzahl der B- und T-Zellen nicht finden.

Tendenziell scheint die Zellzahl nach der Resektion des Liposarkoms G1 leicht rückläufig zu sein.

Die Zellzahl der NK-Zellen scheint tendenziell nach der Resektion des Liposarkoms G1 leicht zugenommen zu haben. Signifikante Unterschiede ließen sich auch hier keine finden.

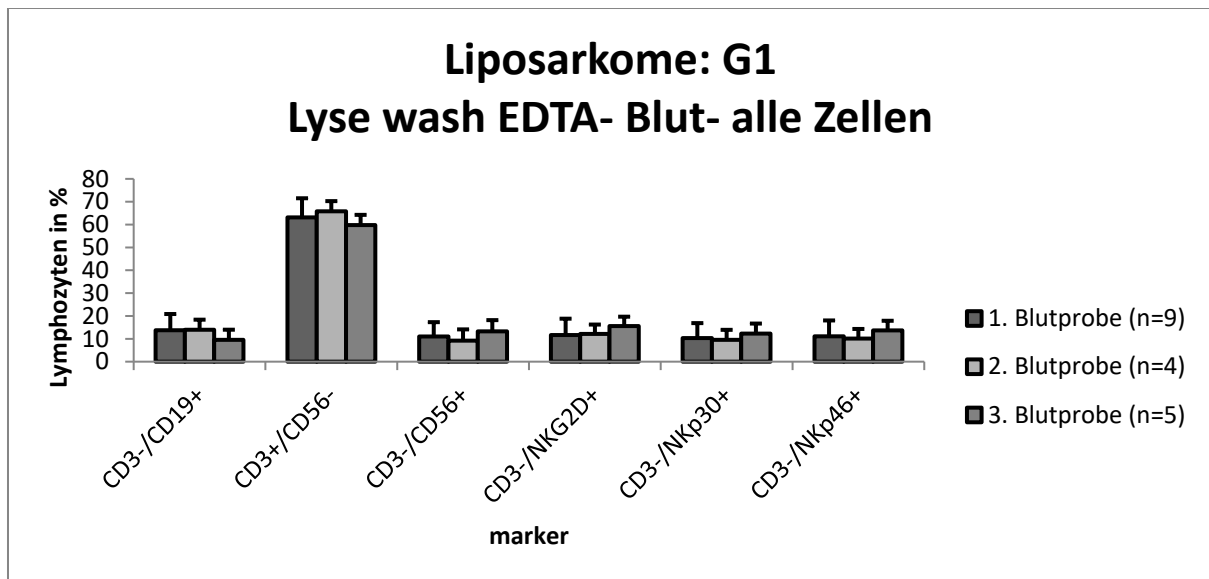


Abbildung 17: Prozentualer Anteil der Lymphozyten aus dem peripheren Blut bei Patienten mit Liposarkom G1. Die Grafik zeigt die Mittelwerte mit Standardabweichungen für die Zellzahl der gemessenen Zellen in der Durchflusszytometrie für drei Blutproben. Die Balken zeigen die Mittelwerte der mittels Durchflusszytometrie gemessenen Zellen im zeitlichen Verlauf. Die Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen.

Zeitlicher Verlauf der Durchschnittswerte für die B- Zellzahl (CD3-/CD19+) und die T-Zellzahl (CD3+/CD56-) bei Liposarkomen G1

Die folgende Tabelle zeigt die durchschnittlichen Werte der Zellzahl der B- und T-Zellen. Signifikante Unterschiede zeigten sich nicht. Tendenziell nahm die Zellzahl der B- und T-Zellen postoperativ ab.

Zellmarker (Zellzahl)	1. Blutprobe (Zellzahl x 10 ³)	2. Blutprobe (Zellzahl x 10 ³)	3. Blutprobe (Zellzahl x 10 ³)	Signifikanz
CD3-/CD19+	13,76 (7,08+/-)	13,95 (4,42+/-)	9,56 (6,59+/-)	p(1/2) = 0,49 p(2/3) = 0,15 p(1/3) = 0,15
CD3+ / CD56-	63,16 (8,36+/-)	65,81 (4,46+/-)	59,8 (12,49+/-)	p(1/2) = 0,29 p(2/3) = 0,19 p(1/3) = 0,27

Tabelle 32: Die Tabelle zeigt die Durchschnittswerte für die Zellzahl der ersten beiden Populationen und entspricht den B- und T- Zellen im zeitlichen Verlauf von der ersten präoperativen Blutentnahme bis zu den beiden postoperativen Blutabnahmen der Liposarkome G1.

Zeitlicher Verlauf der Durchschnittswerte der Natürlichen Killerzellzahlen bei Liposarkomen G1

Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die zeitliche Entwicklung der einzelnen NK-Zellmarker.

Die NK- Zellzahl zeigte tendenziell postoperativ eine Zunahme. Signifikante Unterschiede zeigten sich nicht.

Zellmarker	1. Blutprobe (Zellzahl x 10 ³)	2. Blutprobe (Zellzahl x 10 ³)	3. Blutprobe (Zellzahl x 10 ³)	Signifikanz
CD3-/CD56+	11,03 (6,26 +/-)	9,23 (4,9 +/-)	13,28 (13,19 +/-)	p(1/2) = 0,31 p(2/3) = 0,3 p(1/3) = 0,33
CD3-/NKG2D+	11,65 (7,16 +/-)	12,16 (4,09 +/-)	15,6 (13,14 +/-)	p(1/2) = 0,44 p(2/3) = 0,31 p(1/3) = 0,24
CD3-/NKp30+	10,3 (6,56 +/-)	9,55 (4,37 +/-)	12,3 (11,29 +/-)	p(1/2) = 0,41 p(2/3) = 0,34 p(1/3) = 0,34
CD3-/NKp46+	11,11 (6,93 +/-)	10,13 (4,19 +/-)	13,72 (13,46 +/-)	p(1/2) = 0,39 p(2/3) = 0,31 p(1/3) = 0,31

Tabelle 33: Die Tabelle zeigt die Durchschnittswerte für die Zellzahl der einzelnen Populationen der NK-Zellen im zeitlichen Verlauf von der ersten präoperativen Blutentnahme bis zu den beiden postoperativen Blutabnahmen bei Liposarkom G1.

3.3.6 Zeitlicher Verlauf der prozentualen Rezeptordichte beim Liposarkom G1 für B-, T- und NK-Zellen

Signifikante Unterschiede zeigten sich in Bezug auf die Rezeptorexpression weder bei den B- noch bei den T-Zellen.

Bei den NK-Zellen zeigte sich in Bezug auf die Rezeptorexpression keine signifikanten Unterschiede.

Tendenziell scheint es innerhalb der ersten drei postoperativen Monate zu einer leichten Zunahme der Rezeptorexpression gekommen zu sein. Im weiteren Verlauf war die Rezeptorexpression dann aber wieder rückläufig.

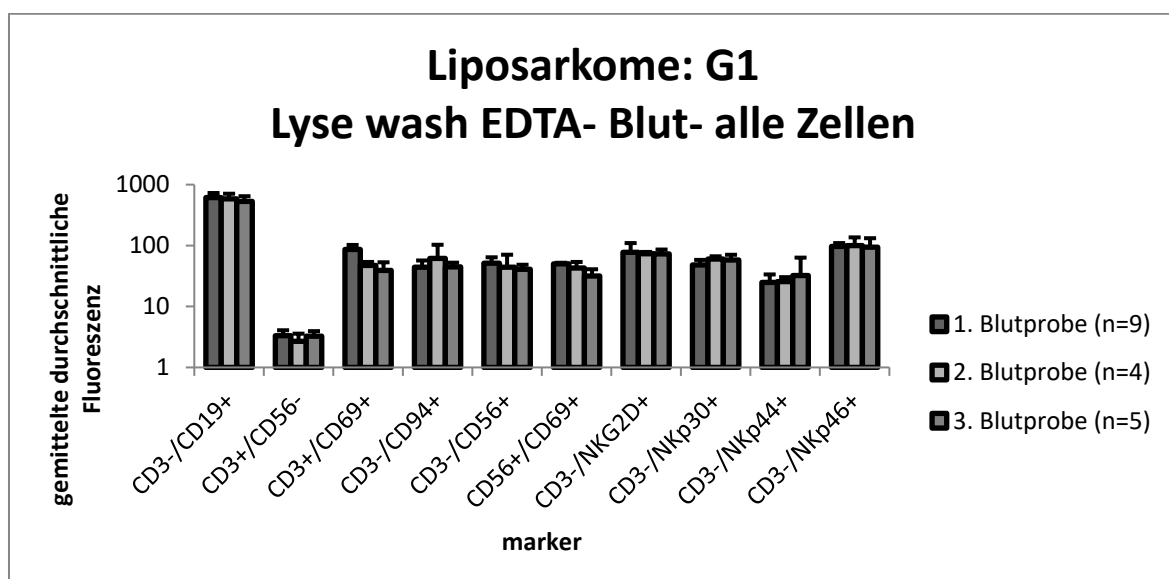


Abbildung 18: Mittleren Rezeptordichte (mean fluorescence intensity, mfi) der Lymphozyten aus dem peripheren Blut bei Patienten mit Liposarkomen G1. Die Grafik zeigt die Mittelwerte mit Standardabweichungen für die Rezeptordichte der gemessenen Zellen in der Durchflusszytometrie für drei Blutproben. Die Balken zeigen die Mittelwerte der mittels Durchflusszytometrie gemessenen Zellen im zeitlichen Verlauf. Die Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen. Signifikante Unterschiede zeigten sich hier nicht.

Zeitlicher Verlauf der Durchschnittswerte für die Rezeptordichte der B-Zellen (CD3-/ CD19+) und der T- Zellen (CD3+/CD56-) bei Liposarkomen G1

Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die Rezeptorexpression der B- und T-Zellen im zeitlichen Verlauf.

Die Rezeptorexpression B-Zellen scheint tendenziell nach der Resektion des Liposarkoms G1 abgenommen zu haben.

Die T- Zellen zeigten drei Monate postoperativen einen Rückgang der Rezeptorexpression. Sechs Monate postoperative nahm die Rezeptorexpression tendenziell wieder etwas zu, erreichte aber nicht den präoperativen Ausgangswert.

Zellmarker	1. Blutprobe (Zellzahl x 10 ³)	2. Blutprobe (Zellzahl x 10 ³)	3. Blutprobe (Zellzahl x 10 ³)	Signifikanz
CD3-/CD19+	613,32 (115,32 +/-)	585,4 (124,77+/-)	532,01 (113,61+/-)	p(1/2) = 0,36 p(2/3) = 0,27 p(1/3) = 0,12
CD3+/ CD56-	3,3 (0,76 +/-)	2,69 (0,9 +/-)	3,26 (0,69+/-)	p(1/2) = 0,11 p(2/3) = 0,16 p(1/3) = 0,46

Tabelle 34: Die Tabelle zeigt die Durchschnittswerte für die Rezeptorexpression der ersten beiden Populationen und entspricht den B- und T- Zellen im zeitlichen Verlauf von der ersten präoperativen Blutentnahme bis zu den beiden postoperativen Blutabnahmen der Liposarkome G1.

Zeitlicher Verlauf der Durchschnittswerte der Rezeptordichte der Natürlichen Killerzellen bei Liposarkome G1

Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die zeitliche Entwicklung der einzelnen NK-Zellmarker.

Die Rezeptorexpression der CD3-/NKp30+ Zellen zeigte im Vergleich der ersten Messung (präoperativ) zur zweiten Messung (drei Monate postoperativ) eine hoch signifikante Zunahme (p= 0,03).

Die CD3-/CD56+ NK- Zellen zeigten von der ersten zur dritten Messung eine Abnahme der Rezeptorexpression (p= 0,06).

Die Rezeptorexpression der CD3-/NKG2D+ Zellen und der CD3-/NKp46+ Zellen zeigten keine signifikanten Unterschiede. Diese beiden Zellmarker waren tendenziell postoperativ rückläufig.

Zellmarker	1. Blutprobe (Zellzahl x 10 ³)	2. Blutprobe (Zellzahl x 10 ³)	3. Blutprobe (Zellzahl x 10 ³)	Signifikanz
CD3-/CD56+	51,49 (12,65+/-)	44,26 (26,5+/-)	40,78 (7,66+/-)	p(1/2) = 0,25 p(2/3) = 0,39 p(1/3) = 0,06
CD3-/NKG2D+	77,27 (32,51+/-)	73,57 (4,99+/-)	72,74 (13,14+/-)	p(1/2) = 0,42 p(2/3) = 0,46 p(1/3) = 0,39
CD3-/NKp30+	48,13 (10,06+/-)	60,29 (6,38+/-)	57,95 (12,7+/-)	p(1/2) = 0,03 p(2/3) = 0,37 p(1/3) = 0,07
CD3-/NKp46+	96,93 (12,87+/-)	99,77 (36,58+/-)	93,91 (38,24+/-)	p(1/2) = 0,41 p(2/3) = 0,42 p(1/3) = 0,41

Tabelle 35: Die Tabelle zeigt die Durchschnittswerte für die gemittelte Rezeptordichte der ersten beiden Populationen und entspricht der Rezeptorexpression der NK-Zellen im zeitlichen Verlauf von der ersten präoperativen Blutentnahme bis zu den beiden postoperativen Blutabnahmen der Liposarkome G1.

3.3.7 Zeitlicher Verlauf der prozentualen Zellzusammensetzung beim Liposarkom G3 für B-, T- und NK-Zellen (Abb.19, Abb.20, Tab.36, Tab.37, Tab.38, Tab.39)

Die Zellzahl der B- und T-Zellen zeigte keine signifikanten Unterschiede.

Die B-Zellzahl nahm tendenziell innerhalb der ersten drei postoperativen Monate ab. Im weiteren postoperativen Verlauf zeigt die B-Zellzahl tendenziell wieder eine Zunahme.

Die T-Zellzahl nahm tendenziell postoperativ ab.

Die NK-Zellzahlen nahmen tendenziell postoperativ zu. Signifikante Unterschiede zeigten sich auch hier nicht.

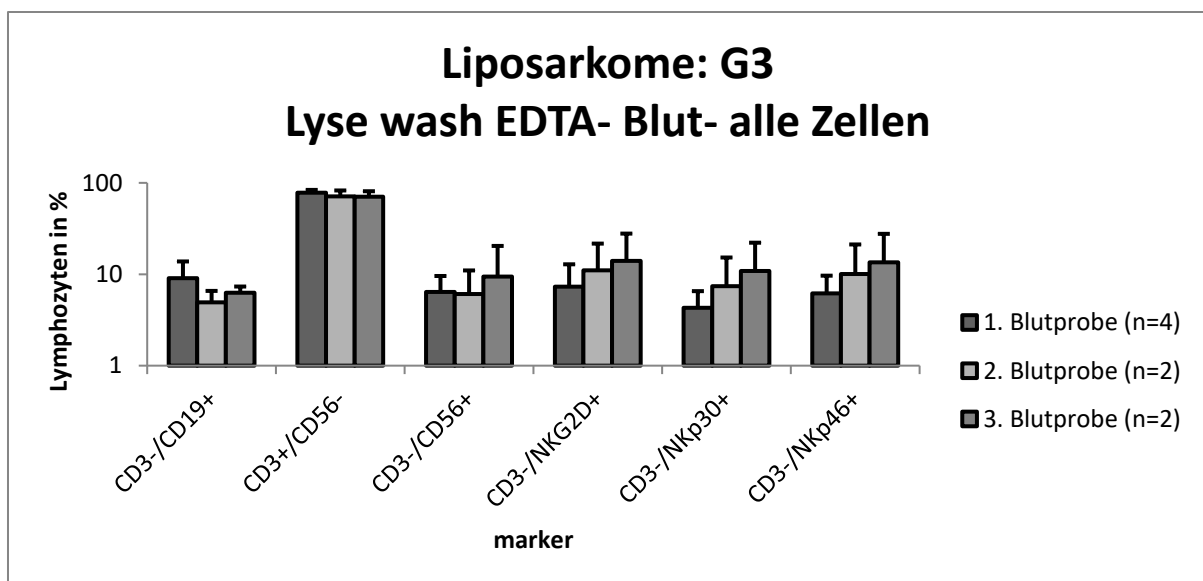


Abbildung 19: Prozentualer Anteil der Lymphozyten aus dem peripheren Blut bei Patienten mit Liposarkomen G3. Die Grafik zeigt die Mittelwerte mit Standardabweichungen für die Zellzahl der gemessenen Zellen in der Durchflusszytometrie für drei Blutproben. Die Balken zeigen die Mittelwerte der mittels Durchflusszytometrie gemessenen Zellen im zeitlichen Verlauf. Die Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen.

Zeitlicher Verlauf der Durchschnittswerte für die B- Zellzahl (CD3-/CD19+) und die T- Zellzahl (CD3+/CD56-) bei Liposarkomen G3

Die folgende Tabelle zeigt die durchschnittlichen Werte der Zellzahl der B- und T-Zellen. Signifikante Unterschiede zeigten sich in Bezug auf die Zellzahl weder bei den B- noch bei den T- Zellen. Die B- Zellen scheinen tendenziell, nach einem Rückgang der Zellzahl innerhalb der ersten drei postoperativen Monate, zu zunehmen.

Die T- Zellzahl scheint tendenziell postoperativ rückläufig zu sein.

Zellmarker	1. Blutprobe (Zellzahl x 10 ³)	2. Blutprobe (Zellzahl x 10 ³)	3. Blutprobe (Zellzahl x 10 ³)	Signifikanz
CD3-/CD19+	9,05 (4,75+/-)	4,92 (1,66 +/-)	6,28 (1,07+/-)	p(1/2) = 0,15 p(2/3) = 0,21 p(1/3) = 0,24
CD3+/ CD56-	78,18 (5,56+/-)	71,21 (1,66+/-)	70,67 (10,3 +/-)	p(1/2) = 0,18 p(2/3) = 0,48 p(1/3) = 0,14

Tabelle 36: Die Tabelle zeigt die Durchschnittswerte für die Zellzahl der ersten beiden Populationen und entspricht den B- und T- Zellen im zeitlichen Verlauf von der ersten präoperativen Blutentnahme bis zu den beiden postoperativen Blutabnahmen der Liposarkome G3.

Zeitlicher Verlauf der Durchschnittswerte der Natürlichen Killerzellzahlen bei Liposarkomen G3

Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die zeitliche Entwicklung der einzelnen NK-Zellmarker.

Signifikante Unterschiede zeigten sich in Bezug auf die NK-Zellzahl nicht. Tendenziell scheint es postoperativ bei den gemessenen NK- Zellmarkern tendenziell zu einer Zunahme gekommen zu sein.

Zellmarker	1. Blutprobe (Zellzahl x 10 ³)	2. Blutprobe (Zellzahl x 10 ³)	3. Blutprobe (Zellzahl x 10 ³)	Signifikanz
CD3-/CD56+	6,41 (4,95+/-)	6,07 (4,95+/-)	9,42 (10,99+/-)	p(1/2) = 0,46 p(2/3) = 0,37 p(1/3) = 0,31
CD3-/NKG2D+	7,32 (5,54+/-)	11,03 (10,63+/-)	14,03 (13,84+/-)	p(1/2) = 0,3 p(2/3) = 0,42 p(1/3) = 0,21
CD3-/NKp30+	4,3 (2,25+/-)	7,41 (7,85+/-)	10,87 (11,28+/-)	p(1/2) = 0,22 p(2/3) = 0,38 p(1/3) = 0,14
CD3-/NKp46+	6,19 (3,46+/-)	10,07 (11,13+/-)	13,48 (14,21+/-)	p(1/2) = 0,25 p(2/3) = 0,41 p(1/3) = 0,17

Tabelle 37: Die Tabelle zeigt die Durchschnittswerte für die Zellzahl der einzelnen Populationen der NK-Zellen im zeitlichen Verlauf von der ersten präoperativen Blutentnahme bis zu den beiden postoperativen Blutabnahmen bei Liposarkomen G3.

3.3.8 Zeitlicher Verlauf der prozentualen Rezeptordichte beim Liposarkom G3 für B-, T- und NK-Zelle

Bei den B- Zellen zeigte sich tendenziell eine Zunahme der Rezeptorexpression.

Die Rezeptorexpression der T-Zellen zeigte postoperativ eine deutliche Zunahme ($p= 0,02$).

Die NK- Zellen zeigten in Bezug auf die Rezeptordichte ein gegenteiliges Verhalten wie bei der Zellzahl.

Bis auf die CD3-/CD56+ Zellen nahm die Rezeptorexpression der anderen NK- Zellmarker postoperativ tendenziell zu.

Die tendenziell höchste Rezeptorexpression fand sich sechs Monate postoperativ.

Die CD3-/CD56+ Zellen nahmen innerhalb der ersten drei postoperativen Monate tendenziell minimal ab und stiegen im weiteren postoperativen Verlauf wieder an.

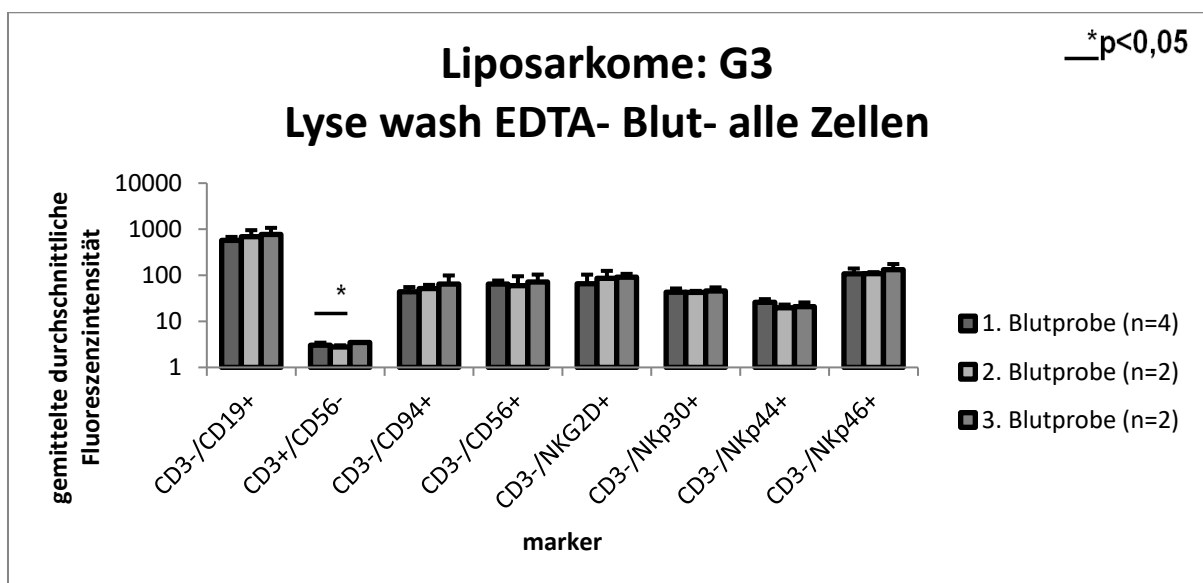


Abbildung 20: Mittlere Rezeptordichte (mean fluorescence intensity, mfi) der Lymphozyten aus dem peripheren Blut bei Patienten mit Liposarkomen G3. Die Grafik zeigt die Mittelwerte mit Standardabweichungen für die Rezeptordichte der gemessenen Zellen in der Durchflusszytometrie für drei Blutproben. Die Balken zeigen die Mittelwerte der mittels Durchflusszytometrie gemessenen Zellen im zeitlichen Verlauf. Die Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen. Signifikante Abnahme der gemittelten durchschnittlichen Rezeptorexpression der CD3+/CD56- Zellen ($p=0,02$).

Zeitlicher Verlauf der Durchschnittswerte für die Rezeptordichte der B-Zellen (CD3-/CD19+) und der T- Zellen (CD3+/CD56-) bei Liposarkomen G3

Die folgende Tabelle zeigt den zeitlichen Verlauf der durchschnittlichen Rezeptorexpression der B- und T-Zellen.

Die Rezeptorexpression der B-Zellen nahmen tendenziell postoperativ zu.

Die T-Zellen zeigten innerhalb der ersten drei Monate einen Rückgang der Rezeptorexpression. Im weiteren postoperativen Verlauf nahm die Rezeptorexpression der T-Zellen dann wieder signifikant zu ($p= 0,02$).

Zellmarker	1. Blutprobe (Zellzahl x 10 ³)	2. Blutprobe (Zellzahl x 10 ³)	3. Blutprobe (Zellzahl x 10 ³)	Signifikanz
CD3-/CD19+	572,57 (108,06+/-)	688,63 (265,06+/-)	769,47 (300,18+/-)	p(1/2) = 0,23 p(2/3) = 0,4 p(1/3) = 0,14
CD3+/ CD56-	3,03 (0,41+/-)	2,78 (0,24+/-)	3,49 (0,04+/-)	p(1/2) = 0,24 p(2/3) = 0,02 p(1/3) = 0,1

Tabelle 38: Die Tabelle zeigt die Durchschnittswerte für die Rezeptordichte der ersten beiden Populationen und entspricht den B- und T-Zellen im zeitlichen Verlauf von der ersten präoperativen Blutentnahme bis zu den beiden postoperativen Blutabnahmen der Liposarkome G3.

Zeitlicher Verlauf der Durchschnittswerte der Rezeptordichte der Natürlichen Killerzellen bei Liposarkomen G3

Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die zeitliche Entwicklung. Tendenziell nahm die Rezeptorexpression der NK- Zellen postoperativ zu.

Die CD3-/ CD56+ Zellen zeigten tendenziell innerhalb der ersten drei postoperativen Monate zunächst einen Rückgang der Rezeptorexpression. Im weiteren zeitlichen Verlauf nahm ihre Rezeptorexpression dann wie bei den anderen NK-Zellen zu. Signifikante Unterschiede zeigten sich keine.

Zellmarker (Rezeptordichte)	1. Blutprobe	2. Blutprobe	3. Blutprobe	Signifikanz
CD3-/CD56+	64,41 (12,4+/-)	59,24 (35,93+/-)	71,3 (32,28+/-)	p(1/2) = 0,39 p(2/3) = 0,38 p(1/3) = 0,35
CD3-/NKG2D+	65,32 (38,05+/-)	85,8 (38,83+/-)	91,09 (16,33+/-)	p(1/2) = 0,29 p(2/3) = 0,44 p(1/3) = 0,22
CD3-/NKp30+	42,79 (8,9+/-)	42,45 (3,41 +/-)	45,81 (8,79+/-)	p(1/2) = 0,48 p(2/3) = 0,33 p(1/3) = 0,36
CD3-/NKp46+	107,94 (32,54+/-)	108,36 (8,61+/-)	132,38 (42,99+/-)	p(1/2) = 0,5 p(2/3) = 0,26 p(1/3) = 0,24

Tabelle 39: Die Tabelle zeigt die Durchschnittswerte für die Rezeptordichte der einzelnen Populationen der NK-Zellen im zeitlichen Verlauf von der ersten präoperativen Blutentnahme bis zu den beiden postoperativen Blutabnahmen der Liposarkome G3.

3.3.9 Prozentuale Zellzusammensetzung beim Liposarkom Rezidiv für B-, T- und NK-Zellen präoperativ (Abb.21, Abb.22)

Bei vier Patienten zeigte sich im weiteren zeitlichen Verlauf ein Rezidiv. Leider konnte hier nur eine Aussage über die erste Blutprobe getroffen werden.

Die präoperative B- Zellzahl betrug 11,88 und die präoperative T- Zellzahl lag bei 69,44.

Die Zellzahlen der einzelnen NK- Zellmarker lagen präoperativ zwischen 6,88 und 10,95. Die präoperativen NK-Zellzahlen im Einzelnen: CD3/CD56- betrug 10,91 (2,92+/-). CD3-

/NKG2D+ ergab 10,95 (3,0+/-). CD3-/NKp30+ hatte eine Zellzahl von 6,88 (1,92+/-) und CD3-/NKp46+ zeigten eine gemittelte Zellzahl von 9,54 (1,86+/-).

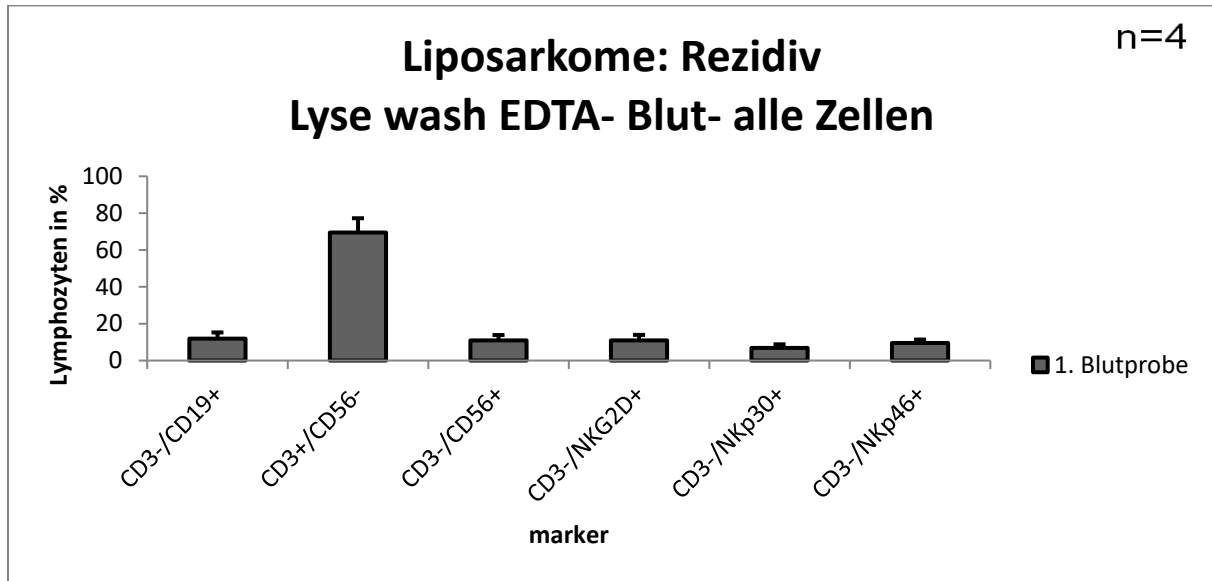


Abbildung 21: Prozentualer Anteil der Lymphozyten aus dem peripheren Blut bei Patienten mit einem Rezidiv eines Liposarkoms. Die Grafik zeigt die Mittelwerte mit Standardabweichungen für die Zellzahl der gemessenen Zellen in der Durchflusszytometrie für die präoperative Blutprobe. Die Balken zeigen die Mittelwerte der mittels Durchflusszytometrie gemessenen Zellen. Die Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen.

3.3.10 Zeitlicher Verlauf der prozentualen Rezeptordichte beim Liposarkom Rezidiv für B-, T- und NK-Zellen

Die durchschnittliche, präoperative Rezeptorexpression der B-Zellen lag bei 585,49 (82,01+/-) und die der T- Zellen bei 3,55 (0,98+/-).

Die präoperative Rezeptorexpression der NK- Zellen reichte von 42,39 bis 98,27. Die CD3-/CD56+Zellen zeigten präoperativ eine durchschnittliche Rezeptorexpression von 59,69 (13,82+/-). Die Rezeptorexpression der CD3-/NKG2D+ Zellen betrug präoperativ durchschnittlich 78,15 (33,4+/-). Die Rezeptorexpression der CD3-/NKp30+ Zellen betrug präoperativ durchschnittlich 42,39 (8,79+/-). Die CD3-/NKp46+ Zellen wiesen präoperativ eine Rezeptorexpression von 98,27 (17,61+/-) auf.

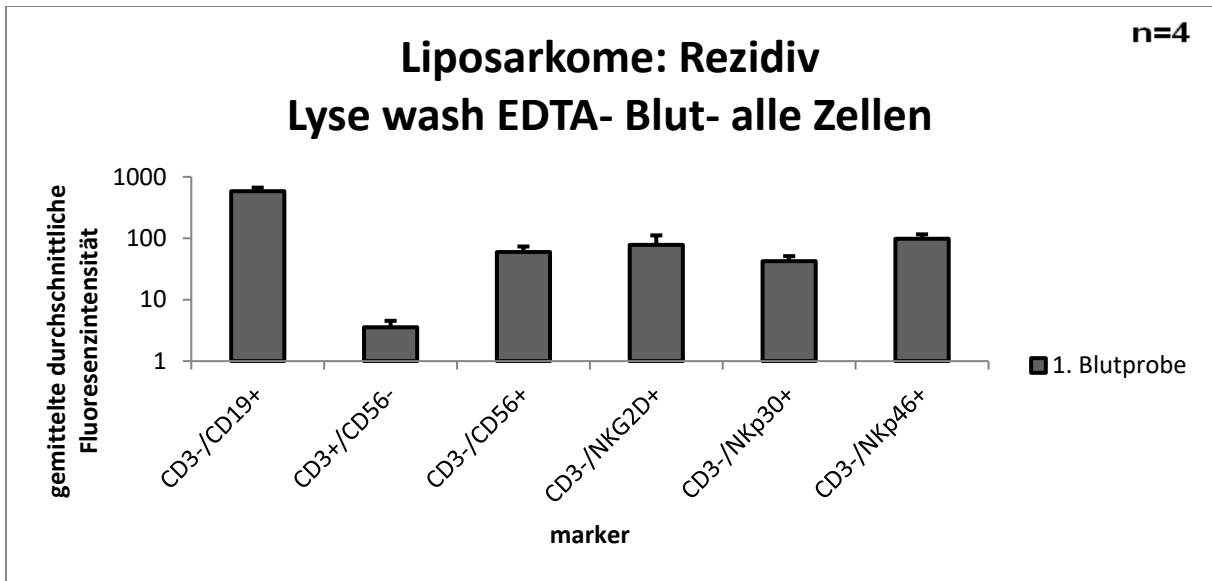


Abbildung 22: Mittlere Rezeptordichte (mean fluorescence intensity, mfi) der Lymphozyten aus dem peripheren Blut bei Patienten mit einem Rezidiv eines Liposarkoms. Die Grafik zeigt die Mittelwerte mit Standardabweichungen für die Rezeptorexpression der gemessenen Zellen in der Durchflusszytometrie für die präoperative Blutprobe. Die Balken zeigen die Mittelwerte der mittels Durchflusszytometrie gemessenen Zellen. Die Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen.

3.3.11 Liposarkome: Patientenkollektiv ohne Rezidiv (Abb.23, Abb.24, Tab. 40, Tab.41, Tab.42, Tab.43)

Das Patientenkollektiv der rezidiv-freien Studienteilnehmer bestand aus neun Patienten. Hier war es möglich über die zweite und dritte Blutprobe Auskünfte zu gewinnen, da die Compliance der Patienten sehr gut war und diese auch zu einer zweiten und dritten Blutprobe bereit waren. Signifikante Unterschiede zeigten sich bei der Zellzahl der B- und T-Zellen keine. Tendenziell nahm die B-Zellzahl postoperativ eher ab. Eine Tendenz ließ sich bei der T-Zellzahl nicht erkennen.

Die NK-Zellzahl nahm bei den gemessenen NK- Zellmarkern postoperativ tendenziell zu. Signifikante Unterschiede ließen sich nicht feststellen.

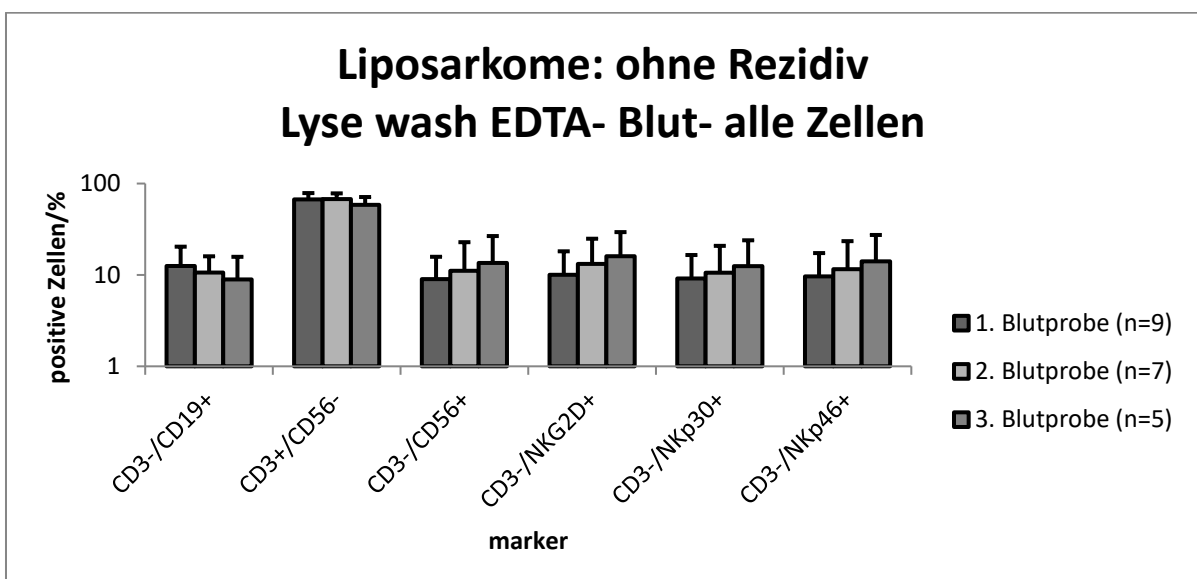


Abbildung 23: Prozentualer Anteil der Lymphozyten aus dem peripheren Blut bei Patienten mit Liposarkomen ohne ein Rezidiv. Die Grafik zeigt die Mittelwerte mit Standardabweichungen für die Zellzahl der gemessenen Zellen in der Durchflusszytometrie für drei Blutproben. Die Balken zeigen die Mittelwerte der mittels Durchflusszytometrie gemessenen Zellen im zeitlichen Verlauf. Die Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen.

Zeitlicher Verlauf der Durchschnittswerte für die B-Zellzahl (CD3-/CD19+) und die T-Zellzahl (CD3+/CD56-) bei Liposarkomen ohne Rezidiv

Die folgende Tabelle zeigt die durchschnittlichen Werte der Zellzahl der B- und T-Zellen. Die durchschnittliche B-Zellzahl nahm postoperativ ab. Bei der T-Zellzahl ließ sich keine Tendenz erkennen. Signifikante Unterschiede zeigten sich nicht.

Zellmarker	1. Blutprobe (Zellzahl x 10 ³)	2. Blutprobe (Zellzahl x 10 ³)	3. Blutprobe (Zellzahl x 10 ³)	Signifikanz
CD3-/CD19+	12,51 (7,87+/-)	10,63 (10,61+/-)	8,94 (6,85+/-)	p(1/2) = 0,3 p(2/3) = 0,33 p(1/3) = 0,21
CD3+/ CD56-	67,04 (11,62+/-)	67,49 (10,61+/-)	58,4 (12,82+/-)	p(1/2) = 0,46 p(2/3) = 0,11 p(1/3) = 0,12

Tabelle 40: Die Tabelle zeigt die Durchschnittswerte für die Zellzahl der ersten beiden Populationen und entspricht den B- und T-Zellen im zeitlichen Verlauf von der ersten präoperativen Blutentnahme bis zu den beiden postoperativen Blutabnahmen der Liposarkome ohne ein Rezidiv.

Zeitlicher Verlauf der Durchschnittswerte der Natürlichen Killerzellzahlen bei Liposarkomen ohne Rezidiv

Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die zeitliche Entwicklung der einzelnen NK-Zellmarker.

Signifikante Werte fanden sich bei keinem der untersuchten NK-Zellmarker.

Tendenziell zeigten alle gemessenen NK-Zellmarker eine Zunahme ihrer Zellzahl im postoperativen Verlauf.

Zellmarker	1. Blutprobe (Zellzahl x 10 ³)	2. Blutprobe (Zellzahl x 10 ³)	3. Blutprobe (Zellzahl x 10 ³)	Signifikanz
CD3-/CD56+	9,01 (6,78+/-)	11,09 (11,73+/-)	13,5 (13,13+/-)	p(1/2) = 0,34 p(2/3) = 0,37 p(1/3) = 0,21
CD3-/NKG2D+	10,04 (8,12+/-)	13,21 (11,68+/-)	16,03 (13,4+/-)	p(1/2) = 0,26 p(2/3) = 0,36 p(1/3) = 0,15
CD3-/NKp30+	9,16 (7,36+/-)	10,57 (10,25+/-)	12,48 (11,45+/-)	p(1/2) = 0,38 p(2/3) = 0,39 p(1/3) = 0,26
CD3-/NKp46+	9,63 (7,71+/-)	11,53 (11,89+/-)	14,1 (13,28+/-)	p(1/2) = 0,35 p(2/3) = 0,36 p(1/3) = 0,22

Tabelle 41: Die Tabelle zeigt die Durchschnittswerte für die Zellzahl der einzelnen Populationen der NK-Zellen im zeitlichen Verlauf von der ersten präoperativen Blutentnahme bis zu den beiden postoperativen Blutabnahmen bei Liposarkomen ohne ein Rezidiv.

3.3.12 Zeitlicher Verlauf der prozentualen Rezeptordichte beim Liposarkom ohne Rezidiv für B-, T- und NK-Zellen

Signifikante Unterschiede fanden sich bei der durchschnittlichen Rezeptorexpression der einzelnen Lymphozyten nicht.

Tendenziell nahm die Rezeptordichte der B-Zellen postoperativ ab.

Bei den T-Zellen kam es in den ersten drei postoperativen Monaten zunächst tendenziell zu einer Abnahme der Rezeptorexpression. Im weiteren zeitlichen Ablauf nahm die Rezeptorexpression der T-Zellen wieder etwas zu.

Die Rezeptordichte der Zellen mit den Markern CD3-/NKG2D+ und CD3-/NKp46+ nahmen tendenziell in den ersten postoperativen Monaten ab und im weiteren postoperativen Verlauf wieder zu.

Die Rezeptordichte der CD3-/CD56+ Zellen nahmen tendenziell postoperativ stetig ab.

Die Rezeptordichte der CD3-/NKp30+ Zellen nahm in der ersten postoperativen Blutprobe zu ($p=0,07$). Im Vergleich der ersten, präoperativen Messung zur letzten postoperativen Messung kam es zu einer Zunahme der Rezeptordichte dieser Zellen ($p= 0,07$).

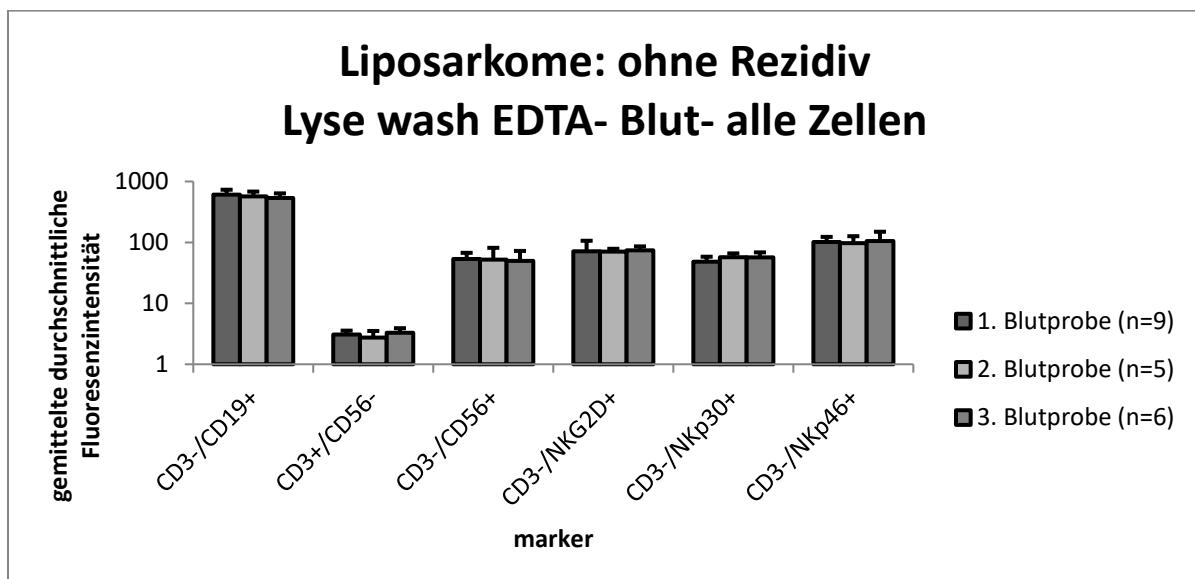


Abbildung 24: Mittlere Rezeptordichte (mean fluorescence intensity, mfi) der Lymphozyten aus dem peripheren Blut bei Patienten mit Liposarkomen ohne ein Rezidiv. Die Grafik zeigt die Mittelwerte mit Standardabweichungen für die Rezeptordichte der gemessenen Zellen in der Durchflusszytometrie für drei Blutproben. Die Balken zeigen die Mittelwerte der mittels Durchflusszytometrie gemessenen Zellen im zeitlichen Verlauf. Die Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen.

Zeitlicher Verlauf der Durchschnittswerte für die Rezeptordichte der B-Zellen (CD3-/CD19+) und der T-Zellen (CD3+/CD56-) bei Liposarkomen ohne Rezidiv

Signifikante Unterschiede zeigten sich nicht. Tendenziell nahm die Rezeptordichte der B-Zellen postoperativ ab.

Die T-Zellen zeigten in Bezug auf ihre Rezeptordichte keine Tendenz.

Zellmarker	1. Blutprobe (Zellzahl x 10 ³)	2. Blutprobe (Zellzahl x 10 ³)	3. Blutprobe (Zellzahl x 10 ³)	Signifikanz
CD3-/CD19+	607,58 (124,74+/-)	568,56 (114,43+/-)	536,21 (102,13+/-)	p(1/2) = 0,28 p(2/3) = 0,31 p(1/3) = 0,13
CD3+/ CD56-	3,07 (0,49+/-)	2,74 (0,79+/-)	3,28 (0,62+/-)	p(1/2) = 0,17 p(2/3) = 0,11 p(1/3) = 0,24

Tabelle 42: Die Tabelle zeigt die Durchschnittswerte für die Rezeptordichte der ersten beiden Populationen und entspricht den B- und T- Zellen im zeitlichen Verlauf von der ersten präoperativen Blutentnahme bis zu den beiden postoperativen Blutabnahmen der Liposarkome ohne ein Rezidiv.

Zeitlicher Verlauf der Durchschnittswerte der Rezeptordichte der Natürlichen Killerzellen bei Liposarkomen ohne Rezidiv

Die Rezeptordichte der CD3-/NKp30+ Zellen nahm in der ersten postoperativen Blutprobe zu ($p=0,07$). Im Vergleich der ersten, präoperativen Messung zur letzten postoperativen Messung kam es zu einer Zunahme der Rezeptordichte dieser Zellen ($p=0,07$).

Die Rezeptordichte der CD3-/CD56+ Zellen nahm postoperativ stetig ab.

Die Rezeptordichte der CD3-/NKG2D+ und der CD3-/NKp46+Zellen nahm in der ersten postoperativen Messung tendenziell ab und stieg im weiteren postoperativen Verlauf wieder. Signifikante Unterschiede zeigten sich jedoch nicht.

Zellmarker	1. Blutprobe (Zellzahl x 10 ³)	2. Blutprobe (Zellzahl x 10 ³)	3. Blutprobe (Zellzahl x 10 ³)	Signifikanz
CD3-/CD56+	53,59 (13,82+/-)	52,33 (29,2+/-)	49,67 (22,83+/-)	p(1/2) = 0,46 p(2/3) = 0,44 p(1/3) = 0,34
CD3-/NKG2D+	71,57 (34,87+/-)	70,52 (8,07+/-)	74,04 (12,07+/-)	p(1/2) = 0,47 p(2/3) = 0,29 p(1/3) = 0,43
CD3-/NKp30+	48,3 (9,97+/-)	57,2 (8,83+/-)	56,95 (11,62+/-)	p(1/2) = 0,07 p(2/3) = 0,49 p(1/3) = 0,07
CD3-/NKp46+	101,23 (22,04+/-)	97,09 (29,4+/-)	105,39 (44,28+/-)	p(1/2) = 0,38 p(2/3) = 0,35 p(1/3) = 0,41

Tabelle 43: Die Tabelle zeigt die Durchschnittswerte für die Rezeptordichte der einzelnen Populationen der NK-Zellen im zeitlichen Verlauf von der ersten präoperativen Blutentnahme bis zu den beiden postoperativen Blutabnahmen der Liposarkome ohne ein Rezidiv.

3.4 Lipome (Abb.25, Abb.26)

Patientenkollektiv

Bei 8 Patienten mit solitären oder multiplen Lipomen wurde vor der Resektion Blut in EDTA-Röhrchen abgenommen. Die erste Blutabnahme erfolgte kurz vor der eigentlichen Resektion, meist im Operationssaal. Auf weitere Blutabnahmen wurde verzichtet.

Alter der Patienten

Der jüngste Patient dieser Studie war 32 Jahre alt und der älteste Patient war 76 Jahre alt. Gemittelt hatte diese Patientengruppe ein durchschnittliches Alter von 40 Jahren.

Grundsätzlich betreffen Lipome jede Altersgruppe wobei es einen Gipfel zwischen dem 40.-60. Lebensjahr gibt. Diese Tendenz zeigte sich auch bei dem Patientenkollektiv in dieser Studie.

Geschlechterverteilung

4 Patientinnen und 4 Patienten nahmen an dieser Studie teil. Generell treten multiple Lipome 3-mal häufiger bei Männern auf, als bei Frauen und 5-8% aller Lipome treten in größerer Anzahl auf. Ein Patient aus dieser Studie hatte mehrere Lipome.

3.4.1 Prozentuale Zellzusammensetzung beim Lipom für B-, T-, und NK-Zellen

Die Zellzahl der B-Zellen betrug bei den Lipomen präoperativ 10,92 (5,24+/-). Im Vergleich zu den Liposarkomen ist die B- Zellzahl bei den Lipomen tendenziell höher. Die T-Zellzahl lag bei den Lipomen durchschnittlich bei 67,09 (11,9+/-).

Die T-Zellzahl ist im Vergleich zu den Liposarkomen bei den Lipomen präoperativ etwas geringer.

Die CD3-/CD56+ Zellen der Lipome hatten eine durchschnittliche Zellzahl von 11,23 (8,37+/-).

Die Zellzahl der CD3-/NKG2D+ Zellen betrug 12,69 (9,47+/-). Die CD3-/NKp30+ Zellen wiesen eine durchschnittliche Zellzahl von 9,62 (6,67+/-) auf und die Zellzahl der CD3-/NKp46+ Zellen bei den Lipomen betrug 11,3 (7,68+/-).

Vergleicht man die NK- Zellzahlen der Lipome mit denen der Liposarkome so fällt auf, dass die Zellzahlen bei den Lipomen tendenziell höher ist.

Die Zellzahlen der Lipome ähneln denen der Liposarkome. Tendenziell ist die Zellzahl bei den Lipomen etwas höher als bei den Liposarkomen.

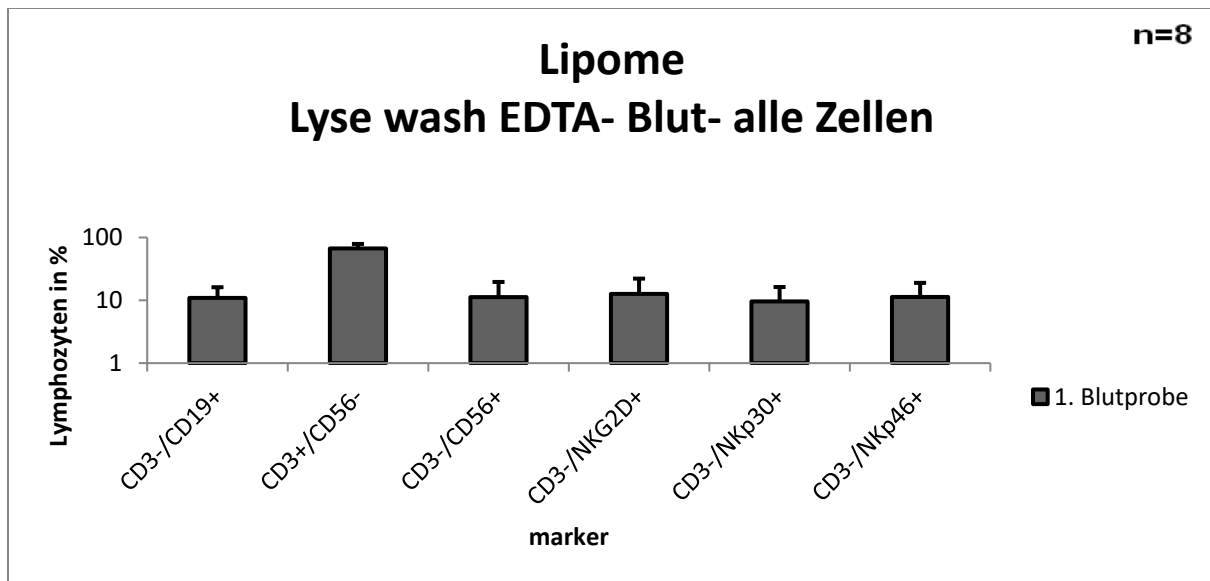


Abbildung 25: Prozentualer Anteil der Lymphozyten aus dem peripheren Blut bei Patienten mit Lipomen. Die Grafik zeigt die Mittelwerte mit Standardabweichungen für die Zellzahl der gemessenen Zellen in der Durchflusszytometrie für die Blutprobe. Die Balken zeigen die Mittelwerte der mittels Durchflusszytometrie gemessenen Zellen. Die Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen.

3.4.2 Beschreibung der Rezeptorexpression bei Lipomen für B-, T- und NK-Zellen

In der präoperativen Untersuchung wurde die prozentuale Rezeptordichte bei Lipomen analysiert.

Die Rezeptordichte bei den B- und T-Zellen verhält sich bei den Lipomen ähnlich wie die Zellzahl. Die Rezeptorexpression ist bei den B- Zellen tendenziell erhöht und die der T-Zellen tendenziell erniedrigt. Die Rezeptorexpression der B-Zellen betrug bei den Lipomen durchschnittlich 784,83 (162,06+/-). Die Rezeptorexpression der T-Zellen lag bei den Lipomen bei 3,42 (0,42+/-).

Die Rezeptorexpression der NK-Zellmarker ist bei den Lipomen tendenziell höher als bei den Liposarkomen.

Die Rezeptordichte der CD3-/CD56+ Zellen ist bei den Lipomen mit 57,76 (19,38+/-) tendenziell minimal höher als bei den Liposarkomen.

Die Rezeptorexpression der NK- Zellmarker CD3-/NKG2D+ ist 80,63, (19,75+/-) und CD3-/NKp30+ 59,56 (23,07+/-). Sie ist bei den Lipomen tendenziell um das höher.

Der NK- Zellmarker CD3-/ NKp46+ zeigte tendenziell ebenfalls eine höhere Rezeptordichte bei den den Lipomen als bei den Liposarkomen. Die durchschnittliche Rezeptorexpression der CD3-/NKp46+ Zellen lag bei den Lipomen bei 127,24 (36,41+/-) und bei den Liposarkomen bei 100,33 (20,09+/-).

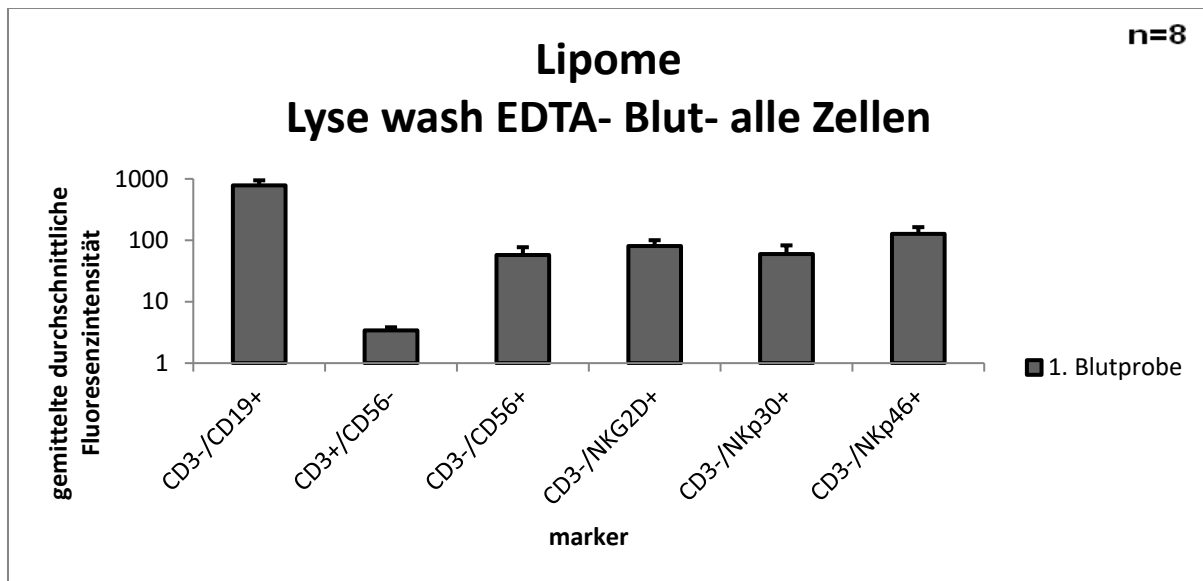


Abbildung 26: Mittlere Rezeptordichte (mean fluorescence intensity, mfi) der Lymphozyten aus dem peripheren Blut bei Patienten mit Lipomen. Die Grafik zeigt die Mittelwerte mit Standardabweichungen für die Rezeptordichte der gemessenen Zellen in der Durchflusszytometrie für die Blutprobe. Die Balken zeigen die Mittelwerte der mittels Durchflusszytometrie gemessenen Zellen. Die Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen.

3.5 Chondrosarkome

Das Patientenkollektiv

Zu Beginn der Studie wurde bei 17 Patienten mit einem Chondrosarkom Blut abgenommen, unmittelbar bevor der Tumor reseziert wurde. Bei der zweiten Blutabnahme, ca. drei Monate postoperativ konnte das Blut von 12 Patienten untersucht werden. Sechs Monate postoperativ konnte auf das Blut von sechs der ursprünglich 17 Patienten zurückgegriffen werden. Dieser Zeitpunkt entspricht der dritten Blutabnahme. Nach über einem Jahr postoperativ war es möglich bei sieben Patienten des ursprünglichen Kollektivs Blut zu gewinnen.

Die Schwankungen erklären sich durch den Tod von zwei Patienten, desweiteren auch durch fehlende Compliance. Der größte Teil der Patienten, die an dieser Studie teilnahm, lebt im süddeutschen Raum bzw. bundesweit und so kam es auch zu logistischen Problemen der Verschickung der Blutproben bzw. der Einbestellung der Patienten. Nicht mehr verwertbare Blutproben wurden hier ausgeklammert.

Therapieverfahren

Ein Patient dieser Studie von dem alle vier Blutproben untersucht werden konnten, unterzog sich zum Zeitpunkt der vierten Blutabnahme einer palliativen Bestrahlung. Rezidive zeigten sich bei einem Patienten mit Chondrosarkom.

Alter der Patienten

Der jüngste Patient dieser Studie war 26 Jahre alt und die älteste Patientin war 82 Jahre alt. Gemittelt hatte diese Patientengruppe ein durchschnittliches Alter von 54 Jahren. Mit 26

Jahren bereits an einem Chondrosarkom zu erkranken ist ungewöhnlich. Der Altersgipfel für das Chondrosarkom liegt ab dem fünften Lebensjahrzehnt. Gehäuft tritt es in der sechsten und siebten Lebensdekade auf (Schaser et al.,2009).

Geschlechterverteilung

In der Studie hatten neun Männer ein Chondrosarkom und acht Frauen. Diese Verteilung entspricht den Angaben in der Literatur, wonach Männer etwas häufiger vom Chondrosarkom betroffen sind.

3.5.1 Zusammenfassung der Ergebnisse Chondrosarkome

Zellzahl und Rezeptorexpression der Patienten mit einem Chondrosarkom im zeitlichen Verlauf

Die B-Zellzahl nahm im zeitlichen Ablauf im Vergleich der ersten (präoperativen) zur vierten (postoperativen) Blutprobe signifikant ab ($p=0,05$). Betrachtet man dazu die Rezeptorexpression zeigt sich jedoch eine Aktivitätszunahme der einzelnen B-Zelle für die Messung. Die Rezeptordichte der B-Zellen zeigte im Vergleich der dritten postoperativen zur vierten postoperativen Blutprobe eine signifikante Zunahme von ($p=0,006$).

Signifikante Unterschiede ließen sich bei der T-Zellzahl und deren Rezeptorexpression keine finden.

Tendenziell nahm die NK-Zellzahl im zeitlichen Ablauf zu. Eine deutliche Zunahme zeigte sich bei den CD3-/NKG2D+ Zellen und bei den CD3-/NKp46+ Zellen im Vergleich der ersten (präoperativen) zur vierten (postoperativen) Blutprobe ($p= 0,04$).

Tendenziell nahm die Rezeptorexpression der NK-Zellen postoperativ zu.

Tendenziell nahm die Rezeptorexpression bei den CD3-/NKp46+ Zellen postoperativ am deutlichsten zu. Signifikante Unterschiede zeigten sich nicht.

Zellzahl und Rezeptorexpression der Chondrosarkome G1 und der Chondrosarkome G2 im Vergleich

Tendenziell nahm die B-Zellzahl der Chondrosarkome G1 im zeitlichen Ablauf ab. Signifikante Unterschiede zeigten sich hier nicht. Die Rezeptorexpression der B-Zellen der Chondrosarkome G1 nahm im weiteren zeitlichen Ablauf zu. Im Vergleich der ersten zur vierten Blutprobe nahm die Rezeptorexpression der B-Zellen deutlich zu ($p= 0,002$).

Die T-Zellzahl zeigte in den Messungen prä- und postoperative keine Tendenzen. Die Rezeptorexpression der T- Zellen der Chondrosarkome G1 zeigte unmittelbar postoperativ einen deutlichen Rückgang ($p=0,04$). Im weiteren zeitlichen Ablauf nahm die Rezeptorexpression tendenziell zunächst zu und in der vierten Messung wieder ab.

Eine signifikante Zunahme der Zellzahl der Chondrosarkome G1 zeigten die CD3-/CD56+ Zellen im Vergleich der ersten zur vierten Blutprobe ($p=0,05$).

Die CD3-/NKp46+ Zellen der Chondrosarkome G1 zeigten ebenfalls im Vergleich der ersten zur vierten Blutprobe eine deutlich Zunahme ihrer Zellzahl ($p=0,01$).

Tendenziell läßt sich über die Zellzahl der anderen gemessenen NK- Zellmarker der Chondrosarkome G1 sagen, dass diese im zeitlich Ablauf ebenfalls zunahmen. Signifikante Unterschiede zeigten sich jedoch nicht. Ebenfalls zeigten sich in Bezug auf die

Rezeptorexpression der NK-Zellen der Chondrosarkome G1 keine signifikanten Unterschiede.

Die Patienten mit einem Chondrosarkom G2 zeigten weder für die B- noch für die T-Zellen signifikante Unterschiede in Bezug auf die Zellzahl. Die B-Zellzahl der Chondrosarkome G2 war im Vergleich zur B-Zellzahl der Chondrosarkome G1 erniedrigt.

Ebenfalls zeigte sich bei den Chondrosarkomen G2 im Vergleich zu den Chondrosarkomen G1 eine erniedrigte T-Zellzahl. Tendenziell nahm die Zellzahl der T-Zellen bei den Chondrosarkomen G2 postoperativ im zeitlichen Ablauf wieder etwas zu.

In Bezug auf die Zellzahl der gemessenen NK-Zellen zeigten sich bei den Chondrosarkomen G2 ebenfalls keine signifikanten Unterschiede. Im Vergleich der NK-Zellzahl der Chondrosarkome G1 und G2 zeigten sich keine relevanten Unterschiede. Postoperativ zeigten sich tendenziell erniedrigte NK-Zellzahlen bei den Chondrosarkomen G2 im Vergleich zu denen der Chondrosarkome G1. Tendenziell nahm die NK-Zellzahl postoperativ bei den Chondrosarkomen G2 im zeitlichen Ablauf zu.

Die Rezeptordichte zeigte bei den B-Zellen der Chondrosarkome G2 im zeitlichen Ablauf eine Zunahme. Im Vergleich der dritten zur vierten Blutprobe nahm die Rezeptorexpression der B-Zellen deutlich zu ($p=0,01$). Auch im Vergleich der ersten zur vierten Blutprobe zeigte sich eine deutliche Zunahme der Rezeptorexpression bei den B-Zellen ($p=0,01$). Nach Resektion des Chondrosarkoms G2 kommt es zu einer Zunahme der Aktivität der einzelnen B-Zelle. Im Vergleich zur Rezeptorexpression der B-Zellen der Chondrosarkome G1 zeigt sich bei den Chondrosarkomen G2 in der 4. Messung eine deutlich erhöhte Aktivität der einzelnen B-Zelle.

Die Rezeptorexpression der T-Zellen zeigte im Vergleich der Chondrosarkome G1 und G2 nahezu ähnliche Werte.

Eine signifikante Zunahme der Rezeptorexpression zeigten die CD3-/CD56+ Zellen der Chondrosarkome G2 im Vergleich der ersten zur zweiten Blutprobe ($p= 0,04$).

Interessant ist, dass präoperativ die gemessenen NK-Zellmarker der Chondrosarkome G2 im Vergleich zu denen der Chondrosarkome G1 eine erhöhte Aktivität aufweisen. Postoperativ zeigen im späteren Verlauf dann bei den Chondrosarkomen G2 erhöhte Werte in Bezug auf die Aktivität der einzelnen NK-Zellen.

Zellzahl und Rezeptorexpression der Chondrosarkome G1 und der Chondrosarkome G3 im Vergleich

Leider konnte bei den beiden Patienten mit einem Chondrosarkom G3 nur eine Blutprobe zum präoperativen Zeitpunkt gewonnen werden. Die präoperativen Zellzahlen der B-Zellen zeigen für beide Gradings ähnliche Werte. Die präoperativen Zellzahlen der T-Zellen waren mit 34,0 bei den Chondrosarkomen geringer als bei den Chondrosarkomen G1 (62,34). Die Rezeptorexpression zeigte für die B-Zellen der Chondrosarkome G3 gering erniedrigte Werte und für die T-Zellen der Chondrosarkome leicht erhöhte Werte im Vergleich zu denen der Chondrosarkome G1.

Die NK-Zellzahl der Chondrosarkome G3 war im Vergleich zu denen der Chondrosarkome G1 deutlich erhöht. Betrachtet man hierzu jedoch die Aktivität der einzelnen NK-Zellen zeigte sich eine verminderte Aktivität der einzelnen NK-Zellen für die Chondrosarkome G3.

Eine zunehmende Dedifferenzierung der einzelnen NK-Zellen scheint hier teilweise zu einer Zunahme der Zellzahl geführt zu haben, nicht jedoch auch zu einer Aktivitätszunahme der einzelnen NK-Zellen.

Zellzahl und Rezeptorexpression der Chondrosarkome G2 und der Chondrosarkome G3 im Vergleich

Die B-Zellzahl der Chondrosarkome G2 ist präoperativ im Vergleich zu derer der Chondrosarkome G3 erniedrigt. Nicht jedoch die Aktivität der einzelnen B-Zelle. Diese ist, bei den Chondrosarkomen G2 im Vergleich erhöht.

Die T-Zellzahl der Chondrosarkome G2 ist im Vergleich zu derer der Chondrosarkome G3 erhöht. Die Rezeptorexpression ist minimal bei den Chondrosarkomen G2 erniedrigt.

In Bezug auf die NK-Zellzahl zeigt sich ein ähnliches Bild wie auch schon bei den Chondrosarkomen G1. Die NK-Zellzahl der Chondrosarkome G3 ist im Vergleich zur NK-Zellzahl G2 deutlich höher. Die Aktivität der einzelnen NK-Zelle ist jedoch bei den Chondrosarkomen G3 im Vergleich zu der der Chondrosarkome G2 erniedrigt.

Vergleich der Chondrosarkome mit den Enchondromen

Die B- Zellzahl ähnelt der der Chondrosarkome zum präoperativen Zeitpunkt. Die Zellzahl der gemessenen NK- Zellen bei Patienten mit einem Enchondrom ähnelt der Zellzahl der Patienten mit einem Chondrosarkom zum präoperativen Zeitpunkt.

Die durchschnittliche Rezeptorexpression der B- und T- Zellen zeigte ähnliche Werte wie die der Chondrosarkome in der präoperativen Messung.

Die durchschnittliche Rezeptorexpression der NK-Zellen zeigte verglichen mit der präoperativ gemessenen Rezeptorexpression der Chondrosarkome ähnlich Werte.

Vergleicht man die B Zellzahlen der Enchondrome fällt auf; dass diese im Vergleich zu den präoperativen B- Zellzahlen der Chondrosarkome G1 und G3 geringer sind. Erst nach Resektion des Chondrosarkoms kommt es zu einer Abnahme und somit zu einer Annäherung der B Zellzahl der Chondrosarkome G1 an die der Enchondrome. Bei den Chondrosarkomen G3 (n=2) liegen leider keine Verlaufsproben vor.

Interessant ist im Vergleich der B-Zellzahl hierzu deren Aktivität. Die Rezeptorexpression der B-Zellen der Enchondrome ist verglichen mit der Aktivität der Chondrosarkome G1 und G3 präoperativ geringer. Vermutlich kommt es durch das Sarkom im Verlauf zu einer Suppression der Aktivität der B-Zelle, die diese noch durch eine vermehrte Zellzahl zu kompensieren versucht. Dies wird besonders bei den Chondrosarkomen G1 deutlich. Nach der Resektion finden sich deutlich erhöhte Aktivitätszunahmen der B-Zellen, die weit über der Rezeptorexpression der B-Zellen beim Enchondrom liegen. Eine Ausnahme bilden hier die Chondrosarkome G3. Sie zeigen im Vergleich zu den Enchondromen präoperativ höhere Zellzahlen, jedoch verglichen mit der Aktivität der einzelnen B- Zellen präoperativ eine deutliche Suppression. Leider war es bei den Chondrosarkomen G3 nur möglich eine präoperative Blutprobe zu bekommen.

Die T- Zellzahl war bei den Enchondromen etwas höher als bei den Chondrosarkomen. Eine vermehrte Rezeptorexpression der T-Zellen zeigten jedoch die Chondrosarkome. Hier fiel auf, dass die Chondrosarkome mit einem G3 eine erhöhte Aktivität der einzelnen T-Zelle aufwiesen, als bei den Chondrosarkomen mit einem niedrigeren Grading.

Die Zellzahl der NK-Zellen bei den Chondrosarkomen G1 und G2 war im Vergleich zu denen der Enchondrome geringer und zeigte im postoperativen Verlauf eine Zunahme. Wie schon die Anzahl der NK-Zellen war bei den Chondrosarkomen G3, wie auch schon deren B- Zellzahl präoperativ, d.h. unter dem Sarkom erhöht.

Auffällig ist die Rezeptorexpression der NK-Zellen bei den Chondrosarkomen im Vergleich zu den Enchondromen. Die Aktivität ist bei den Chondrosarkomen G1 ist außer bei den CD3-/CD56+ Zellen, nahezu durchweg geringer als bei den Enchondromen. Wobei die Unterschiede nicht sehr groß sind. Die Chondrosarkome G2 weisen im Vergleich zu den Enchondromen eine deutlich erhöhte Aktivität unter dem Sarkom für alle gemessenen NK-Zellen auf.

Anders verhält sich dazu das Chondrosarkom G3. Bereits vor der Resektion des Sarkoms sind die NK-Zellen im Vergleich zu denen der Enchondrome deutlich supprimiert.

Die Zellen versuchen dem malignen Geschehen zunächst mit einer Zunahme ihrer Zellzahl entgegen zu wirken und teilweise auch mit einer vermehrten Rezeptorexpression. Mit zunehmender Entartung der einzelnen Zellen kommt es jedoch zu einem Rückgang der Zellzahl und auch einem Rezeptorrückgang der einzelnen Zelle.

3.5.2 Zeitlicher Verlauf der prozentualen Zellzusammensetzung beim Chondrosarkom für B-, T- und NK-Zellen (Abb. 27, Abb.28, Tab.44, Tab.45, Tab.46, Tab.47)

Die B-Zellzahl nahm postoperativ im Vergleich zum präoperativen Zustand signifikant ab ($p=0,05$).

Signifikante Unterschiede zeigten sich bei der T-Zellzahl nicht.

Die Zellzahlen der NK-Zellmarker nahmen tendenziell nach der Resektion des Chondrosarkoms zu.

Die CD3-/NKG2D+ Zellen und die CD3-/NKp46+ zeigten im prä- zum postoperativen Vergleich deutliche Zunahmen ihrer Zellzahl ($p=0,04$).

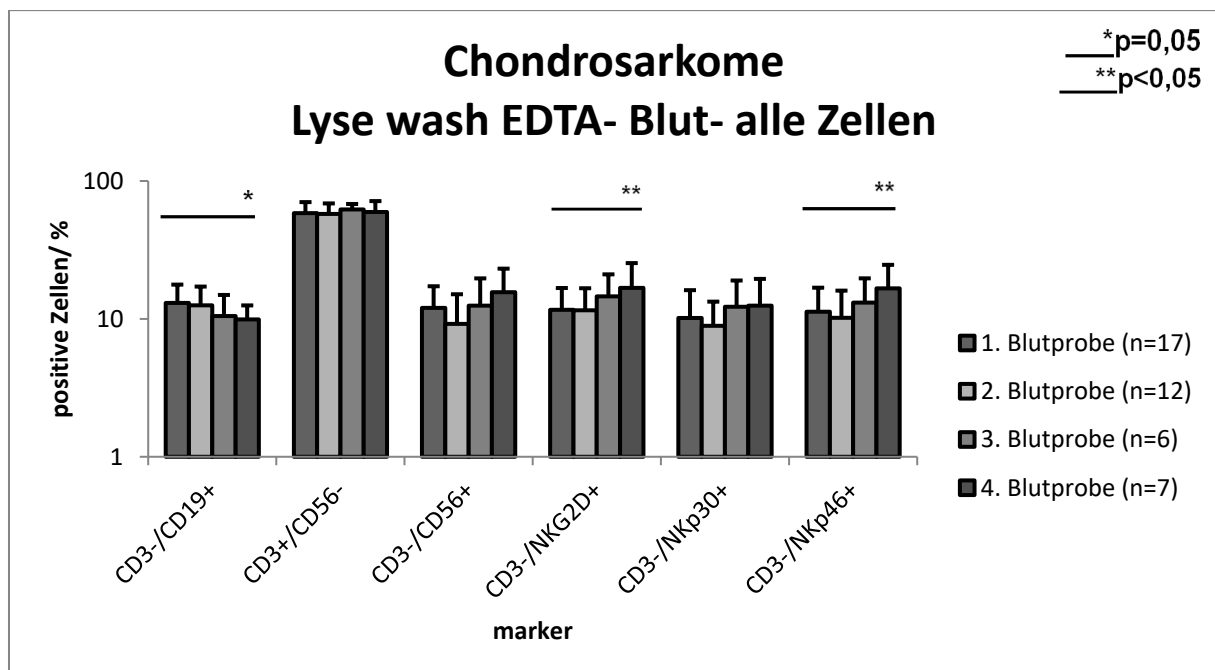


Abbildung 27: Prozentualer Anteil der Lymphozyten aus dem peripheren Blut bei Patienten mit Chondrosarkomen. Die Grafik zeigt die Mittelwerte mit Standardabweichungen für die Zellzahl der gemessenen Zellen in der Durchflusszytometrie für vier Blutproben. Die Balken zeigen die Mittelwerte der mittels Durchflusszytometrie gemessenen Zellen im zeitlichen Verlauf. Die Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen. Signifikante Abnahme der CD3-/CD19+ Zellen von der ersten zur vierten Blutprobe ($p=0,05$). Signifikante Zunahme der CD3-/NKG2D+ und der CD3-/NKp46+ Zellen von der ersten zur vierten Messung ($p<0,05$).

Zeitlicher Verlauf der Durchschnittswerte für die B-Zellzahl (CD3-/CD19+) und die T-Zellzahl (CD3+/CD56-) bei Chondrosarkomen

Die folgende Tabelle zeigt die durchschnittlichen Werte der Zellzahl der B- und T-Zellen. Die B-Zellzahl nahm im zeitlichen Ablauf im Vergleich der ersten (präoperativen) zur vierten (postoperativen) Blutprobe signifikant ab ($p=0,05$). Signifikante Unterschiede ließen sich bei der T-Zellzahl keine finden.

Zellmarker	1. Blutprobe (Zellzahl x 10 ³)	2. Blutprobe (Zellzahl x 10 ³)	3. Blutprobe (Zellzahl x 10 ³)	4. Blutprobe (Zellzahl x 10 ³)	Signifikanz
CD3-/CD19+	13,08 (4,65+/-)	12,55 (4,62+/-)	10,48 (4,44+/-)	9,91 (2,62+/-)	p(1/2) = 0,39 p(2/3) = 0,18 p(3/4) = 0,38 p(1/4) = 0,05
CD3+/CD56-	58,42 (11,9+/-)	57,78 (11,0+/-)	62,26 (6,0+/-)	59,53 (11,98+/-)	p(1/2) = 0,45 p(2/3) = 0,18 p(3/4) = 0,32 p(1/4) = 0,42

Tabelle 44: Die Tabelle zeigt die Durchschnittswerte für die Zellzahl der ersten beiden Populationen und entspricht den B- und T-Zellen im zeitlichen Verlauf von der ersten präoperativen Blutentnahme bis zu den postoperativen Blutabnahmen der Chondrosarkome.

Zeitlicher Verlauf der Durchschnittswerte der Natürlichen Killerzellzahlen bei Chondrosarkomen

Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die zeitliche Entwicklung der einzelnen NK-Zellmarker. Tendenziell nahm die NK-Zellzahl im zeitlichen Ablauf zu. Eine deutliche Zunahme zeigte sich bei den CD3-/NKG2D+ Zellen und bei den CD3-/NKp46+ Zellen im Vergleich der ersten (präoperativen) zur vierten (postoperativen) Blutprobe ($p=0,04$).

Zellmarker	1. Blutprobe (Zellzahl x 10 ³)	2. Blutprobe (Zellzahl x 10 ³)	3. Blutprobe (Zellzahl x 10 ³)	4. Blutprobe (Zellzahl x 10 ³)	Signifikanz
CD3-/CD56+	12,02 (5,24+/-)	9,2 (5,89+/-)	12,48 (7,18+/-)	15,61 (7,53+/-)	p(1/2) = 0,09 p(2/3) = 0,14 p(3/4) = 0,22 p(1/4) = 0,09
CD3- /NKG2D+	11,65 (5,09+/-)	11,54 (5,15+/-)	14,57 (6,47+/-)	16,79 (8,59+/-)	p(1/2) = 0,48 p(2/3) = 0,15 p(3/4) = 0,31 p(1/4) = 0,04
CD3- /NKp30+	10,16 (6,0+/-)	8,91 (4,43+/-)	12,26 (6,73+/-)	12,49 (7,01+/-)	p(1/2) = 0,27 p(2/3) = 0,11 p(3/4) = 0,48 p(1/4) = 0,21
CD3- /NKp46+	11,26 (5,58+/-)	10,17 (5,86+/-)	13,11 (6,56+/-)	16,67 (8,01+/-)	p(1/2) = 0,31 p(2/3) = 0,17 p(3/4) = 0,2 p(1/4) = 0,04

Tabelle 45: Die Tabelle zeigt die Durchschnittswerte für die Zellzahl der einzelnen Populationen der NK- Zellen im zeitlichen Verlauf von der ersten präoperativen Blutentnahme bis zu den postoperativen Blutabnahmen bei Chondrosarkomen.

3.5.3 Zeitlicher Verlauf der prozentualen Rezeptordichte bei Chondrosarkomen für B-, T- und NK-Zellen

Im zeitlichen Ablauf kam es postoperativ zu einer vermehrten Rezeptorexpression auf den B-Zellen.

Die Rezeptordichte der B-Zellen zeigte im Vergleich der dritten postoperativen zur vierten postoperativen Blutprobe eine signifikante Zunahme von ($p= 0,006$).

Die Rezeptorexpression der T-Zellen ergab keine signifikanten Unterschiede.

Die Zellen mit den Markern CD3-/NKG2D+, CD3-/NKp30+ und CD3-/NKp46+ zeigten in der zweiten Blutprobe tendenziell eine Zunahme ihrer Rezeptorexpression.

Bei den CD3-/NKp46+ Zellen nahm die Rezeptorexpression tendenziell im zeitlichen Ablauf zu.

Signifikante Unterschiede zeigten sich hier nicht.

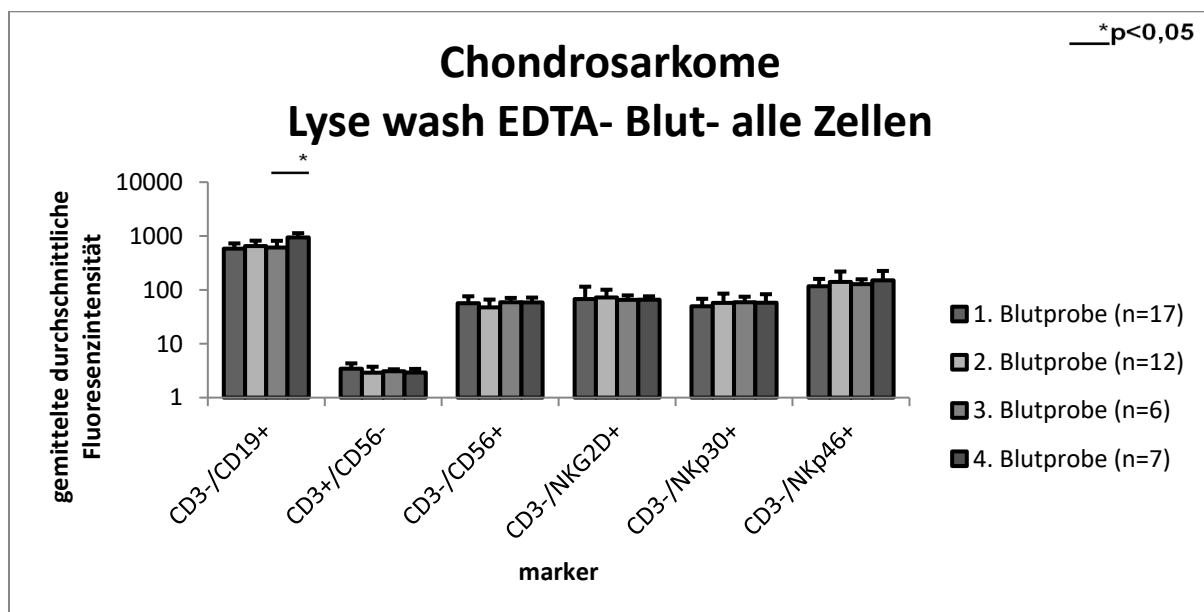


Abbildung 28: Mittlere Rezeptordichte (mean fluorescence intensity) der Lymphozyten aus dem peripheren Blut bei Patienten mit Chondrosarkomen. Die Grafik zeigt die Mittelwerte mit Standardabweichungen für die Zellzahl der gemessenen Zellen in der Durchflusszytometrie für vier Blutproben. Die Balken zeigen die Mittelwerte der mittels Durchflusszytometrie gemessenen Zellen im zeitlichen Verlauf. Die Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen. Signifikanz $*p<0,05$.

Zeitlicher Verlauf der Durchschnittswerte für die Rezeptordichte der B-Zellen (CD3-/CD19+) und der T- Zellen (CD3+/CD56-) bei Chondrosarkomen

Die Rezeptordichte der B-Zellen zeigte im Vergleich der dritten postoperativen zur vierten postoperativen Blutprobe eine sign. Zunahme ($p= 0,006$).

Im zeitlichen Ablauf kam es postoperativ zu einer vermehrten Rezeptorexpression auf den B-Zellen.

Zellmarker	1. Blutprobe (Zellzahl x 10 ³)	2. Blutprobe (Zellzahl x 10 ³)	3. Blutprobe (Zellzahl x 10 ³)	4. Blutprobe (Zellzahl x 10 ³)	Signifikanz
CD3-/CD19+	584,93 (145,5+/-)	649,35 (171,75+/-)	614,51 (200,61+/-)	939,44 (190,63+/-)	p(1/2) = 0,14 p(2/3) = 0,36 p(3/4) = 0,006 p(1/4) = 2,88
CD3+/CD56-	3,45 (0,87+/-)	2,91 (0,85+/-)	3,1 (0,27+/-)	2,93 (0,48+/-)	p(1/2) = 0,06 p(2/3) = 0,31 p(3/4) = 0,24 p(1/4) = 0,08

Tabelle 46: Die Tabelle zeigt die Durchschnittswerte für die Rezeptordichte der ersten beiden Populationen und entspricht den B- und T- Zellen im zeitlichen Verlauf von der ersten präoperativen Blutentnahme bis zu den postoperativen Blutabnahmen der Chondrosarkome.

Zeitlicher Verlauf der Durchschnittswerte der Rezeptordichte der Natürlichen Killerzellen bei Chondrosarkomen

Signifikante Unterschiede in Bezug auf die Rezeptorexpression zeigten sich bei den NK-Zellen nicht. Tendenziell nahm die Rezeptorexpression der NK-Zellen postoperativ zu. Tendenziell nahm die Rezeptorexpression bei den CD3-/NKp46+ Zellen postoperativ am meisten zu.

Zellmarker	1. Blutprobe (Zellzahl x 10 ³)	2. Blutprobe (Zellzahl x 10 ³)	3. Blutprobe (Zellzahl x 10 ³)	4. Blutprobe (Zellzahl x 10 ³)	Signifikanz
CD3-/CD56+	56,91 (19,92+/-)	43,91 (15,64+/-)	61,17 (12,07+/-)	59,81 (14,36+/-)	p(1/2) = 0,1 p(2/3) = 0,1 p(3/4) = 0,4 p(1/4) = 0,1
CD3- /NKG2D+	67,53 (47,23+/-)	72,42 (28,44+/-)	65,27 (13,86+/-)	65,85 (10,19+/-)	p(1/2) = 0,38 p(2/3) = 0,28 p(3/4) = 0,47 p(1/4) = 0,46
CD3-/NKp30+	49,63 (18,8+/-)	57,37 (28,04+/-)	58,84 (15,95+/-)	57,98 (25,16+/-)	p(1/2) = 0,19 p(2/3) = 0,45 p(3/4) = 0,47 p(1/4) = 0,19
CD3-/NKp46+	116,98 (43,11+/-)	140,45 (79,07+/-)	128,24 (29,26+/-)	150,44 (74,52+/-)	p(1/2) = 0,15 p(2/3) = 0,37 p(3/4) = 0,25 p(1/4) = 0,08

Tabelle 47: Die Tabelle zeigt die Durchschnittswerte für die Rezeptordichte der einzelnen Populationen der NK- Zellen im zeitlichen Verlauf von der ersten präoperativen Blutentnahme bis zu den postoperativen Blutabnahmen der Chondrosarkome.

3.5.4 Unterscheidung der Chondrosarkome nach dem Grading

Von den 17 Patienten mit Chondrosarkomen hatten 10 Patienten ein Grading G1. Ein Grading G2 ließ sich bei drei Patienten feststellen. Mit ein Grading G3 fand sich bei zwei Patienten und ein Grading G4 ließ sich ebenfalls bei einem Patienten finden. Bei einem Patienten konnte trotz des Referenzpathologen keine eindeutige Einordnung des Gradings

erfolgen. Dieser Patient ist in der folgenden Darstellung nicht berücksichtigt. Die Einteilung der Patienten nach dem Grading erfolgte anhand der Pathologiebefunde.

3.5.5 Zeitlicher Verlauf der prozentualen Zellzusammensetzung beim Chondrosarkom G1 für B-, T- und NK-Zellen (Abb. 29, Abb.30, Tab.48, Tab.49, Tab.50, Tab.51)

Signifikante Unterschiede in Bezug auf die Zellzahl ließen sich bei den B- und T-Zellen nicht finden.

Bei den NK-Zellen zeigte sich eine signifikante Zunahme der Zellzahl im Vergleich der ersten zur vierten Blutprobe bei den CD3-/CD56+ Zellen ($p=0,05$).

Die CD3-/NKp46+ Zellen zeigten im Vergleich der ersten zur vierten Blutprobe eine deutliche Zunahme der Zellzahl ($p=0,01$).

Die übrigen NK-Zellmarker zeigten tendenziell ebenfalls im zeitlichen Ablauf eine Zunahme ihrer Zellzahl. Signifikante Unterschiede ließen sich jedoch nicht nachweisen.

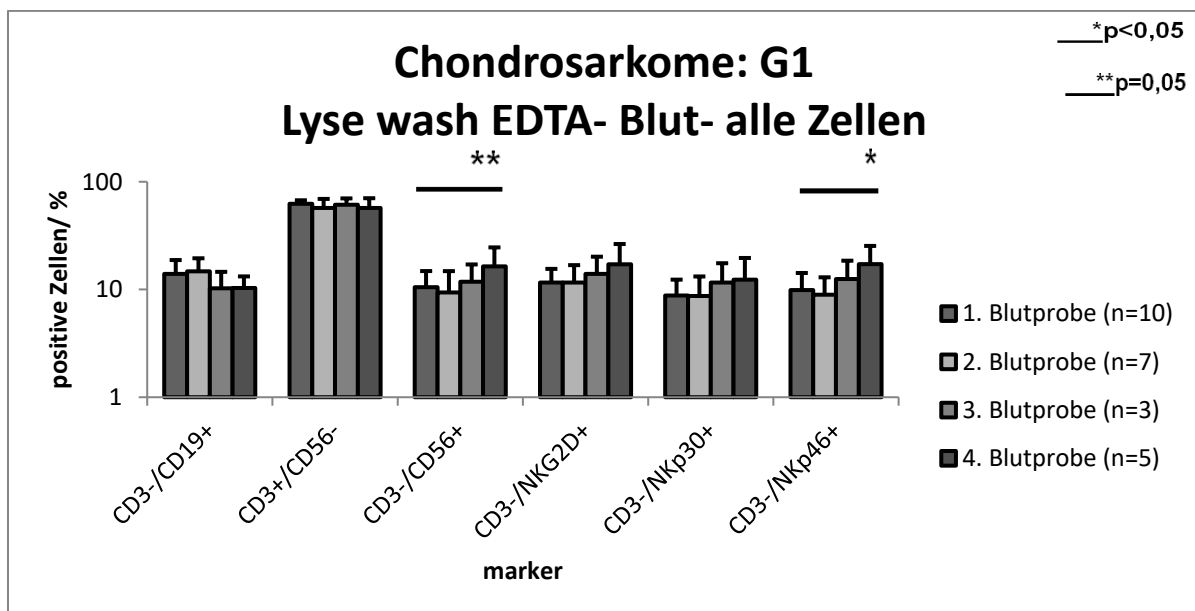


Abbildung 29: Prozentualer Anteil der Lymphozyten aus dem peripheren Blut bei Patienten mit Chondrosarkomen G1. Die Grafik zeigt die Mittelwerte mit Standardabweichungen für die Zellzahl der gemessenen Zellen in der Durchflusszytometrie für vier Blutproben. Die Balken zeigen die Mittelwerte der mittels Durchflusszytometrie gemessenen Zellen im zeitlichen Verlauf. Die Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen. Signifikanz $*p<0,05$, $**p=0,05$.

Zeitlicher Verlauf der Durchschnittswerte für die B- Zellzahl (CD3-/CD19+) und die T-Zellzahl (CD3+/CD56-) bei Chondrosarkomen G1

Die folgende Tabelle zeigt die durchschnittlichen Werte der Zellzahl der B- und T-Zellen. Signifikante Unterschiede zeigten sich in Bezug auf die Zellzahl bei den B- und T-Zellen nicht.

Tendenziell nahm die B-Zellzahl im zeitlichen Ablauf ab.

Zellmarker	1. Blutprobe (Zellzahl x 10 ³)	2. Blutprobe (Zellzahl x 10 ³)	3. Blutprobe (Zellzahl x 10 ³)	4. Blutprobe (Zellzahl x 10 ³)	Signifikanz
CD3-/CD19+	13,95 (4,81+/-)	14,76 (4,73+/-)	10,26 (4,32+/-)	10,33 (2,99+/-)	p(1/2) = 0,36 p(2/3) = 0,09 p(3/4) = 0,49 p(1/4) = 0,07
CD3+/CD56-	62,34 (4,87+/-)	57,15 (12,18+/-)	61,23 (8,85+/-)	57,17 (13,18+/-)	p(1/2) = 0,12 p(2/3) = 0,31 p(3/4) = 0,32 p(1/4) = 0,14

Tabelle 48: Die Tabelle zeigt die Durchschnittswerte für die Zellzahl der ersten beiden Populationen und entspricht den B- und T- Zellen im zeitlichen Verlauf von der ersten präoperativen Blutentnahme bis zu den postoperativen Blutabnahmen der Chondrosarkome G1.

Zeitlicher Verlauf der Durchschnittswerte der Natürlichen Killerzellzahlen bei Chondrosarkomen G1

Eine signifikante Zunahme der Zellzahl zeigten die CD3-/CD56+ Zellen im Vergleich der ersten zur vierten Blutprobe (p= 0,05).

Die CD3-/NKp46+ Zellen zeigten ebenfalls im Vergleich der ersten zur vierten Blutprobe eine deutliche Zunahme ihrer Zellzahl (p= 0,01).

Tendenziell lässt sich über die Zellzahl der anderen gemessenen NK- Zellmarker sagen, dass diese im zeitlichen Ablauf ebenfalls zunahm. Signifikante Unterschiede zeigten sich jedoch nicht.

Zellmarker	1. Blutprobe (Zellzahl x 10 ³ /µl)	2. Blutprobe (Zellzahl x 10 ³ /µl)	3. Blutprobe (Zellzahl x 10 ³ /µl)	4. Blutprobe (Zellzahl x 10 ³ /µl)	Signifikanz
CD3-/CD56+	10,53 (4,3+/-)	9,39 (5,43+/-)	11,81 (5,28+/-)	16,4 (8,19+/-)	p(1/2) = 0,32 p(2/3) = 0,27 p(3/4) = 0,22 p(1/4) = 0,05
CD3- /NKG2D+	11,6 (3,93+/-)	11,61 (5,22+/-)	13,96 (6,22+/-)	17,11 (9,32+/-)	p(1/2) = 0,5 p(2/3) = 0,27 p(3/4) = 0,32 p(1/4) = 0,07
CD3-/NKp30+	8,8 (3,55+/-)	8,7 (4,52+/-)	11,59 (5,94+/-)	12,33 (7,28+/-)	p(1/2) = 0,48 p(2/3) = 0,21 p(3/4) = 0,45 p(1/4) = 0,1
CD3-/NKp46+	9,88 (4,36+/-)	8,96 (4,02+/-)	12,52 (5,99+/-)	17,18 (8,21)	p(1/2) = 0,33 p(2/3) = 0,15 p(3/4) = 0,22 p(1/4) = 0,01

Tabelle 49: Die Tabelle zeigt die Durchschnittswerte für die Zellzahl der einzelnen Populationen der NK- Zellen im zeitlichen Verlauf von der ersten präoperativen Blutentnahme bis zu den postoperativen Blutabnahmen bei Chondrosarkomen G1.

3.5.6 Zeitlicher Verlauf der prozentualen Rezeptorexpression beim Chondrosarkom G1 für B-, T- und NK-Zellen

Die Rezeptorexpression der B-Zellen zeigte im Vergleich der ersten zur vierten Messung eine deutliche Zunahme ($p=0,002$).

Die Rezeptorexpression der T-Zellen nahm unmittelbar postoperativ zu ($p=0,04$). Im weiteren zeitlichen Ablauf war sie jedoch wieder rückläufig.

Die NK-Zellmarker zeigten in Bezug auf die Rezeptorexpression keine signifikanten Unterschiede.

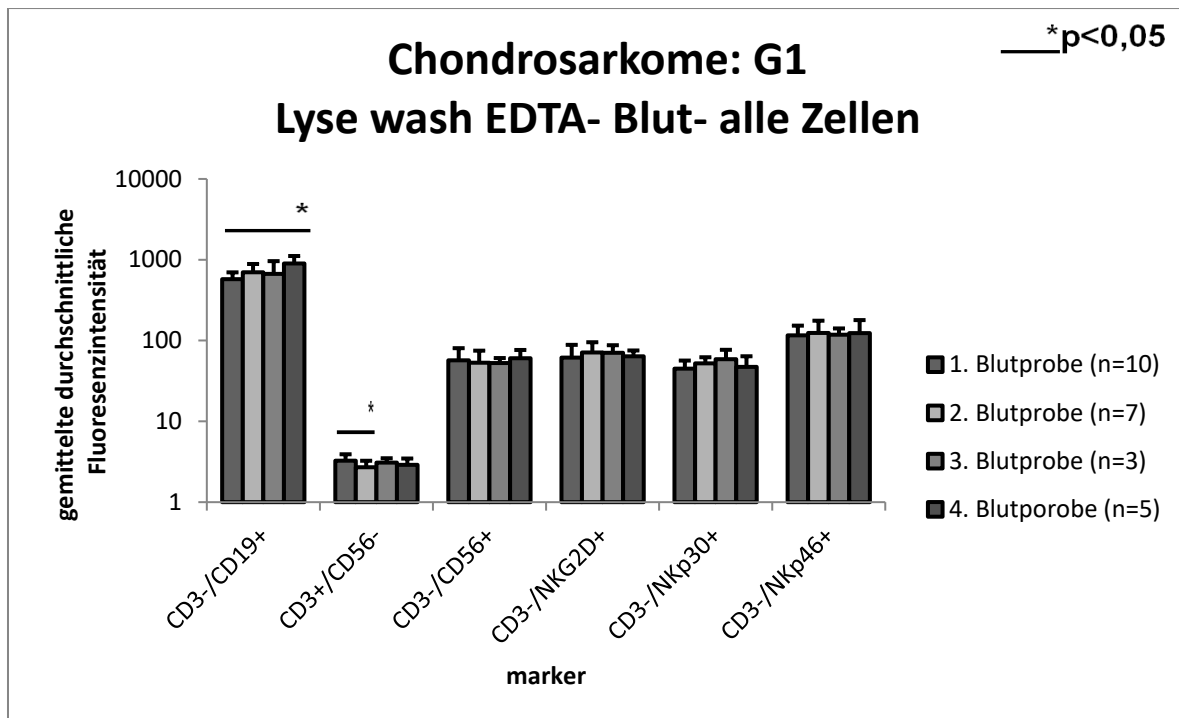


Abbildung 30: Mittlere Rezeptordichte (mean fluorescence intensity, mfi) der Lymphozyten aus dem peripheren Blut bei Patienten mit Chondrosarkomen G1. Die Grafik zeigt die Mittelwerte mit Standardabweichungen für die Zellzahl der gemessenen Zellen in der Durchflusszytometrie für vier Blutproben. Die Balken zeigen die Mittelwerte der mittels Durchflusszytometrie gemessenen Zellen im zeitlichen Verlauf. Die Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen. Signifikanz * $p<0,05$.

Zeitlicher Verlauf der Durchschnittswerte für die Rezeptordichte der B-Zellen (CD3-/CD19+) und der T-Zellen (CD3+/CD56-) bei Chondrosarkomen G1

Die Rezeptorexpression der B-Zellen nahm im weiteren zeitlichen Ablauf zu. Im Vergleich der ersten zur vierten Blutprobe nahm die Rezeptorexpression der B-Zellen deutlich zu ($p=0,002$).

Die Rezeptorexpression der T-Zellen zeigte unmittelbar postoperativ einen deutlichen Rückgang ($p=0,04$). Im weiteren zeitlichen Ablauf nahm die Rezeptorexpression tendenziell zunächst zu und in der vierten Messung wieder ab.

Zellmarker	1. Blutprobe (Signale/Zellzahl $\times 10^3$)	2. Blutprobe (Zellzahl $\times 10^3/\mu\text{l}$)	3. Blutprobe (Zellzahl $\times 10^3/\mu\text{l}$)	4. Blutprobe (Zellzahl $\times 10^3/\mu\text{l}$)	Signifikanz
CD3-/CD19+	573,75 (124,06+/-)	697,94 (187,77 +/-)	669,68 (291,13 +/-)	896,92 (215,48 +/-)	p(1/2) = 0,06 p(2/3) = 0,43 p(3/4) = 0,12 p(1/4) = 0,002
CD3+/CD56-	3,27 (0,65 +/-)	2,71 (0,54 +/-)	3,1 (0,4 +/-)	2,9 (0,58 +/-)	p(1/2) = 0,04 p(2/3) = 0,15 p(3/4) = 0,31 p(1/4) = 0,15

Tabelle 50: Die Tabelle zeigt die Durchschnittswerte für die Rezeptordichte der ersten beiden Populationen und entspricht den B- und T-Zellen im zeitlichen Verlauf von der ersten präoperativen Blutentnahme bis zu den postoperativen Blutabnahmen der Chondrosarkome G1.

Zeitlicher Verlauf der Durchschnittswerte der Rezeptordichte der Natürlichen Killerzellen bei Chondrosarkomen G1

Die CD3-/NKG2D+ Zellen und die CD3-/NKp30+ Zellen nahmen in der zweiten und dritten Messung tendenziell zu. In der vierten Messung war die Rezeptorexpression jedoch wieder rückläufig.

Die CD3-/CD56+ Zellen nahmen in der zweiten und dritten Messung tendenziell ab und zeigten in der vierten Messung einen leichten Anstieg. Signifikante Unterschiede zeigten sich jedoch nicht.

Zellmarker	1. Blutprobe (Zellzahl $\times 10^3/\mu\text{l}$)	2. Blutprobe (Zellzahl $\times 10^3/\mu\text{l}$)	3. Blutprobe (Zellzahl $\times 10^3/\mu\text{l}$)	4. Blutprobe (Zellzahl $\times 10^3/\mu\text{l}$)	Signifikanz
CD3-/CD56+	57,03 (23,41 +/-)	53,15 (21,8 +/-)	52,64 (8,08 +/-)	60,46 (16,01 +/-)	p(1/2) = 0,36 p(2/3) = 0,48 p(3/4) = 0,24 p(1/4) = 0,39
CD3-/NKG2D+	61,66 (26,84 +/-)	71,12 (24,18 +/-)	70,66 (16,86 +/-)	63,72 (11,65 +/-)	p(1/2) = 0,24 p(2/3) = 0,49 p(3/4) = 0,25 p(1/4) = 0,44
CD3-/NKp30+	44,88 (11,67 +/-)	52,17 (9,96 +/-)	58,73 (18,1 +/-)	47,31 (16,59 +/-)	p(1/2) = 0,1 p(2/3) = 0,23 p(3/4) = 0,2 p(1/4) = 0,38
CD3-/NKp46+	116,17 (36,79 +/-)	124,4 (51,67 +/-)	118,06 (23,1 +/-)	123,69 (55,46 +/-)	p(1/2) = 0,36 p(2/3) = 0,42 p(3/4) = 0,43 p(1/4) = 0,37

Tabelle 51: Die Tabelle zeigt die Durchschnittswerte für die Rezeptordichte der einzelnen Populationen der NK- Zellen im zeitlichen Verlauf von der ersten präoperativen Blutentnahme bis zu den postoperativen Blutabnahmen der Chondrosarkome G1.

3.5.7 Zeitlicher Verlauf der prozentualen Zellzusammensetzung beim Chondrosarkom G2 für B-, T- und NK-Zellen (Abb.31, Abb. 32, Tab.52, Tab.53, Tab.54, Tab.55)

In der Untersuchung wurde die prozentuale Zellzahl im zeitlichen Ablauf bei Chondrosarkomen G2 analysiert.

Hier zeigten sich weder für die B- noch für die T-Zellen signifikante Unterschiede in Bezug auf die Zellzahl. Tendenziell nahm die Zellzahl der T-Zellen im zeitlichen Ablauf zu.

In Bezug auf die Zellzahl der gemessenen NK-Zellen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. Tendenziell nahm die NK-Zellzahl im zeitlichen Ablauf zu. Aufgrund der extrem geringen Fallzahl sind diese Aussagen nur sehr eingeschränkt zu bewerten.

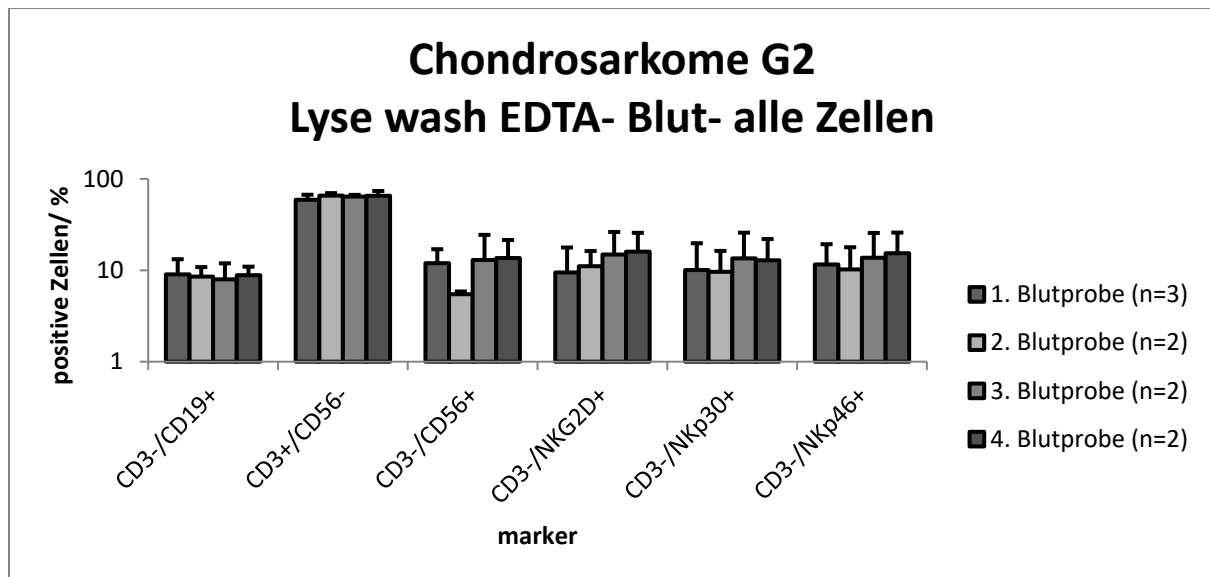


Abbildung 31: Prozentualer Anteil der Lymphozyten aus dem peripheren Blut bei Patienten mit Chondrosarkomen G2. Die Grafik zeigt die Mittelwerte mit Standardabweichungen für die Zellzahl der gemessenen Zellen in der Durchflusszytometrie für vier Blutproben. Die Balken zeigen die Mittelwerte der mittels Durchflusszytometrie gemessenen Zellen im zeitlichen Verlauf. Die Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen.

Zeitlicher Verlauf der Durchschnittswerte für die B- Zellzahl (CD3-/CD19+) und die T- Zellzahl (CD3+/CD56-) bei Chondrosarkomen G2

Die folgende Tabelle zeigt die durchschnittlichen Werte der Zellzahl der B- und T-Zellen. Signifikante Unterschiede zeigten sich bei der Zellzahl nicht. Tendenziell nahm die T- Zellzahl im zeitlichen Ablauf zu.

Zellmarker	1. Blutprobe (Zellzahl x 10 ³ /µl)	2. Blutprobe (Zellzahl x 10 ³ /µl)	3. Blutprobe (Zellzahl x 10 ³ /µl)	4. Blutprobe (Zellzahl x 10 ³ /µl)	Signifikanz
CD3-/CD19+	9,04 (4,17 +/-)	8,52 (2,32 +/-)	7,96 (3,96 +/-)	8,84 (2,12 +/-)	p(1/2) = 0,45 p(2/3) = 0,45 p(3/4) = 0,4 p(1/4) = 0,47
CD3+/CD56-	59,06 (8,05 +/-)	65,53 (4,36 +/-)	63,99 (2,9 +/-)	65,41 (8,34 +/-)	p(1/2) = 0,2 p(2/3) = 0,35 p(3/4) = 0,42 p(1/4) = 0,22

Tabelle 52: Die Tabelle zeigt die Durchschnittswerte für die Zellzahl der ersten beiden Populationen und entspricht den B- und T- Zellen im zeitlichen Verlauf von der ersten präoperativen Blutentnahme bis zu den postoperativen Blutabnahmen der Chondrosarkome G2.

Zeitlicher Verlauf der Durchschnittswerte für die NK- Zellzahlen bei Chondrosarkomen G2

Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die zeitliche Entwicklung der einzelnen NK-Zellmarker.

Die CD3-/CD56+ Zellen zeigten unmittelbar nach der Resektion des Tumors einen Einbruch der Zellzahl. Im weiteren zeitlichen Ablauf kam es dann tendenziell zu einer Zunahme der Zellzahl.

Die CD3-/NKp46+ Zellen zeigten tendenziell ebenfalls unmittelbar nach der Resektion des Chondrosarkoms G2 einen Rückgang und nahmen postoperative tendenziell wieder zu.

Auch die Zellzahl der CD3-/NKp30+ Zellen nahmen in der ersten postoperativen Messung tendenziell ab.

Die Zellzahl der CD3-/NKG2D+ Zellen nahm postoperativ im weiteren zeitlichen Ablauf tendenziell stetig zu.

Signifikante Unterschiede ließen sich in Bezug auf die Zellzahl nicht feststellen.

Zellmarker	1. Blutprobe (Zellzahl x 10 ³ /µl)	2. Blutprobe (Zellzahl x 10 ³ /µl)	3. Blutprobe (Zellzahl x 10 ³ /µl)	4. Blutprobe (Zellzahl x 10 ³ /µl)	Signifikanz
CD3-/CD56+	11,94 (5,06 +/-)	5,47 (0,38 +/-)	12,96 (11,46 +/-)	13,63 (7,83 +/-)	p(1/2) = 0,1 p(2/3) = 0,22 p(3/4) = 0,47 p(1/4) = 0,4
CD3- /NKG2D+	9,46 (8,3 +/-)	11,1 (5,16 +/-)	14,88 (11,39 +/-)	15,99 (9,72 +/-)	p(1/2) = 0,42 p(2/3) = 0,36 p(3/4) = 0,47 p(1/4) = 0,23
CD3-/NKp30+	10,08 (10,0 +/-)	9,64 (6,67 +/-)	13,5 (12,31 +/-)	12,89 (9,08 +/-)	p(1/2) = 0,48 p(2/3) = 0,36 p(3/4) = 0,48 p(1/4) = 0,38
CD3-/NKp46+	11,58 (7,71 +/-)	10,23 (7,65 +/-)	13,72 (11,91 +/-)	15,38 (10,51 +/-)	p(1/2) = 0,42 p(2/3) = 0,38 p(3/4) = 0,44 p(1/4) = 0,33

Tabelle 53: Die Tabelle zeigt die Durchschnittswerte für die Zellzahl der einzelnen Populationen der NK- Zellen im zeitlichen Verlauf von der ersten präoperativen Blutentnahme bis zu den postoperativen Blutabnahmen bei Chondrosarkomen G2.

3.5.8 Zeitlicher Verlauf der Rezeptorexpression beim Chondrosarkom G2 für B-, T- und NK-Zellen

In der Untersuchung wurde die prozentuale Rezeptordichte im zeitlichen Ablauf bei Chondrosarkomen G2 analysiert.

Die Rezeptordichte zeigte bei den B-Zellen im zeitlichen Ablauf eine Zunahme. Im Vergleich der dritten zur vierten Blutprobe nahm die Rezeptorexpression der B-Zellen deutlich zu (p=0,01). Auch im Vergleich der ersten zur vierten Blutprobe zeigte sich eine deutliche Zunahme der Rezeptorexpression bei den B-Zellen (p=0,01).

Die Rezeptorexpression der T-Zellen wies keine signifikanten Unterschiede aus.

Signifikante Werte zeigten sich bei den NK-Zellen lediglich für die CD3-/CD56+ Zellen.

Die Rezeptorexpression der CD3-/CD56+ Zellen nahm in der ersten postoperativen Messung deutlich ab ($p=0,04$). Im weiteren zeitlichen Verlauf nahm die Rezeptorexpression tendenziell wieder zu.

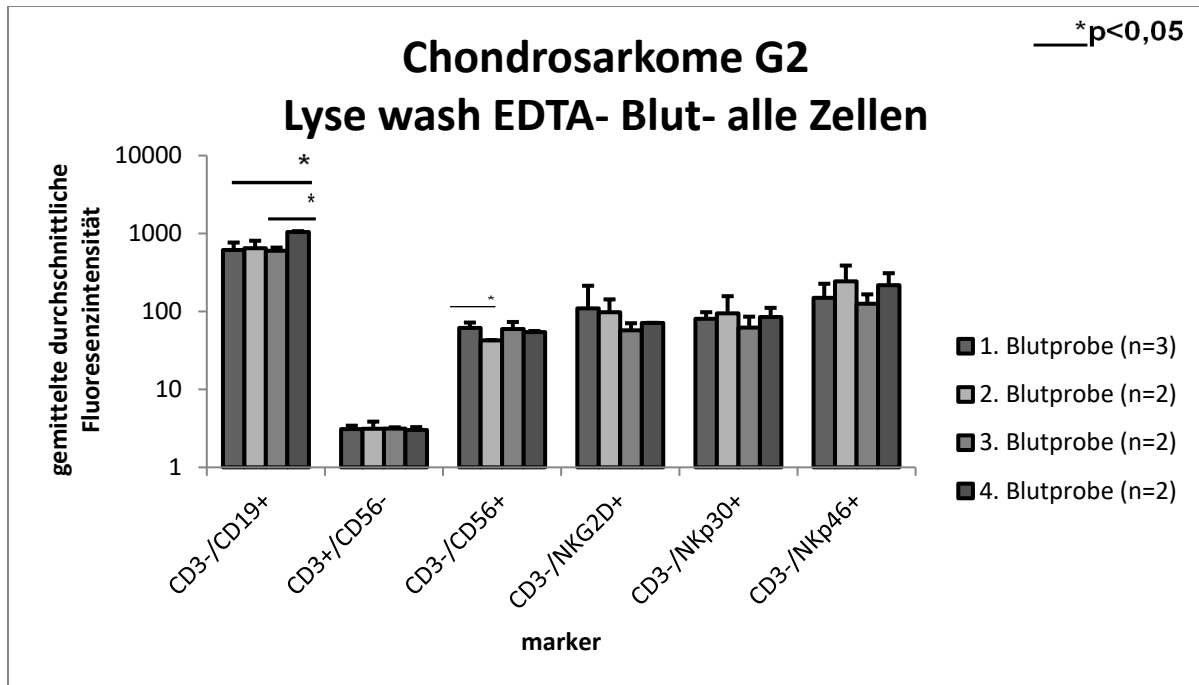


Abbildung 32: Mittlere Rezeptordichte (mean fluorescence intensity) der Lymphozyten aus dem peripheren Blut bei Patienten mit Chondrosarkomen G2. Die Grafik zeigt die Mittelwerte mit Standardabweichungen für die Zellzahl der gemessenen Zellen in der Durchflusszytometrie für vier Blutproben. Die Balken zeigen die Mittelwerte der mittels Durchflusszytometrie gemessenen Zellen im zeitlichen Verlauf. Die Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen. Signifikanz $_*p < 0,05$.

Zeitlicher Verlauf der Durchschnittswerte für die Rezeptorexpression der B- (CD3-/CD19+) und T- Zellen (CD3+/CD56-) bei Chondrosarkomen G2

Die Rezeptordichte zeigte bei den B-Zellen im zeitlichen Ablauf eine Zunahme. Im Vergleich der dritten zu vierten Blutprobe nahm die Rezeptorexpression der B- Zellen deutlich zu ($p=0,01$). Auch im Vergleich der ersten zur vierten Blutprobe zeigte sich eine deutliche Zunahme der Rezeptorexpression bei den B-Zellen ($p=0,01$).

Die Rezeptorexpression der T-Zellen wies keine signifikanten Unterschiede aus.

Zellmarker	1. Blutprobe (Zellzahl x $10^3/\mu\text{l}$)	2. Blutprobe (Zellzahl x $10^3/\mu\text{l}$)	3. Blutprobe (Zellzahl x $10^3/\mu\text{l}$)	4. Blutprobe (Zellzahl x $10^3/\mu\text{l}$)	Signifikanz
CD3-/CD19+	614,75 (8150,92+/-)	647,06 (160,19+/-)	599,85 (59,89 +/-)	1045,75 (25,58+/-)	$p(1/2) = 0,42$ $p(2/3) = 0,36$ $p(3/4) = 0,01$ $p(1/4) = 0,01$
CD3+/CD56-	3,10 (0,33+/-)	3,13 (0,74 +/-)	3,15 (0,12 +/-)	3,01 (0,27 +/-)	$p(1/2) = 0,48$ $p(2/3) = 0,49$ $p(3/4) = 0,28$ $p(1/4) = 0,38$

Tabelle 54: Die Tabelle zeigt die Durchschnittswerte für die Rezeptordichte der ersten beiden Populationen und entspricht den B- und T- Zellen im zeitlichen Verlauf von der ersten präoperativen Blutentnahme bis zu den postoperativen Blutabnahmen der Chondrosarkome G2.

Zeitlicher Verlauf der Durchschnittswerte der Rezeptordichte der Natürlichen Killerzellen bei Chondrosarkomen G2

Die Rezeptorexpression der CD3-/CD56+ Zellen nahm in der ersten postoperativen Messung deutlich ab ($p=0,04$). Im weiteren zeitlichen Verlauf nahm die Rezeptorexpression tendenziell wieder zu.

Die Rezeptorexpression der CD3-/NKG2D+ Zellen war bei der ersten Messung tendenziell rückläufig. Nach ca. einem Jahr kam es tendenziell wieder zu einer leichten Zunahme der Rezeptorexpression.

Die Rezeptorexpression der CD3-/NKp30+ Zellen hatte ein Jahr postoperativ nahezu den gleichen Wert wie präoperativ.

Die Rezeptorexpression der CD3-/NKp46+ Zellen zeigte in der ersten und letzten postoperativen Messung jeweils einen Anstieg.

Zellmarker	1. Blutprobe (Zellzahl x 10 ³ /µl)	2. Blutprobe (Zellzahl x 10 ³ /µl)	3. Blutprobe (Zellzahl x 10 ³ /µl)	4. Blutprobe (Zellzahl x 10 ³ /µl)	Signifikanz
CD3-/CD56+	61,57 (10,48+/-)	42,45 (0,47+/-)	59,6 (13,7+/-)	54,32 (1,77+/-)	p(1/2) = 0,04 p(2/3) = 0,1 p(3/4) = 0,32 p(1/4) = 0,21
CD3-/NKG2D+	109,56 (104,01 +/-)	97,86 (45,09+/-)	57,28 (13,29+/-)	71,14 (0,27+/-)	p(1/2) = 0,44 p(2/3) = 0,17 p(3/4) = 0,14 p(1/4) = 0,33
CD3-/NKp30+	80,35 (17,47 +/-)	94,59 (62,4+/-)	62,13 (23,61+/-)	84,66 (26,52+/-)	p(1/2) = 0,36 p(2/3) = 0,29 p(3/4) = 0,24 p(1/4) = 0,42
CD3-/NKp46+	149,3 (77,29+/-)	243,3 (144,36+/-)	125,6 (40,1+/-)	217,3 (92,17+/-)	p(1/2) = 0,19 p(2/3) = 0,2 p(3/4) = 0,16 p(1/4) = 0,22

Tabelle 55: Die Tabelle zeigt die Durchschnittswerte für die Rezeptordichte der einzelnen Populationen der NK- Zellen im zeitlichen Verlauf von der ersten präoperativen Blutentnahme bis zu den postoperativen Blutabnahmen der Chondrosarkome G2.

3.5.9 Prozentuale Zellzusammensetzung beim Chondrosarkom G3 für B-, T- und NK-Zellen (Abb.33, Abb.34)

In der Untersuchung wurde die prozentuale Zellzahl bei Chondrosarkomen G3 analysiert. Leider konnte bei den beiden Patienten nur eine Blutprobe zum präoperativen Zeitpunkt gewonnen werden.

Die durchschnittliche B-Zellzahl ist bei den Chondrosarkomen G3 mit 14,6 im Vergleich zu den Chondrosarkomen G2 mit 9,04 tendenziell höher.

Die durchschnittliche T-Zellzahl ist bei den Chondrosarkomen G3 mit 34,0 im Vergleich zu den Chondrosarkomen G2 mit einer gemittelten T-Zellzahl von 59,06 hingegen tendenziell geringer.

Die gemittelten NK-Zellzahlen der Chondrosarkome G3 bewegen sich in einem Bereich von 16,6 bis 21,3. Die Zellzahlen der einzelnen NK-Zellen im Überblick: CD3-/CD56+ 21,3 (2,72+/-); CD3-/NKG2D+ 16,6 (7,96+/-); CD3-/NKp30+ 20,64 (2,18+/-) und CD3-/NKp46 19,49 (5,66+/-). Die durchschnittlichen NK- Zellzahlen sind im Vergleich mit denen der Chondrosarkome G2 tendenziell höher.

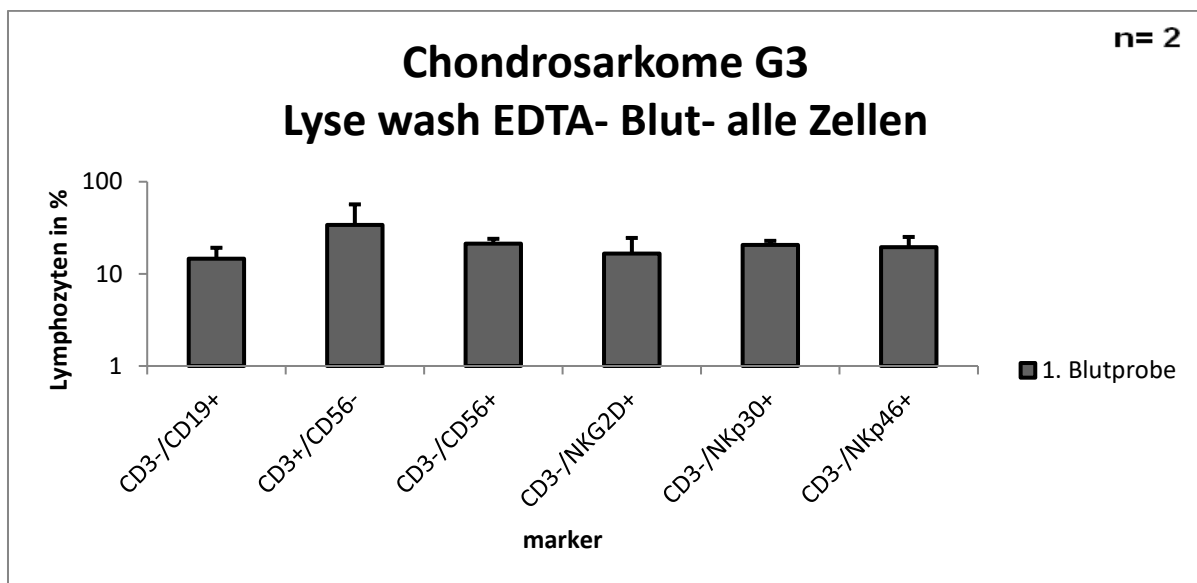


Abbildung 33: Prozentualer Anteil der Lymphozyten aus dem peripheren Blut bei Patienten mit Chondrosarkomen G3. Die Grafik zeigt die Mittelwerte mit Standardabweichungen für die Zellzahl der gemessenen Zellen in der Durchflusszytometrie für die präoperativen Blutproben. Die Balken zeigen die Mittelwerte der mittels Durchflusszytometrie gemessenen Zellen. Die Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen.

3.5.10 Beschreibung der Rezeptorexpression beim Chondrosarkom G3 für B-, T- und NK-Zellen

In der Untersuchung wurde die prozentuale Rezeptordichte bei Chondrosarkomen G3 analysiert.

Die durchschnittliche Rezeptorexpression der B-Zellen bei Chondrosarkomen G3 ist mit 436,56 geringer als die Rezeptorexpression bei Chondrosarkomen G2 mit 614,75.

Für die Rezeptorexpression der T-Zellen beim Chondrosarkom G3 zeigt sich ein durchschnittlicher Wert von 3,95. Die Rezeptorexpression der Chondrosarkome G3 ist geringfügig höher als die der Chondrosarkome G2.

(Die durchschnittliche Rezeptorexpression der T-Zellen bei den Chondrosarkomen G2 lag bei 3,10).

Die Rezeptordichte der Chondrosarkome G3 ist tendenziell im Vergleich zu den Chondrosarkomen G2 geringer in Bezug auf die einzelnen gemessenen NK-Zellen.

Die Rezeptorexpression der CD3-/CD56+ Zellen der Chondrosarkome G3 betrug 42,32 (7,33+/-). Die Rezeptorexpression der CD3-/NKG2D+Zellen der Chondrosarkome G3 lag bei 40,6 (3,53+/-). Für die CD3-/NKp30+ Zellen der Chondrosarkome G3 zeigte sich eine

Rezeptorexpression von 34,18 (13,41+/-) und für die CD3-/NKp46+ Zellen betrug die Rezeptorexpression 95,03 (6,88+/-).

Die Rezeptorexpression der gemessenen NK-Zellmarker ist tendenziell bei den Chondrosarkomen G3 geringer als bei den Chondrosarkomen G2.

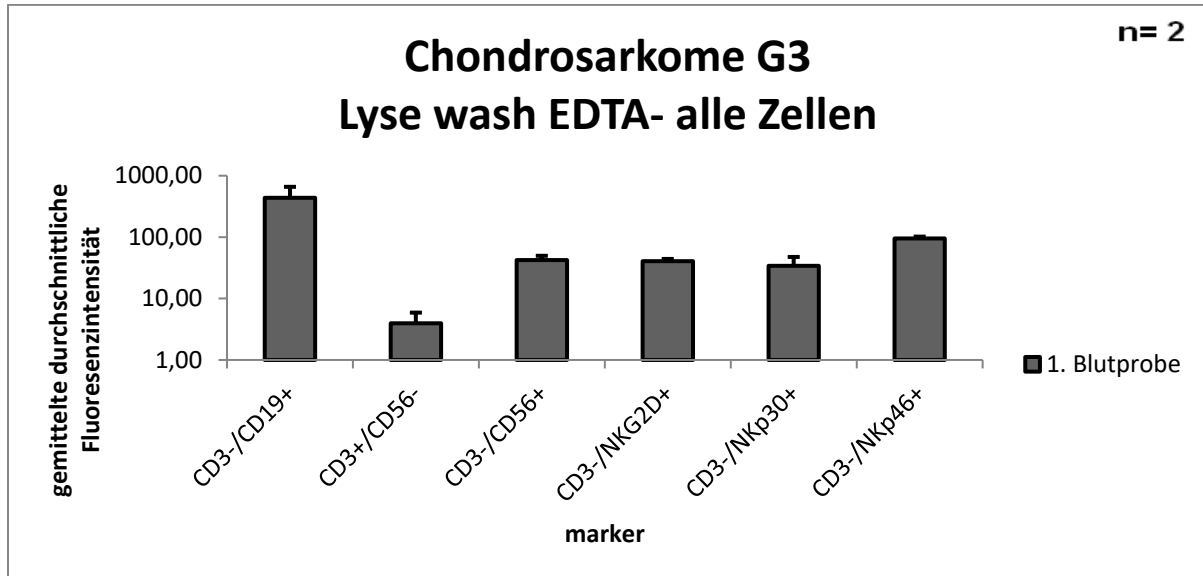


Abbildung 34: Mittlere Rezeptordichte (mean fluorescence intensity, mfi) der Lymphozyten aus dem peripheren Blut bei Patienten mit Chondrosarkomen G3. Die Grafik zeigt die Mittelwerte mit Standardabweichungen für die Rezeptordichte der gemessenen Zellen in der Durchflusszytometrie. Die Balken zeigen die Mittelwerte der mittels Durchflusszytometrie gemessenen Zellen. Die Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen.

3.5.11 Chondrosarkome ohne Rezidiv

Von den 17 Patienten mit einem Chondrosarkom waren 16 Patienten auch nach über einem Jahr rezidiv frei. In diesem Patientenkollektiv kann die Zellzahl und die Rezeptordichte im zeitlichen Verlauf für alle vier Blutproben betrachtet werden.

3.5.12 Zeitlicher Verlauf der prozentualen Zellzusammensetzung beim Chondrosarkom ohne Rezidiv für B-, T- und NK-Zellen (Abb.35, Abb.36, Tab.56, Tab.57, Tab.58, Tab.59)

Die Zellzahl der B- und T-Zellen zeigte im zeitlichen Ablauf keine signifikanten Unterschiede. Auch die Zellzahl der gemessenen NK-Zellmarker zeigte im zeitlichen Ablauf keine signifikanten Unterschiede.

Tendenziell nahm die Zellzahl der CD3-/CD56+ NK-Zellen postoperativ zu. Auch die Zellzahl der CD3-/NKG2D+ und der CD3-/NKp46+ Zellen schienen tendenziell zu zunehmen.

Die CD3-/NKp30+ Zellen nahmen tendenziell nach sechs Monaten postoperativ leicht zu und nach einem Jahr postoperativ ab.

Die folgende Grafik gibt einen Überblick über den zeitlichen Ablauf der prozentualen Zellzahl im zeitlichen Ablauf.

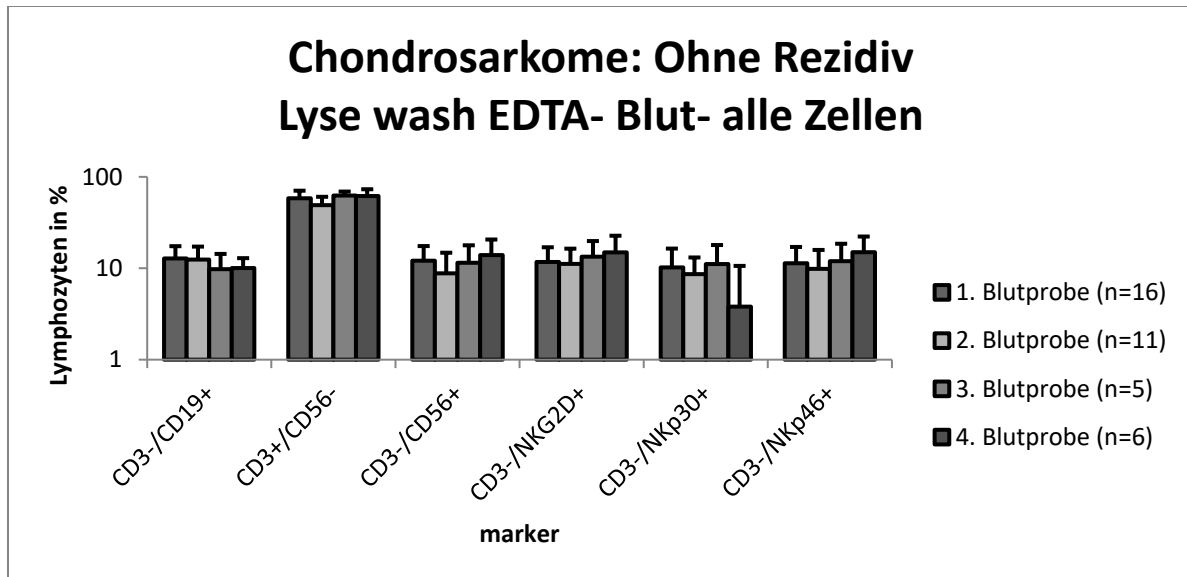


Abbildung 35: Prozentualer Anteil der Lymphozyten aus dem peripheren Blut bei Patienten mit Chondrosarkom ohne Rezidiv. Die Grafik zeigt die Mittelwerte mit Standardabweichungen für die Zellzahl der gemessenen Zellen in der Durchflusszytometrie für vier Blutproben. Die Balken zeigen die Mittelwerte der mittels Durchflusszytometrie gemessenen Zellen im zeitlichen Verlauf. Die Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen.

Zeitlicher Verlauf der Durchschnittswerte für die B- Zellzahl (CD3-/CD19+) und die T- Zellzahl (CD3+/CD56-) bei Chondrosarkomen ohne Rezidiv

Die folgende Tabelle zeigt die durchschnittlichen Werte der Zellzahl der B- und T-Zellen. Signifikante Unterschiede zeigten sich weder bei den B- noch bei den T-Zellen.

Zellmarker	1. Blutprobe (Zellzahl x 10 ⁹ /µl)	2. Blutprobe (Zellzahl x 10 ⁹ /µl)	3. Blutprobe (Zellzahl x 10 ⁹ /µl)	4. Blutprobe (Zellzahl x 10 ⁹ /µl)	Signifikanz
CD3-/CD19+	12,8 (4,66+/-)	12,44 (4,82+/-)	9,78 (4,57)	10,07 (2,82+/-)	p(1/2) = 0,42 p(2/3) = 0,16 p(3/4) = 0,45 p(1/4) = 0,09
CD3+/CD56-	58,34 (12,28+/-)	49,13 (11,4+/-)	62,47 (6,58+/-)	61,67 (11,55+/-)	p(1/2) = 0,15 p(2/3) = 0,18 p(3/4) = 0,45 p(1/4) = 0,43

Tabelle 56: Die Tabelle zeigt die Durchschnittswerte für die Zellzahl der ersten beiden Populationen und entspricht den B- und T- Zellen im zeitlichen Verlauf von der ersten präoperativen Blutentnahme bis zu den postoperativen Blutabnahmen der Chondrosarkome ohne Rezidiv.

Zeitlicher Verlauf der Durchschnittswerte der Natürlichen Killerzellzahlen bei Chondrosarkomen ohne Rezidiv

Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die zeitliche Entwicklung der einzelnen NK-Zellmarker.

Die Zellzahl der gemessenen NK-Zellmarker zeigte keine signifikanten Unterschiede. Tendenziell schienen die Zellzahl der CD3-/NKG2D+ und der CD3-/NKp46+ Zellen im zeitlichen Ablauf zu zunehmen.

Zellmarker	1. Blutprobe (Zellzahl x 10 ³ /µl)	2. Blutprobe (Zellzahl x 10 ³ /µl)	3. Blutprobe (Zellzahl x 10 ³ /µl)	4. Blutprobe (Zellzahl x 10 ³ /µl)	Signifikanz
CD3-/CD56+	3,93 (5,39+/-)	8,8 (5,99+/-)	11,5 (6,34+/-)	13,94 (6,7+/-)	p(1/2) = 0,08 p(2/3) = 0,21 p(3/4) = 0,27 p(1/4) = 0,26
CD3- /NKG2D+	11,73 (5,25+/-)	11,17 (5,24+/-)	13,38 (6,48+/-)	14,95 (7,75+/-)	p(1/2) = 0,39 p(2/3) = 0,24 p(3/4) = 0,37 p(1/4) = 0,14
CD3-/NKp30+	10,24 (6,2+/-)	8,6 (4,53+/-)	11,12 (6,85+/-)	3,8 (6,82+/-)	p(1/2) = 0,24 p(2/3) = 0,19 p(3/4) = 0,49 p(1/4) = 0,36
CD3-/NKp46+	11,36 (5,75+/-)	9,84 (6,02+/-)	11,94 (6,61+/-)	14,98 (7,27+/-)	p(1/2) = 0,26 p(2/3) = 0,27 p(3/4) = 0,25 p(1/4) = 0,12

Tabelle 57: Die Tabelle zeigt die Durchschnittswerte für die Zellzahl der einzelnen Populationen der NK-Zellen im zeitlichen Verlauf von der ersten präoperativen Blutentnahme bis zu den postoperativen Blutabnahmen bei Chondrosarkomen ohne Rezidiv.

3.5.13 Zeitlicher Verlauf der Rezeptorexpression bei Chondrosarkomen ohne Rezidiv für B-, T- und NK-Zellen

Die Rezeptordichte der B-Zellen zeigte eine Zunahme im postoperativen Verlauf. Die Rezeptordichte zeigte im Vergleich der dritten zur vierten Blutprobe eine deutliche Zunahme ($p=0,02$).

Signifikante Unterschiede zeigten sich bei den T-Zellen in Bezug auf ihre Rezeptorexpression nicht.

Die CD3-/CD56+ Zellen zeigten unmittelbar postoperativ einen signifikanten Rückgang ihrer Rezeptorexpression ($p=0,05$). Im weiteren zeitlichen Ablauf zeigte sich im Vergleich der zweiten zur dritten Messung eine deutliche Zunahme der Rezeptorexpression ($p=0,03$). In der letzten Messung kam es tendenziell zu einem minimalen Rückgang der Rezeptorexpression.

Die Rezeptorexpression der CD3-/NKG2D+ Zellen zeigte im zeitlichen Ablauf keinen signifikanten Unterschiede.

Die Rezeptorexpression der CD3-/NKp30+ Zellen zeigte tendenziell im weiteren zeitlichen Ablauf eine minimale Zunahme.

Auch die Rezeptorexpression der CD3-/NKp46+ Zellen zeigte tendenziell im postoperativen Verlauf eine Zunahme.

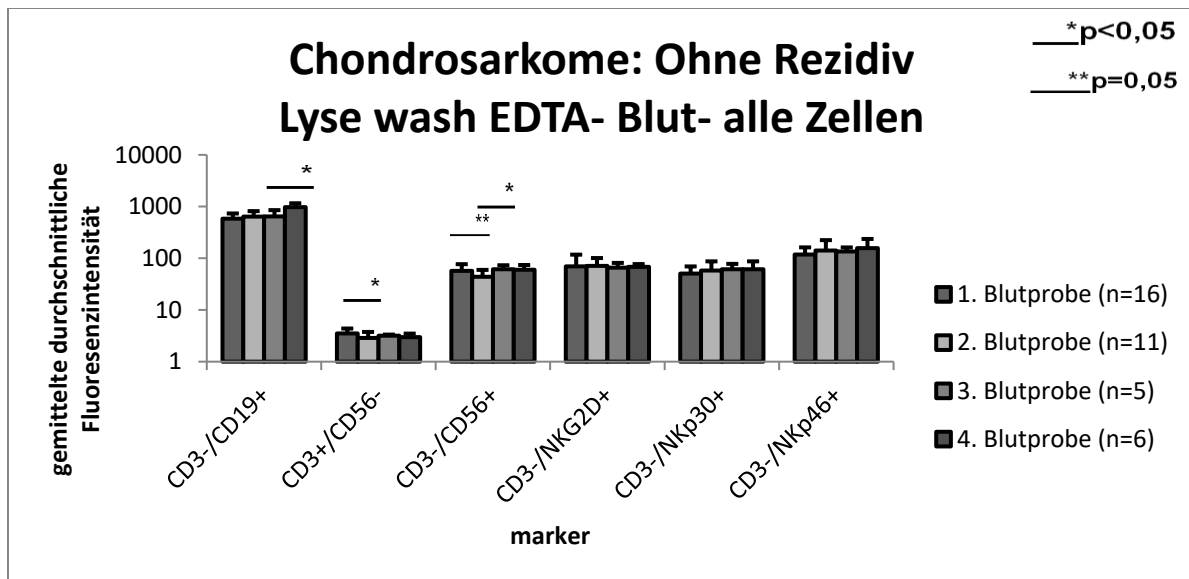


Abbildung 36: Mittlere Rezeptordichte (mean fluorescence intensity, mfi) der Lymphozyten aus dem peripheren Blut bei Patienten mit Chondrosarkomen ohne Rezidiv. Die Grafik zeigt die Mittelwerte mit Standardabweichungen für die Rezeptordichte der gemessenen Zellen in der Durchflusszytometrie für die Blutproben. Die Balken zeigen die Mittelwerte der mittels Durchflusszytometrie gemessenen Zellen im zeitlichen Verlauf. Die Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen. Signifikanz *p<0,05, bzw. **p=0,05.

Zeitlicher Verlauf der Durchschnittswerte für die Rezeptordichte der B-Zellen (CD3-/CD19+) und der T- Zellen (CD3+/CD56-) bei Chondrosarkomen ohne Rezidiv

Die folgende Tabelle die durchschnittlichen Werte der Rezeptordichte der B- und T-Zellen. Die Rezeptordichte der B-Zellen zeigt im weiteren zeitlichen Ablauf eine Zunahme. Insbesondere im Vergleich der dritten zur vierten Blutprobe nahm die Rezeptordichte zu (p= 0,04).

Die durchschnittliche Rezeptordichte der T-Zellen zeigte unmittelbar postoperativ einen deutlichen Rückgang (p= 0,04). Im weiteren zeitlichen Ablauf nahm die Rezeptordichte zunächst zu. Nach ca. einem Jahr postoperativ war die Rezeptordichte im Vergleich zur vorherigen Messung rückläufig.

Zellmarker	1. Blutprobe (Zellzahl x 10 ³ /µl)	2. Blutprobe (Zellzahl x 10 ³ /µl)	3. Blutprobe (Zellzahl x 10 ³ /µl)	4. Blutprobe (Zellzahl x 10 ³ /µl)	Signifikanz
CD3-/CD19+	585,19 (150,25+/-)	639,81 (176,75+/-)	643,6 (209,67+/-)	974,05 (183,17+/-)	p(1/2) = 0,19 p(2/3) = 0,49 p(3/4) = 0,02 p(1/4) = 2,71
CD3+/CD56-	3,51 (0,85+/-)	2,87 (0,88+/-)	3,18 (0,16+/-)	2,97 (0,51+/-)	p(1/2) = 0,04 p(2/3) = 0,22 p(3/4) = 0,2 p(1/4) = 0,08

Tabelle 58: Die Tabelle zeigt die Durchschnittswerte für die Rezeptorexpression der ersten beiden Populationen und entspricht den B- und T- Zellen im zeitlichen Verlauf von der ersten präoperativen Blutentnahme bis zu den postoperativen Blutabnahmen der Chondrosarkome ohne Rezidiv.

Zeitlicher Verlauf der Durchschnittswerte der Rezeptordichte der Natürlichen Killerzellen bei Chondrosarkomen ohne Rezidiv

Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die zeitliche Entwicklung der einzelnen NK-Zellmarker.

Die CD3-/CD56+ Zellen zeigten unmittelbar nach der Resektion des Tumors eine signifikante Abnahme ihrer durchschnittlichen Rezeptorexpression ($p=0,05$).

In der dritten Messung, ca. sechs Monate postoperativ zeigte sich eine deutliche Zunahme der durchschnittlichen Rezeptorexpression ($p=0,03$).

Die letzte Messung zeigte tendenziell einen minimalen Rückgang der durchschnittlichen Rezeptorexpression.

Die übrigen NK-Zellen zeigten keine signifikanten Unterschiede im zeitlichen Ablauf.

Tendenziell kam es bei den CD3-/NKp30+ und den CD3-/NKp46+ Zellen postoperativ zu einer Zunahme der durchschnittlichen Rezeptorexpression.

Zellmarker	1. Blutprobe (Zellzahl x 10 ³ /µl)	2. Blutprobe (Zellzahl x 10 ³ /µl)	3. Blutprobe (Zellzahl x 10 ³ /µl)	4. Blutprobe (Zellzahl x 10 ³ /µl)	Signifikanz
CD3-/CD56+	56,91 (19,92+/-)	43,91 (15,64+/-)	61,17 (12,07+/-)	59,81 (14,36+/-)	p(1/2) = 0,05 p(2/3) = 0,03 p(3/4) = 0,44 p(1/4) = 0,37
CD3- /NKG2D+	69,48 (48,09+/-)	71,39 (29,59+/-)	65,88 (15,39+/-)	68,03 (9,19+/-)	p(1/2) = 0,46 p(2/3) = 0,36 p(3/4) = 0,4 p(1/4) = 0,48
CD3-/NKp30+	50,52 (19,04+/-)	57,72 (29,38+/-)	61,47 (16,32+/-)	61,5 (25,61+/-)	p(1/2) = 0,23 p(2/3) = 0,4 p(3/4) = 0,5 p(1/4) = 0,14
CD3-/NKp46+	118,17 (44,23+/-)	141,28 (82,88+/-)	134,84 (27,24+/-)	156,86 (79,48+/-)	p(1/2) = 0,17 p(2/3) = 0,44 p(3/4) = 0,28 p(1/4) = 0,07

Tabelle 59: Die Tabelle zeigt die Durchschnittswerte für die Rezeptorexpression der einzelnen Populationen der NK- Zellen im zeitlichen Verlauf von der ersten präoperativen Blutentnahme bis zu den postoperativen Blutabnahmen bei Chondrosarkomen ohne Rezidiv.

3.5.14 Chondrosarkom mit Rezidiv (G1)

Von den 17 Patienten mit einem Chondrosarkome zeigte sich nach ca. einem Jahr bei einem Patienten ein Rezidiv. Dieser Patient hatte ein hochdifferenziertes Chondrosarkom G1 des Beckens. Hier wurde zwischen der dritten und vierten Blutprobe mit einer Schwerionenbestrahlung begonnen. Bei der Auswertung der vierten Blutprobe ist diese Behandlung zu berücksichtigen.

3.5.15 Zeitlicher Verlauf der prozentualen Zellzusammensetzung beim Chondrosarkom mit Rezidiv für B-, T- und NK-Zellen (Abb.37, Abb.38, Tab.60, Tab.61, Tab.62, Tab.63)

Tendenziell nahm die B-Zellzahl im weiteren postoperativen Ablauf ab.

Die T-Zellzahl nahm tendenziell postoperativ zunächst zu und war dann in der letzten Messung rückläufig.

Die Zellzahl der untersuchten NK-Zellmarker nahm tendenziell im weiteren zeitlichen Ablauf stetig zu.

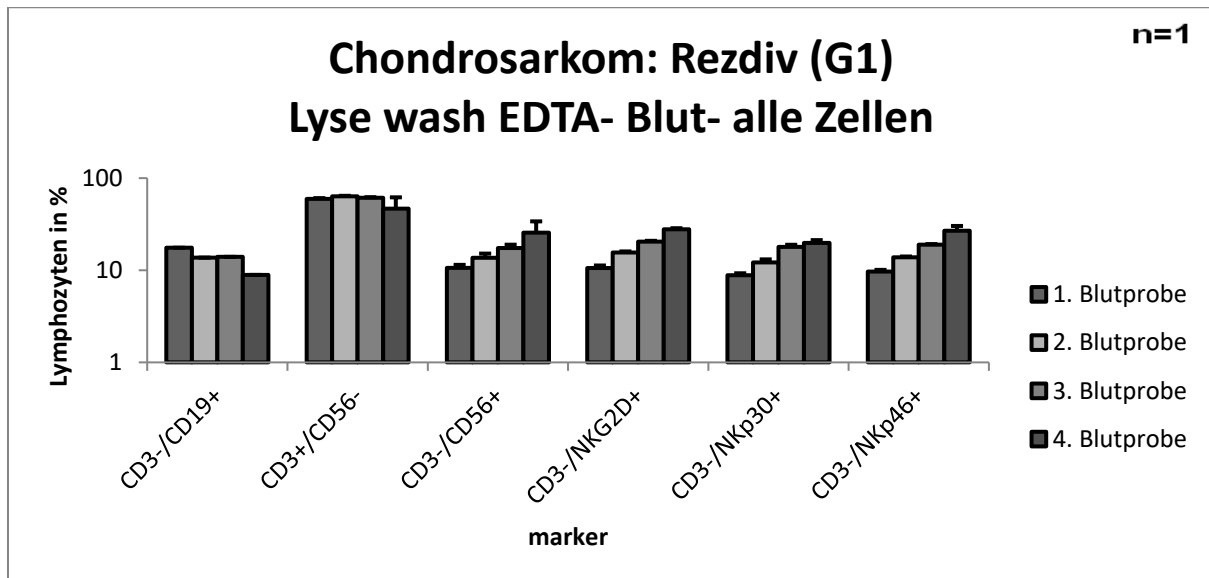


Abbildung 37: Prozentualer Anteil der Lymphozyten aus dem peripheren Blut beim Patienten mit einem Rezidiv eines Chondrosarkoms. Die Grafik zeigt die Mittelwerte mit Standardabweichungen für die Zellzahl der gemessenen Zellen in der Durchflusszytometrie für die Blutproben. Die Balken zeigen die Mittelwerte der mittels Durchflusszytometrie gemessenen Zellen im zeitlichen Verlauf. Die Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen.

Zeitlicher Verlauf der Durchschnittswerte für die B-Zellzahl (CD3-/CD19+) und die T-Zellzahl (CD3+/CD56-) beim Chondrosarkom mit Rezidiv (G1)

Die folgende Tabelle zeigt die durchschnittlichen Werte der Zellzahl der B- und T-Zellen.

Die Zellzahl der B-Zellen war im weiteren zeitlichen Ablauf rückläufig.

Die T-Zellzahl nahm tendenziell unmittelbar nach Resektion des Tumors zu und im weiteren zeitlichen Ablauf ab.

Zellmarker	1. Blutprobe (Zellzahl x 10 ³ /μl)	2. Blutprobe (Zellzahl x 10 ³ /μl)	3. Blutprobe (Zellzahl x 10 ³ /μl)	4. Blutprobe (Zellzahl x 10 ³ /μl)
CD3-/CD19+	17,56 (0,00+/-)	13,71 (0,00+/-)	13,98 (0,00+/-)	8,9 (0,00+/-)
CD3+/CD56-	59,51 (1,13+/-)	63,37 (0,9+/-)	61,2 (1,74+/-)	46,64 (15,24+/-)

Tabelle 60: Die Tabelle zeigt die Durchschnittswerte für die Zellzahl der ersten beiden Populationen und entspricht den B- und T-Zellen im zeitlichen Verlauf von der ersten präoperativen Blutentnahme bis zu den postoperativen Blutabnahmen des Chondrosarkoms mit Rezidiv.

Zeitlicher Verlauf der Durchschnittswerte der Natürlichen Killerzellzahlen beim Chondrosarkom mit Rezidiv (G1)

Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die zeitliche Entwicklung der einzelnen NK-Zellmarker.

Die Zellzahl alle hier gemessenen NK-Zellmarker nahmen tendenziell postoperativ stetig zu.

Zellmarker	1. Blutprobe (Zellzahl x 10 ³ /μl)	2. Blutprobe (Zellzahl x 10 ³ /μl)	3. Blutprobe (Zellzahl x 10 ³ /μl)	4. Blutprobe (Zellzahl x 10 ³ /μl)
CD3-/CD56+	10,62 (0,82+/-)	13,66 (1,51+/-)	17,44 (2,55+/-)	25,61 (8,33+/-)
CD3-/NKG2D+	10,56 (0,7+/-)	15,61 (0,40+/-)	20,48 (0,52+/-)	27,84 (0,75+/-)
CD3-/NKp30+	8,82 (0,45+/-)	12,17 (0,95+/-)	17,96 (0,26+/-)	19,84 (1,39+/-)
CD3-/NKp46+	9,7 (0,4+/-)	13,85 (0,25+/-)	18,97 (0,06+/-)	26,8(3,45+/-)

Tabelle 61: Die Tabelle zeigt die Durchschnittswerte für die Zellzahl der einzelnen Populationen der NK- Zellen im zeitlichen Verlauf von der ersten präoperativen Blutentnahme bis zu den postoperativen Blutabnahmen beim Chondrosarkom mit Rezidiv.

3.5.16 Zeitlicher Verlauf der Rezeptorexpression beim Chondrosarkom mit Rezidiv für B-, T- und NK-Zellen

Die Rezeptordichte der B- und T-Zellen nahm unmittelbar postoperativ zu.

Die Rezeptorexpression der B-Zellen zeigte nach dem ersten Anstieg, in der dritten Messung einen Rückgang. In der vierten Messung zeigte sich eine ähnlich hohe Rezeptorexpression wie in der zweiten Messung.

Die Rezeptorexpression der T-Zellen zeigte, ebenfalls wie bei den B-Zellen nach einem ersten Anstieg im weiteren zeitlichen Ablauf einen Rückgang.

Auch bei den NK-Zellen zeigte sich unmittelbar nach der Resektion des Tumors zunächst ein Anstieg der Rezeptorexpression.

Im weiteren zeitlichen Ablauf war die Rezeptorexpression bei den gemessenen NK-Zellmarkern CD3-/NKG2D+ und CD3-/NKp30+ dann aber wieder rückläufig.

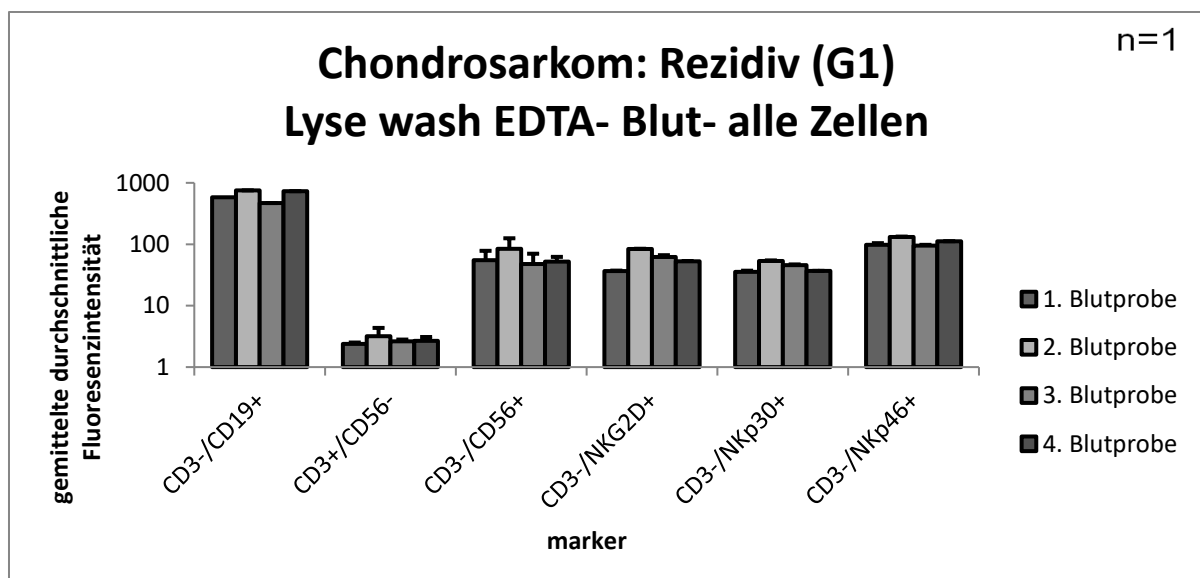


Abbildung 38: Mittlere Rezeptordichte (mean fluorescence intensity, mfi) der Lymphozyten aus dem peripheren Blut beim Patienten mit einem Rezidiv eines Chondrosarkoms. Die Grafik zeigt die Mittelwerte mit Standardabweichungen für die Rezeptorexpression der gemessenen Zellen in der Durchflusszytometrie für die Blutproben. Die Balken zeigen die Mittelwerte der mittels Durchflusszytometrie gemessenen Zellen im zeitlichen Verlauf. Die Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen.

Prozentuale Rezeptorexpression im zeitlichen Ablauf beim Chondrosarkom mit Rezidiv (G1)

Die B- und T-Zellen zeigten unmittelbar postoperativ einen Anstieg ihrer Rezeptorexpression. Im weiteren zeitlichen Ablauf nahm die Rezeptorexpression tendenziell wieder ab.

Zellmarker	1. Blutprobe (Zellzahl x 10 ³ /μl)	2. Blutprobe (Zellzahl x 10 ³ /μl)	3. Blutprobe (Zellzahl x 10 ³ /μl)	4. Blutprobe (Zellzahl x 10 ³ /μl)
CD3-/CD19+	580,68 (0,00+/-)	754,38 (0,00+/-)	469,1 (0,00+/-)	731,83 (0,00+/-)
CD3+/CD56-	2,39 (0,13+/-)	3,18 (1,16+/-)	2,62 (0,18+/-)	2,67 (0,42+/-)

Tabelle 62: Die Tabelle zeigt die Durchschnittswerte für die Rezeptordichte der ersten beiden Populationen und entspricht den B- und T-Zellen im zeitlichen Verlauf von der ersten präoperativen Blutentnahme bis zu den postoperativen Blutabnahmen beim Chondrosarkom mit Rezidiv.

Zeitlicher Verlauf der Durchschnittswerte der Rezeptordichte der Natürlichen Killerzellen beim Chondrosarkom mit Rezidiv (G1)

Auch bei den NK-Zellmarkern zeigte sich unmittelbar postoperativ, wie schon bei den B- und T-Zellen, zunächst eine Zunahme ihrer Rezeptorexpression.

Zellmarker	1. Blutprobe (Zellzahl x 10 ³ /μl)	2. Blutprobe (Zellzahl x 10 ³ /μl)	3. Blutprobe (Zellzahl x 10 ³ /μl)	4. Blutprobe (Zellzahl x 10 ³ /μl)
CD3-/CD56+	55,12 (23,12+/-)	84,34 (40,77+/-)	47,54 (22,63+/-)	52,15 (10,17+/-)
CD3-/NKG2D+	36,61 (0,62+/-)	83,71 (0,81+/-)	62,19 (4,2+/-)	52,76 (0,64+/-)
CD3-/NKp30+	35,515 (1,63+/-)	53,33 (1,25+/-)	45,74 (1,24+/-)	36,89 (0,02+/-)
CD3-/NKp46+	97,96 (6,24+/-)	131,22 (2,05+/-)	95,21 (2,69+/-)	111,85 (0,36+/-)

Tabelle 63: Die Tabelle zeigt die Durchschnittswerte für die Rezeptordichte der einzelnen Populationen der NK-Zellen im zeitlichen Verlauf von der ersten präoperativen Blutentnahme bis zu den postoperativen Blutabnahmen des Chondrosarkoms ohne Rezidiv.

3.6 Enchondrome

Bei neun Patienten mit einem Enchondrom wurde vor der Resektion Blut in EDTA-Röhrchen abgenommen. Die erste Blutabnahme erfolgte kurz vor der eigentlichen Resektion, meist im Operationssaal. Auf weitere Blutabnahmen wurde verzichtet.

Patientenanzahl

Bei neun Patienten mit einem Enchondrom erfolgte eine Blutabnahme unmittelbar vor der Operation. Die Blutprobe wurde, wie schon bei den anderen Entitäten in ein EDTA- und ein

Serum- Röhrcchen entnommen. Auf eine zweite oder dritte Blutabnahme wie bei den Sarkomen wurde hier verzichtet. Die Werte dieses Blutes dienen als Vergleichswert für die Werte aus den Blutabnahmen der Chondrosarkom-Patienten.

Alter der Patienten

Die jüngste Patientin dieser Studie war 12 Jahre alt und der älteste Patient war 66 Jahre alt. Gemittelt hatte diese Patientengruppe ein durchschnittliches Alter von 45 Jahre. Prinzipiell können alle Altersgruppen betroffen sein.

Geschlechterverteilung

Es fand sich bei sechs Patientinnen und bei drei Patienten ein Enchondrom. Das Verhältnis von Männern zu Frauen deckt sich hier nicht mit den Angaben in der Literatur. Mit 54% sind Männer häufiger als Frauen betroffen (Buckup, K. 2001).

3.6.1 Prozentualen Zellzusammensetzung bei Enchondromen für B-, T- und NK-Zellen (Abb.39, Abb.40)

Die folgende Grafik zeigt die gemessene Zellzahl der Lymphozyten bei Patienten mit einem Enchondrom.

Die B- Zellzahl ähnelt der der Chondrosarkome zum präoperativen Zeitpunkt. Ebenso die Zellzahlen der gemessenen NK-Zellmarker.

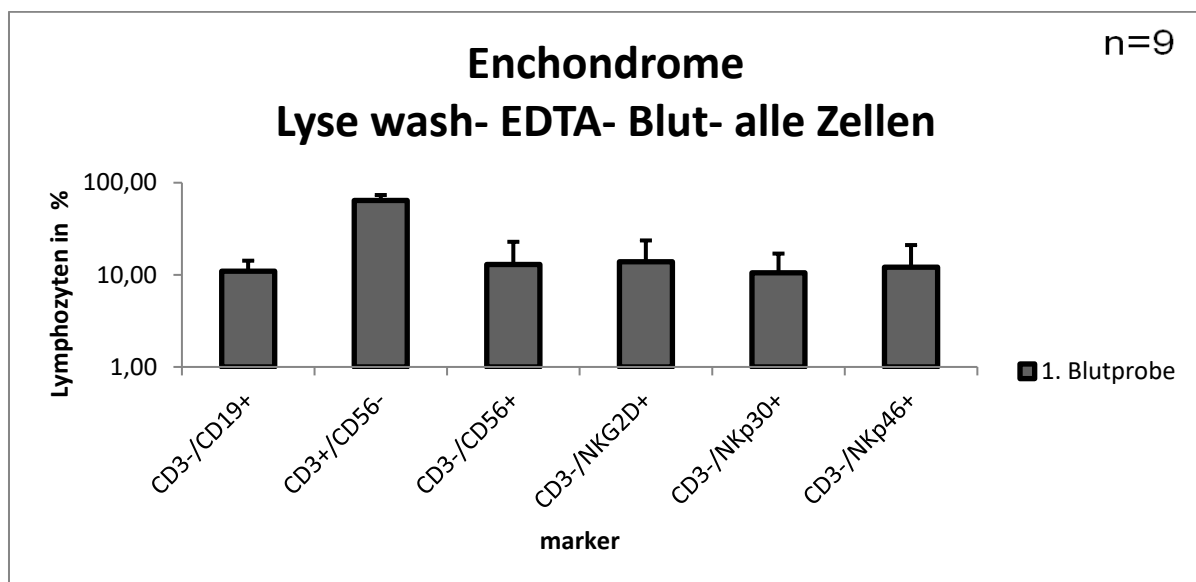


Abbildung 39: Prozentualer Anteil der Lymphozyten aus dem peripheren Blut bei Patienten mit Enchondromen. Die Grafik zeigt die Mittelwerte mit Standardabweichungen für die Zellzahl der gemessenen Zellen in der Durchflusszytometrie für die präoperative Blutprobe. Die Balken zeigen die Mittelwerte der mittels Durchflusszytometrie gemessenen Zellen. Die Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen.

Prozentuale Zellzusammensetzung beim Enchondrom für B-, T- und NK-Zellen

Die B- Zellzahl der Patienten mit einem Enchondrom ist mit 10,93 (3,31+/-) geringer als die der Patienten mit einem Chondrosarkom.

Die T- Zellzahl der Patienten mit einem Enchondrom ist mit 64,23 (9,3 +/-) minimal höher als die T- Zellzahl der Patienten mit einem Chondrosarkom.

Die Zellzahl der gemessenen NK- Zellen bei Patienten mit einem Enchondrom ähnelt der Zellzahl der Patienten mit einem Chondrosarkom zum präoperativen Zeitpunkt. Die CD3-/CD56+ Zellen zeigten eine durchschnittliche Zellzahl von 12,97 (9,86+/-). Die CD3-/NKG2D+ Zellen hatten eine 13,87 (9,75+/-). Die Zellzahl der CD3-/NKp30+ Zellen betrug 10,52 (6,47+/-). Die CD3-/NKp46+ Zellen ergaben 12,10 (8,94+/-).

3.6.2 Beschreibung der Rezeptorexpression bei Enchondromen für B-, T- und NK-Zellen

Die durchschnittliche Rezeptorexpression der B- und T- Zellen zeigt ähnliche Werte wie die der Chondrosarkome in der präoperativen Messung.

Die durchschnittliche Rezeptorexpression der NK-Zellen zeigte verglichen mit der präoperativ gemessenen Rezeptorexpression der Chondrosarkome ähnlich Werte.

Die durchschnittliche Rezeptorexpression der B-Zellen lag bei den Enchondromen bei 600,26.

Die T-Zellen zeigten unter dem Enchondrom eine durchschnittliche Rezeptorexpression von 2,78.

Die CD3-/CD56+ Zellen hatten eine durchschnittliche Rezeptorexpression von 55,94 (26,32 +/-). Die CD3-/NKG2D+ Zellen wiesen eine Rezeptorexpression von 65,5 (12,09+/-) auf und die CD3-/NKp30+ Zellen von 50,6 (25,04+/-). Die Rezeptorexpression der CD3-/NKp46+ Zellen betrug 108,15 (52,37+/-).

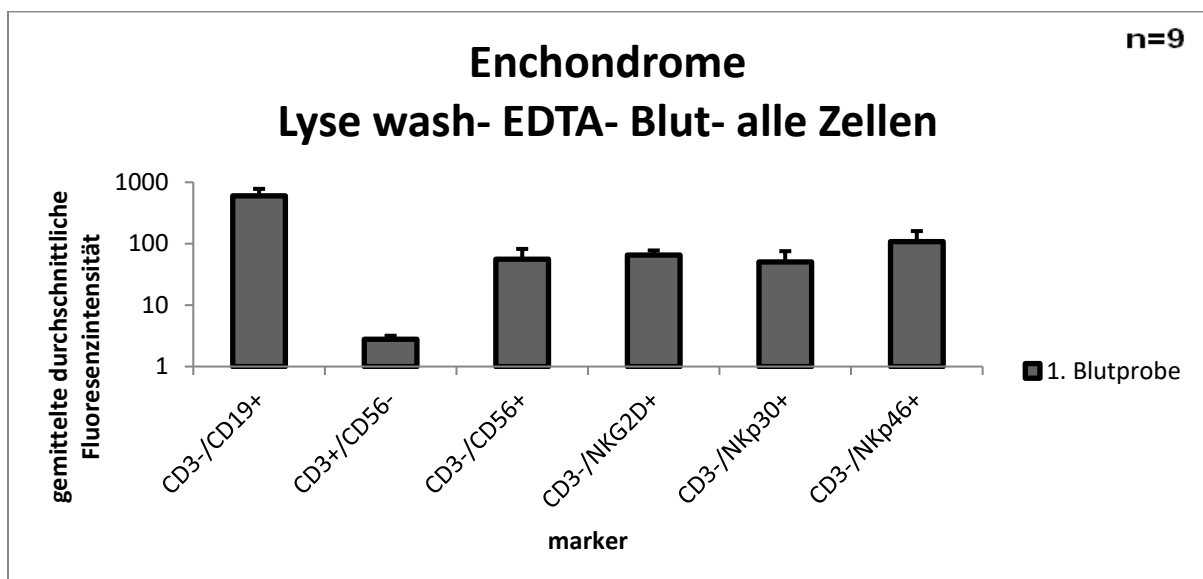


Abbildung 40: Mittlere Rezeptordichte (mean fluorescence intensity, mfi) der Lymphozyten aus dem peripheren Blut bei Patienten mit Enchondromen. Die Grafik zeigt die Mittelwerte mit Standardabweichungen für die Zellzahl der gemessenen

Zellen in der Durchflusszytometrie für die Blutprobe. Die Balken zeigen die Mittelwerte der mittels Durchflusszytometrie gemessenen Zellen. Die Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen.

4 Diskussion

Die Immunphänotypisierung eröffnet viele Möglichkeiten, das Immunsystem zu verstehen. Bei der vorliegenden Arbeit lag das Interesse besonders auf der Analyse bestimmter Zellen des Immunsystems und ihrem Verhalten gegenüber mesenchymalen Neubildungen, darunter vor allem der NK-Zellen als Vertreter des angeborenen Immunsystems. Gerade sie beginnen mit einer Immunantwort noch vor den B- und T-Zellen und nehmen eine wichtige Stellung in der Bekämpfung von virusinfizierten oder Tumor-Zellen ein. Sie stellen eine Unterform der Lymphozyten dar und interagieren auch mit dendritischen- und T-Zellen. Sie schaffen so eine Verbindung zum adaptiven Immunsystem. NK-Zellen können selbst Zytokine produzieren, beispielsweise IL-1 und IL-10 und verstärken so die Abwehr gegen Infektionen.

Die Rezeptoren der NK-Zellen können inhibierend oder aktivierend wirken und wurden einleitend im Einzelnen besprochen. Bei gesunden Erwachsenen machen T-Lymphozyten etwa 70%, B-Lymphozyten und NK-Zellen jeweils 15% aus. Von den NK-Zellen befinden sich ca. 2% im peripheren Blut (Gräfe et al., 2011).

Die B-Zellen und T-Zellen wurden ebenfalls phänotypisch bei Patienten mit Sarkomen näher untersucht.

Unter Zuhilfenahme der Immunphänotypisierung wurden die Blutproben auf das Vorkommen unterschiedlicher Lymphozyten und die Expression bestimmter Oberflächenmarker untersucht. Es wurde versucht, so deren Rolle bei Patienten mit Sarkomen und benignen Tumoren besser zu verstehen.

Allgemeine Mechanismen des Immunsystems zur Tumorabwehr

Bei einigen Tumoren sind bestimmte Interaktionen zwischen den Immunzellen und der zu infiltrierenden Tumorzelle bekannt. Bisher fehlt es aber an Erkenntnissen über diese Zusammenhänge bei Osteo-, Lipo- und Chondrosarkomen. Denkbar sind unterschiedliche Interaktionen je nach Tumorentität und Grading des Sarkoms.

Insgesamt auffällig zeigten sich allgemein erniedrigte Lymphozytenzahlen im Verlauf der Erkrankung beim Osteosarkom.

Die niedrigen Zellzahlen bei Osteosarkomen könnten nicht nur auf eine Interaktion der Lymphozyten mit der Tumorzelle, sondern auch auf die Chemotherapie zurückzuführen sein. Bekannt ist, dass es unter Chemotherapie oder unter einer Radiatio zu einer Leukopenie kommen kann (van der Bruggen et al., 1991), beispielsweise bei Osteosarkomen im Rahmen der (neo)adjuvanten Chemotherapie (Montovani et al., 2008). Auch der Tumor selbst kann eine Leukopenie induzieren.

In den untersuchten Blutproben zeigten sich bei den malignen wie auch bei den benignen Tumoren ähnliche Zellzahlen für die einzelnen Lymphozyten-Subsets. Das steht in Diskrepanz zur theoretischen Erwartung einer höheren Zellzahl bei benignen Tumoren. Es zeigte sich jedoch auch, dass die NK-Zellen der Osteosarkome im Vergleich zu denen der Osteochondrome eine etwas höhere Aktivität zeigten. Scheinbar gibt es Mechanismen, die versuchen dem malignen Geschehen entgegen zu wirken. Unter Tumorummunogenität versteht man die Fähigkeit eines Tumors eine Immunreaktion auszulösen. Einige Tumore produzieren Chemokine, die Immunzellen anlocken.

Histologisch konnte bereits an humanen Tumorproben gezeigt werden, dass Tumore in der Regel von Immunzellen infiltriert sind. In diesen Infiltraten zeigten sich auch CD8+-Zellen, die

TCR besitzen, welche wiederum Tumorantigene erkennen können (Zippelius et al, 2004; Imai et al, 2009).

Tumore exprimieren Zielstrukturen, die vom Immunsystem erkannt werden (Wahl et al., 2007). Wenn Immunzellen Tumore infiltrieren, kann es andererseits jedoch auch zum Tumorwachstum führen. Zellen des Immunsystems, auch unter Beteiligung der entstehenden Tumorzellen selbst, können zur Produktion von Wachstumsfaktoren und einer Umstrukturierung der extrazellulären Matrix angeregt werden. So kann die Invasion der Tumorzellen und die Versorgung des Tumors mit Blutgefäßen (Angiogenese) gefördert werden. Mit einer Zunahme der Tumorgröße und –heterogenität sowie der Entstehung immunogener Subklone, kommt es zu einem vermehrtem Angriff der Lymphozyten auf die Tumorzellen. Ein erhöhter Selektionsdruck, in Kombination mit einer hohen Proliferationsrate und einer damit verbundenen genetischen Instabilität der Tumorzellen, bewirkt letztlich eine Selektion von Zellklonen, die nur noch eingeschränkt immunogen sind und vom Immunsystem nicht mehr erkannt werden. Als „cancer immunoediting“ wird die Entwicklung von zunächst immunogener und heterogener Tumorzellpopulationen zu einer Population hin, die für das Immunsystem „unsichtbar“ ist, bezeichnet (Terman et al., 2011; Doubrovina et al., 2003; Peter 2000; Schantz et al., 1991; Young et al., 1996; Blattman et al., 2004). Maligne Tumore bzw. auch das Tumormilieu führen offensichtlich zu einer Suppression des Immunsystems. Diese These wird von Informationen gestützt, die aus Tumormodellen von Mäusen stammen.

Mittlerweile weiß man auch, dass die Größe des Tumors eine entscheidende Rolle für die Suppression des Immunsystems ausübt (Garrido et al., 1993; Melero et al., 1997; Seliger et al., 2002; Murgia et al. 2006; Elmslie et al., 1997).

Ein Mechanismus von Tumorzellen sich der Immunantwort zu entziehen ist beispielsweise durch die Herunterregulation von MHC und das Sezernieren von inhibitorischen Zytokinen, beispielsweise TGF- β (Evans et al., 1977; 8th International Workshop and Conference on Human Leukocyte Differentiation Antigens [HLDA8]).

Im Rahmen der Tumorprogression werden Tumorantigene herunterreguliert oder unterliegen verschiedenen Mutationen.

Beispielsweise kann durch die Anlagerung von Salicylsäure an die Oberfläche der Tumorzelle ein tumor-escape erfolgen, d.h. die Tumorzelle entzieht sich so einer Immunantwort. Gleiches wurde auch schon im Rahmen von Infektionen beschrieben (Sack et al., 2000). Mittlerweile sind einige Mechanismen des tumor-escape bekannt und es werden immer weitere entdeckt.

Betrachtet man hierzu die Lymphozyten im peripheren Blut und nicht in infiltrierten Tumoren fällt auf, dass die im peripheren Blut vorhandenen Lymphozyten nur 2% des gesamten Lymphozytenpools des menschlichen Körpers darstellen (10×10^9 Zellen). Täglich passieren aber 500×10^9 Lymphozyten den Blutkreislauf. Auch physiologische Faktoren nehmen Einfluss auf die Verteilung von Lymphozyten, z.B. Alter, Medikamente, Stress oder körperliche Anstrengung.

Eine Vermehrung der B-Zellen findet sich häufig bei B-Zelllymphomen, Stress, Rauchen und bei Autoimmunerkrankungen. Eine verminderte B-Zellzahl findet sich beispielsweise bei Immundefekten, alkoholischer Leberzirrhose oder nach einer Immunglobulin-Therapie.

Zu einer Vermehrung von T-Zellen kann es bei akuten oder chronischen Infektionen, Leistungssport und Rauchen kommen. Eine Verminderung findet sich bei Immunsuppression und unter Cortisontherapie, bei Leberkarzinomen, Tumoren und Bestrahlung.

NK- Zellen zeigen eine Vermehrung bei aktiver Sarkoidose, intensivem Training, Stress und Tumorerkrankungen. Eine verminderte NK-Zellzahl findet sich bei Infektionen,

Immunsuppression und unter Steroidtherapie. Insgesamt ist sehr wenig über das Verhalten der Lymphozyten bei Patienten mit Sarkomen bekannt.

So finden sich in der Literatur nur spärliche Angaben über die Zellzahl und die Aktivität der Lymphozyten bei Sarkomen. Bekannt ist, daß die Zellzahlen bei den benignen Tumoren ähnliche Werte wie bei Gesunden (15- 50%) zeigen (Pechhold et al., 1994).

Natürliche-Killerzellrezeptoren und deren Zytotoxizität

Wie eingangs schon beschrieben, können NK-Zellen über aktivierend wirkende Rezeptoren verschiedene Liganden auf infizierten Körperzellen erkennen und entsprechend eliminieren. Als Teil des angeborenen Immunsystems zeichnen sie sich durch eine schnelle Reaktion aus. NK-Zellen sind v.a. für die Eliminierung von körpereigenen Zellen zuständig und brauchen für ihre Aktivierung keine fremden oder neu exprimierten Proteine (Antigene). Tumorzellen können Eigenschaften ausweisen, die es anderen Zellen unmöglich machen, diese Zellen als entartet zu erkennen. In der Regel befinden sich NK-Zellen in einem Ruhezustand (inhibiertem Zustand) um keine gesunden Körperzellen anzugreifen. Wie schon erwähnt besitzen gesunde Körperzellen ein normales Niveau an MHC-Molekülen auf ihrer Zelloberfläche. Diese stellen Liganden für inhibitorische Rezeptoren der NK-Zelle dar und dienen somit einer Herunterregulation der NK-Zellen. Tumorzellen zeigen eine verminderte Anzahl von MHC-Molekülen auf der Zelloberfläche und weisen daher zu wenig Liganden auf, die zu einer Abschaltung der NK-Zelle führen, d.h. die Signale zur Aktivierung der NK-Zelle über die aktivierenden Rezeptoren überwiegen und es kommt zur Lyse der Zielzelle. Durch eine Reduktion der MHC-Moleküle auf der Tumoroberfläche können die Tumorzellen einer Erkennung durch die B- oder T-Zellen entgehen, nicht jedoch einer Erkennung durch die NK-Zellen. Dem B-/T-Zell-escape-Mechanismus tritt das Immunsystem mit den NK-Zellen gegenüber. Nicht eindeutig geklärt ist derzeit warum NK-Zellen trotz dieses guten Mechanismus nicht in der Lage sind Tumorzellen zu erkennen und zu vernichten. Interessant ist neben der Zellzahl der einzelnen NK-Zellen v.a. deren Aktivität.

Die Dichte der NCR auf der Zelloberfläche korreliert mit der Zytotoxizität in Bezug auf die zu eliminierende Zelle (Sack et al., 2006).

Bei Patienten mit HIV zeigte De Maria et al. den Zusammenhang der verminderten Rezeptorexpression von NKp46+ und NKp30+ Zellen mit der verminderten Zytotoxizität der NK-Zellen (Ziske et al., 2001). Eine verminderte Rezeptorexpression von NKp46+ und NKp30+ könnte man also auch bei den Sarkomen erwarten. Hier spielen neben der Tumorentität, dem Grading sicher auch die Größe und das Wachstum des Sarkoms eine Rolle. Bei Chondrosarkomen, die im Vergleich zum Osteo- oder Liposarkom sehr langsam wachsen könnte man vermuten, dass die Interaktion mit den Lymphozyten zunächst milder ausfällt und diese Sarkome sehr viel später und schlechter vom Immunsystem erkannt werden. Möglicherweise wurde auch die schlechtere Durchblutungssituation und damit die Zugänglichkeit der Tumorzelle durch die Lymphozyten eine Rolle spielen.

Bei den Osteosarkomen, die eher schnell wachsen, würde man früher einen Anstieg der Lymphozytenzellzahl und zumindest anfänglich eine vermehrte NCR-Expression erwarten. Mit zunehmender Größe des Sarkoms und einem weiter entwickelten Tumormilieu wäre dann wiederum von einem Rückgang der NCR- Expression und damit der Zytotoxizität der Lymphozyten auszugehen.

Von Angiosarkomen weiß man, dass diese u.a. Wachstumsfaktoren und bestimmte Rezeptoren, beispielsweise den „Vascular Endothelial Growth Factor“ (VEGF) produzieren.

Über diverse Wachstumsfaktoren können Endothelzellproliferation und –wachstum, Angiogenese und Gefäßmodellierung erfolgen (Sack et al., 2006). Für die vermehrte Expression von Wachstumsfaktoren und deren entsprechenden Rezeptoren sind häufig übergeordnete Genmutationen, die einen „loss of heterocycocity“, ergo einen Verlust des gesunden Allels und einen Verlust der Heterozygotie bewirken. Aus isolierten Zelllinien von Angiosarkomen konnte eine Punktmutation am Tumorsuppressorgen p53 gezeigt werden (Bonaccorsi, et al., 2010). Denkbar ist, dass ähnliche Vorgänge auch in den hier untersuchten Sarkomen vorkommen und es somit zu einer Entziehung des Sarkoms gegenüber der zellulären Immunantwort kommt.

Angiosarkome können über die Expression von FAS-L, ein Ligand des FAS- Rezeptors aus der Tumor- Nekrose Faktor Familie ein „Immuno-escape“ betreiben. FAS-L induziert die Apoptose von tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TILs), die für die Immunantwort auf die Tumorzellen zuständig sind (Sanches-Correa et al., 2011).

Ein Defekt in der Antigenpräsentation entsteht durch Fehler oder eine verminderte Expression der MHC-Klasse-I-Moleküle, einen Defekt der TAP- Proteine, das Fehlen von tumorspezifischen Antigenen oder das Fehlen von kostimulierenden Molekülen (Elboim et al., 2010). Auch können Defekte im T-Zell-Repertoire, beispielsweise das Fehlen von T-Zellen, die spezifisch gegen Tumorantigene reagieren, zum Escape-Phänomen führen (Ragan et al., 1946).

Ferner kann ein Ungleichgewicht zwischen Tumorstadium und –zerstörung zugunsten der Tumorzunahme bzw. ein zu rasches Tumorstadium bestehen, so dass der Tumor erst bei einer nicht mehr supprimierbaren Größe vom Immunsystem erkannt wird („sneaking through“) (Mocikat et al., 2003). Ein weiterer Mechanismus zum Escape-Phänomen ist eine aktive Suppression der Immunantwort durch die Tumorzellen, beispielsweise durch die Sekretion von TGF- β , IL-10, sowie Antikörper- oder Antigenbildung (Multhoff et al., 1995).

Osteosarkome

Beim Osteosarkom kam es nach der Resektion des Tumors zu einem reaktiven Anstieg der Zellzahl und der Aktivität der Lymphozyten. Unter der neoadjuvante Chemotherapie, unter der es häufig zu einer Leukopenie kommt, ist dies durchaus überraschend.

Durch den Einsatz von Zytostatika kommt es zur Hemmung oder Blockade der Zellteilung. Krebszellen teilen sich meist schneller als normale Körperzellen, daher sind sie besonders von den Zytostatika betroffen. So kann das Wachstum eines malignen Tumors gebremst oder in einigen Fällen sogar gestoppt werden. Durch die systemische Wirkung der Zytostatika werden auch gesunde Zellen in ihrem Wachstum geschädigt. Vor allem die Zellen des Knochenmarks werden so geschädigt und es kommt u.a. zu einer verminderten Bildung von Lymphozyten (Clemente et al., 1996).

Slovin et al. beschrieben bereits 1986 die ersten Osteosarkom-spezifischen zytotoxischen CD8+ T-Zellklone (Slovin et al. 1986). Die Identifizierung von Antigenen fehlt jedoch noch. Anfang der 90er Jahre tauchten zwei Fallberichte zur Remission von Osteosarkom-Metastasen auf (Ogihara, et al., 1994; Sabate, et al., 1998). Die Spontanremissionen, wie auch der Nachweis von tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TIL) und der selektionsbedingte Verlust von MHC-Molekülen wurde als Hinweis für eine prinzipielle Immunogenität von Tumoren gewertet. Rivoltini beschrieb bereits 1992 die Präsenz von TIL, v.a. von CD8+ T-Zellen beim Osteosarkom (Rivoltini et al. 1992). Tsukahara fand 2006 eine signifikant schlechtere Überlebensrate bei Osteosarkomen mit fehlender Expression von HLA-Klasse-I (Tsukahara, et al., 2006). Das Immunsystem übt bei Osteosarkomen eine Tumor-

Surveillance-Funktion aus. Leider fehlt es hier noch an der Kenntnis entsprechender Mechanismen.

Osteosarkome und Osteochondrome

Weiter lässt sich feststellen, dass die Zellzahlen der einzelnen Lymphozyten bei den Osteochondromen im Vergleich zu den Osteosarkomen leicht erhöht waren. Lediglich die Zellzahl der T- Zellen war bei den Osteosarkomen ganz geringgradig höher. In Bezug auf die Aktivität der einzelnen Zelle zeigten die Osteochondrome leicht höhere Werte als die Osteosarkome. Dies könnte dadurch erklärbar sein, dass das Immunsystem durch das Sarkom supprimiert wird, durch den benignen Tumor nicht. Lediglich die Rezeptorexpression der CD3-/ CD56- Zellen war bei den Osteochondromen tendenziell geringer als bei den Osteosarkomen.

Bei CD3-/ CD56- Zellen handelt es sich um T-NK-Zellen. Sie können bei Neoplasie wie beispielsweise der NK-Zell-Leukämie oder bei bestimmten Viruserkrankungen (v.a. HIV und AIDS) erhöht sein.

Osteosarkome: Grading

Bei den Osteosarkomen G2 zeigten sich im Vergleich zu den Osteosarkomen G3 zum präoperativen Zeitpunkt für die CD3-/NKG2D+ und die CD3-/NKp30+ Zellen leicht höhere Zellzahlen. Die B- Zellzahl und die T-Zellzahl war bei den Osteosarkomen G3 geringfügig höher.

Die B-Lymphozyten differenzieren nach Aktivierung durch körperfremde Antigene zu Plasmazellen, die spezifische Antikörper produzieren. Diese Antikörper führen beispielsweise durch Komplementaktivierung zur Lyse der Erregerzelle. Aus den aktivierten B-Zellen können wiederum Gedächtniszellen entstehen, die bei einer wiederholten Infektion durch einen bekannten Erreger eine sofortige Immunantwort auslösen können. Scheinbar können B-Lymphozyten auf Osteosarkome mit einem höheren Grading zumindest noch mit Proliferation reagieren, wenn auch nicht mit einer vermehrten Aktivität.

Wie schon erwähnt, sind T-Lymphozyten für den zellvermittelten Anteil des adaptiven Immunsystems zuständig und werden durch APCs aktiviert, wodurch es zu einer klonalen Expansion der T-Zellen kommt. Die T-Lymphozyten sind scheinbar wie die B-Lymphozyten noch in der Lage mit einem geringem Anstieg ihrer Zellzahl auf ein Osteosarkom G3 zu reagieren.

Eine geschwächte Immunität bei Tumoren wird auch für Tumor-induzierte Veränderungen bei DC's beschrieben (Gabilovich, et al., 2004). DC's entwickeln sich aus lymphoiden- oder myeloiden Zellreihen. Die myeloiden DC's sind hauptsächlich für die Antigenpräsentation gegenüber den T-Lymphozyten verantwortlich. Die lymphoiden DC's spielen v.a. in der Toleranzinduktion eine Rolle (Steinman, et al., 1999). Die zunächst unreifen DC's migrieren nach Kontakt mit einem Antigen zu den sekundären lymphatischen Organen, meist in den nächsten Lymphknoten. Dort findet die Ausreifung und die Rekrutierung von B- und T-Lymphozyten statt. Die ausgereiften DC's weisen mehr Peptid-/MHC-Komplexe auf und können so die T-Lymphozyten effektiv stimulieren und eine antigenspezifische T-Zell-Antwort vermitteln (Hart, et al., 1997). Bei Patienten mit Brust-, Lungen-, Kopf- und Halstumoren konnte gezeigt werden, dass eine insgesamt reduzierte Anzahl an DC's im Tumor bei gleichzeitiger Akkumulation von unreifen DC's im peripheren Blut mit dem Stadium und teilweise auch mit der Dauer der Erkrankung korrelierte. Nach Resektion des Tumors kam es

zu einem Wiederanstieg der funktionsfähigen DC's (Almand, et al. 2000). Denkbar ist, dass bei Osteosarkomen G2 und G3 trotz oder eben gerade wegen der zunehmenden Dedifferenzierung der einzelnen Zellen beispielsweise die DC's in der Lage sind, eine noch effektivere Stimulation der T-Lymphozyten in Bezug auf ihre Zellzahl zu bewirken.

Sharma et al. beschrieb, dass die Herunterregulation von typischen Oberflächenantigenen der tumorinfiltrierenden DC's zu einer konsekutiven Schwächung der Antigenpräsentation gegenüber den T-Lymphozyten führt. Ferner konnte gezeigt werden, dass vom Tumor modulierte, defekte DC's auch die Proliferation der CTL's supprimieren (Sharma et al., 2003). Obwohl es zu einer zunehmenden Dedifferenzierung der Zellen kommt, versuchen die B- und v.a. T-Lymphozyten dem noch entgegen zu wirken.

Die Rezeptordichte für die NK-Zellmarker zeigte für die Osteosarkome G2 höhere Werte.

Im Allgemeinen scheinen die Osteosarkome G2 gegenüber den Osteosarkomen G3 eine leicht erhöhte Zellzahl und Aktivität zu besitzen. Ein ähnliches Bild zeigte sich auch bei den Chondrosarkomen.

Das Immunsystem scheint in diesem Stadium auf den Tumor noch besser reagieren zu können. Mit zunehmender Dedifferenzierung der Zellen wird die Immunantwort erschwert.

Bei den Osteosarkomen muss zusätzlich von vornherein berücksichtigt werden, dass die Patienten eine neoadjuvante Chemotherapie erhielten und es schwierig ist, therapiebedingte von tumorbedingten Effekten zu unterscheiden.

Neben dem Differenzierungsgrad spielt auch beim Osteosarkom mutmaßlich die Größe des Tumors für die Immunantwort eine Rolle.

NK-Zellen sind große granuläre Lymphozyten, die ihre zytotoxische Wirkung u.a. über eine Lyse der Zielzelle oder durch Zytokine (Tumornekrosefaktor (TNF) $-\alpha$ und $-\beta$), unabhängig von einer Antigenpräsentation entfalten können. Wie schon beschrieben kommt es bei Tumoren zu einer verringerten MHC-Klasse-I-Moleküloberflächenexpression oder zu deren vollständigen Suppression (Schmid et al., 1998). NK-Zellen können, im Gegensatz zu T-Zellen ohne vorherige Sensibilisierung und in Abwesenheit des MHC-I-Komplexes Tumorzellen zerstören.

MHC-Moleküle werden nach Virusinfektionen oder bei der Tumorentstehung herunterreguliert, um sie vor einem Angriff durch T-Zellen zu schützen. NK-Zellen kommt hier eine besondere Bedeutung zu.

Bei Patienten mit einem Bronchialkarzinom beobachtet man peripher erniedrigte NK-Zellzahlen im Blut (Weissler et al., 1987).

Denkbar wäre es, dass die NK-Zellen im peripheren Blut bei Osteosarkomen G2 den Tumor aufgrund verschiedener Faktoren, wie beispielsweise eines besseren Differenzierungsgrades der Zellen erkennen und attackieren können.

B-Zellen gehören zum humoralen Immunsystem und besitzen auf ihrer Oberfläche membranständige Immunglobuline (B-Zell-Rezeptoren). Durch den Kontakt zwischen B-Zell-Rezeptor und passendem Antigen kommt es zur Proliferation und Differenzierung in antikörpersezernierende Plasmazellen bzw. in B-Gedächtniszellen. Meist ist die zusätzliche Aktivierung von T-Helfer-Zellen für die Antigenpräsentation notwendig.

Im Verlauf der Tumorprogression könnte es zu einem Missverhältnis der Zellpopulationen und einer schlechteren Prognose kommen.

Osteosarkome: G3

Eine signifikante Zunahme der Rezeptorexpression zeigte sich von der ersten zur zweiten Blutprobe nur für den NK-Zellmarker CD3-/CD56+ ($p=0,02$).

Lymphozyten mit diesem Marker gehören zu den zytotoxischen T-Lymphozyten, die MHC I unabhängig zytotoxisch wirken. Diese Zellen werden als NK-ähnliche T-Zellen (NK-like-T-cells) bezeichnet (Ziske et al., 2001; Nakano et al., 2001).

Tumore weisen mit zunehmender Dedifferenzierung und Ausbreitung zunehmend Mutationen auf, was wiederum zu einer besseren Erkennung durch das Immunsystem führt (Nakano et al., 2001). NK-Zellen scheinen die erste Population zu sein, die einen Tumor infiltriert (Kurosawa et al., 1993). Sie erkennen v.a. auch transformierte körpereigene Zellen und stellen somit die erste Kontrollinstanz gegen neoplastisches Wachstum körpereigener Zellen dar (Moretta et al., 2002). Durch die Erkennung von Zellen mit reduzierter MHC-Klasse-I-Expression können sie die Aktivierung von DC's bewirken, die dann zytotoxische T-Zellen aktivieren (Mocikat et al., 2003). Scheinbar werden genau diese Zellen durch das high-grade Osteosarkom stärker supprimiert. Da diese Zellen schnell auf transformierte körpereigene Zellen ansprechen ist es denkbar, dass diese Zellen sich nach der Resektion des Tumors auch schneller wieder erholen können, als beispielsweise die B-Lymphozyten.

Osteosarkom: Rezidivfrei

Wahrscheinlich kam es reaktiv nach der Entfernung des Sarkoms zu einem Anstieg der NK-Zellzahl und der Aktivität der einzelnen Lymphozytensubsets. Mit dem Ausbleiben eines Rezidivs nahmen die Zellzahlen und die Aktivität der einzelnen Lymphozyten wieder ab.

Osteosarkom: Rezidiv

Bei einem Patienten zeigte sich im späteren zeitlichen Verlauf ein Rezidiv. Hier konnte nur eine präoperative und eine postoperative Blutprobe gewonnen werden (lost to follow up). Tendenziell kam es nach der Resektion des Sarkoms zu einer Zunahme der NK-Zellzahl. Die B- und T- Zellzahlen nahmen ab.

Die Rezeptorexpression der Lymphozytensubsets nahmen teitweise stark zu. Mit der Resektion des Sarkoms schien sich das Immunsystem zeitweise zu erholen. Leider fehlt hier eine weitere Blutprobe, um den weiteren Verlauf der Lymphozytensubsets zu sehen. Mit dem Wachstum des Rezidivtumors wäre langfristig mit einer Abnahme der Zellzahlen und Rezeptorexpression zu rechnen.

Liposarkome

Wie die vorliegenden Daten nahelegen, kommt es bei Liposarkomen verstärkt zu einer Suppression der NKG2D+, NKp30+ und NKp46+ Zellen, während die B- und T-Zellen nicht in diesem Ausmaß an der Immunantwort teilnehmen.

Denkbar ist, dass der Tumor zuerst die NK-Zellen supprimiert, da diese auch die ersten Zellen in der Tumorabwehr darstellen. Im weiteren Verlauf kommt es zu einer Herunterregulation der MHC-Moleküle auf der Oberfläche der Tumorzellen um auch den Abwehrmechanismen der B- und T-Zellen zu entkommen. Mit zunehmender Größe des Tumors ändert sich auch das weitere Tumormilieu und die Immunreaktion wird zunehmend erschwert. Die NK-Zellen scheinen bei den Liposarkomen unterrepräsentiert zu sein und könnten so nicht in der Lage sein, die Tumorgenese, d.h. das Wachstum und die weitere Ausdehnung des Tumors, zu unterbinden.

Die Liposarkome zeigten in Bezug auf die Zellzahl und die Aktivität der NK-Zellen eine Suppression. Möglich, dass es hier durch Chemokine (z.B. TGF- β) oder einen direkten Zellkontakt zur Suppression der NK-Zellen kommt.

Die Suppression von T-Zellen ist durch einige bekannte Mechanismen erklärbar. Beispielsweise können spezifische Effektor T-Zellen über zwei Signale aktiviert werden: Über die Bindung eines Peptid- MHC Komplexes an den TZR und über die Bindung von kostimulatorischen Molekülen an Liganden auf der T-Zelloberfläche.

Ohne kostimulatorische Signale kann eine T- Zelle ein spezifisches Antigen zwar erkennen, wird aber nicht aktiv. Man spricht von der T-Zell-Anergie. Für Pankreastumore wurde nachgewiesen, dass APC in der Tumorumgebung zwar Antigene präsentieren, aber nicht genug kostimulatorische Moleküle und es so zur T- Zell- Anergie kommt.

T-Zellen sind in der Lage über die Interaktion von Fas (CD 95) und dessen Liganden (CD95L) die Apoptose zu regulieren. Tumorzellen sind in der Lage, durch die Herunterregulation von pro- apoptotischen Molekülen, v.a. des Fas-Rezeptors CD95 auf der Zelloberfläche, die T-Zell-induzierte Apoptose zu verhindern. Es ist denkbar, dass sich auch Liposarkome eines derartigen Mechanismus bedienen.

Einen Proliferationsvorteil können Tumore durch die Sekretion von immunsuppressiv wirksamen Zytokinen erwirken. Die Th1-Immunantwort kann beispielsweise durch IL-10 unterdrückt werden. Außerdem verhindert IL-10 die Aktivierung von Makrophagen und die Expression kostimulatorischer Moleküle auf APC (Moor et al., 1993).

TGF- β führt durch die Unterdrückung der IL-2 Synthese zur Proliferation von T- Zellen. IL-10 und TGF- β fördern sogenannte regulatorische T-Zellen (T reg). In Tumoren, Blut und Lymphknoten konnte T reg nachgewiesen werden. T reg können Tumorzellen aus dem Blut rekrutieren und so zur Hemmung von immunologischen Effektorzellen führen (Faulkner et al., 2000). Hori et al. beschrieb 2003 einen Transkriptionsfaktor (Foxp3) der zu einer Inhibition von T- Zell- stimulierenden Zielgenen führte (Hori, et al., 2003).

Vorstellbar wäre, dass es bei Liposarkomen ähnliche Mechanismen gibt.

Einige Tumoren exprimieren NKG2D- Liganden (Hayakawa et al., 2006), die in der Lage sind, NK- Zellen zu aktivieren und in vivo zu einer Abstoßung des Tumors führen können.

Aus Tumor-Mausmodellen ist bekannt, dass diese Zellen eine verminderte NKG2D-Expression aufweisen. Beim Menschen sind lösliche NKG2D-Liganden bekannt, die zu einer Herunterregulation von NKG2D auf NK- Zellen führen. Hierbei handelt es sich um MIC-A und MIC-B (MHC-I-related chain) (Diefenbach, et al., 2002).

Möglich wäre, dass auch diese löslichen Liganden hier eine Rolle spielen könnten.

Eine große Anzahl von NK- Zellen scheint beim Hepatitis C-Virus zu einem schnelleren Abklingen der Infektion zu führen (Orange, et al., 2006) während eine geringe Anzahl an NK-Zellen beim humanen Immundefizienzvirus mit einem schnelleren Progress der Krankheit korreliert (Jacobs, et al., 2001; Martin et al., 2002).

Untersuchungen an Patientinnen mit Mammakarzinomen lassen weiters auf einen Zusammenhang zwischen einer Aktivitätsreduktion von NK- Zellen und Metastasenwachstum schließen (Levy et al., 1990; Levy, et al. 1991).

Bei Magenkarzinomen gibt es Hinweise, dass eine höhere Anzahl an intratumoralen NK-Zellen mit einer besseren Prognose und weniger Lymphknotenmetastasen korreliert (Hyakudomi et al., 2008).

Auch für kleinzellige Bronchialkarzinome und das kolorektale Karzinom korreliert die Menge der NK- Zellen mit der Prognose (Hyakudomi, et al., 2008; Ishigami, et al., 2000; Villegas et al., 2002; Coca et al. 1997).

Vom klarzelligen Nierenzellkarzinom weiß man, dass es einen vergleichsweise hohen Anteil an Tumor- infiltrierenden Lymphozyten hat und gut auf Immuntherapien anspricht. Dies lässt vermuten, dass das Immunsystem eine Rolle bei der Kontrolle des Tumorwachstums haben könnte (Rosenberg et al., 1996), eine unzureichende NK-Zellfunktion hingegen ist beispielsweise bei der akuten myeloischen Leukämie (Costello, et al., 2002), bei Kopf-Hals-Karzinomen und beim Mamma-Karzinom (Bauernhofer et al., 2003) bekannt.

Denkbar ist, dass auch bei Liposarkomen die suggerierte Suppression von NK-Zellen maßgeblich zur Tumorproliferation beitragen könnte.

Liposarkome und Lipome

In der Gesamtbetrachtung scheint das Immunsystem auf Lipome mit keiner verstärkten Immunantwort zu reagieren. Lipome sind benigne Tumoren. Eine verstärkte Immunantwort ist daher auch nicht zu erwarten.

Bei Betrachtung der Immunzeleigenschaften fiel auf, dass die untersuchten Zellen der Patienten mit Lipomen denen bei Liposarkomen in Bezug auf die Zellzahl und Rezeptordichte sehr ähnelten. Da Lipome gutartige Neubildungen sind, während Liposarkome maligne Weichteiltumore darstellen, hätte man hier einen deutlicheren Unterschied in Bezug auf die Stimulation des Immunsystems und ggf. der gemessenen Marker erwartet.

Tendenziell kam es aber zu einer Supprimierung der Lymphozyten bei Liposarkomen.

In der Literatur finden sich bisher für Liposarkome keine Daten, die diese Beobachtung untermauern oder widerlegen.

Eine Möglichkeit wäre, dass sich durch die Herunterregulation von MHC und das Sezernieren von inhibitorischen Zytokinen, beispielsweise Transforming Growth Factor β (TGF- β) die Tumorzellen der Immunantwort entziehen (Wahl et al., 2007).

Die NKG2D-Expression von NK-Zellen kann durch TGF- β gehemmt werden. Möglich ist ein solcher Mechanismus prinzipiell auch beim Liposarkom.

TGF- β kann zu einer verminderten Expression von NKG2D-Liganden wie beispielsweise MICA auf Tumorzellen führen. Ein murines Brustkrebsmodell bestätigte dies (Häusler 2011).

Möglich wäre, dass es bei Liposarkomen auch in dieser Hinsicht ähnliche Mechanismen gibt, die eine Erkennung der Tumorzellen durch NK-Zellen verhindern.

Liposarkome: Grading

Mit der Verschlechterung des Differenzierungsgrads der Zelle fällt es dem Immunsystem zunehmend schwerer, gegen den Tumor vorzugehen. Für Patienten mit Plattenepithelkarzinomen des Kopfes und Halses (SCCHN, squamous cell carcinoma of head and neck) ist beispielsweise eine supprimierte Immunfunktion von NK-Zellen verbunden mit einer erhöhten Indizienz für lokal Rezidive oder Fernmetastasen bekannt (Young et al., 1996). Bei entsprechenden Biopsien konnte eine signifikante Sekretion von IL-10 und TGF- β gefunden werden, die zu einer Immunsuppression führen. Außerdem fanden sich im Serum von Patienten mit SCCHN erhöhte Konzentrationen von immunsuppressiv wirksamen Prostaglandinen (Blattman et al., 2004).

In der Literatur findet sich bisher keine Aussage, ob derartige Mechanismen auch für Liposarkome bekannt sind.

Bei den Patienten mit Liposarkomen zeigte sich präoperativ eine tendenziell supprimierte NK-Zellzahl. Nach Resektion des Tumors nahm auch die Aktivität der NK-Zellen tendenziell zu. Es ist daher denkbar, dass Liposarkome ebenfalls zu einer Suppression der NK-Zellen führen.

Bei den Liposarkomen G1 würde man aufgrund der noch guten Differenzierung der Zellen eine höhere Zellzahl und eine höhere Aktivität der Lymphozyten erwarten.

Bei den schlecht differenzierten Liposarkomen würde man hingegen erniedrigte Zellzahlen und eine verminderte Aktivität der Lymphozyten erwarten.

Tatsächlich zeigte sich bei den Liposarkomen G1 in der ersten Blutprobe für die B- wie auch für die hier untersuchten NK-Zellzahlen höhere Werte als bei den Liposarkomen G3. Mit Ausnahme von den T- Zellen; diese waren bei den Liposarkomen G3 (78,18) in der ersten Messung höher als bei den Liposarkomen G1 (63,16).

Die Aktivität der T- Zellen unterschied sich jedoch bei den Liposarkomen G1 im Vergleich zu den Liposarkomen G3 tendenziell nicht.

Scheinbar versucht das Immunsystem über eine vermehrte T-Zellzahl dem dedifferenzierten Liposarkom (G3) entgegenzuwirken. Zu einer vermehrten Aktivität konnte es jedoch trotz des Anstiegs der T-Zellzahl nicht kommen. Die zunehmende Dedifferenzierung der Tumorzelle scheint einen gewissen Stimulus auf die T-Zellen auszuüben, jedoch reicht dieser nicht aus, um gleichzeitig auch eine höhere Aktivität zu schaffen.

Wie schon erwähnt, führt TGF- β durch die Unterdrückung der IL- 2 Synthese zur Proliferation von T- Zellen. IL- 10 und TGF- β fördern sogenannte regulatorische T- Zellen (T reg). In Tumoren, Blut und Lymphknoten konnte T reg nachgewiesen werden. T reg können durch Tumorzellen aus dem Blut rekrutiert werden und so zur Hemmung von immunologischen Effektorzellen führen (Amo, et al., 2001). Dies könnte eine mögliche Erklärung für das Verhalten der T-Zellen bei Liposarkomen G3 sein.

Betrachtet man die T-Zellzahl bei den Liposarkomen G3 mit denen der Lipome fällt auf, dass die Zellzahl bei den Liposarkomen G3 höher ist als bei den Lipomen. Die Aktivität der T- Zellen (3,03) ist im Vergleich zu Lipomen (3,42) jedoch leicht erniedrigt.

Die Zellzahl der NK-Zellen bei Liposarkomen G1 entspricht in etwa der Zellzahl bei den Lipomen. Hinsichtlich der Aktivität zeigte sich im Vergleich der Liposarkome G1 zu den Lipomen eine leichte Suppression bei den Liposarkomen G1.

Vergleicht man die NK-Zellzahlen der Liposarkome G3 mit denen der Lipome fällt auf, dass diese tendenziell noch supprimierter sind als bei den Liposarkomen G1. Ebenfalls ist die

Aktivität der einzelnen NK-Zellen bei den Liposarkomen G3 im Vergleich zu den Lipomen und den Liposarkomen G1 supprimiert. Die B-Zellzahl wie auch deren Aktivität ist bei den Liposarkomen G3 im Vergleich zu den Liposarkomen G1 und den Lipomen erniedrigt. Dies würde man anhand unserer Beobachtungen mit zunehmender Dedifferenzierung und zunehmendem Tumormilieu auch erwarten.

Chondrosarkome

Es ist davon auszugehen, dass sich das Chondrosarkom einer Immunantwort durch die T-Zelle weitgehend entzieht.

Wie schon erwähnt, sind Tumore in der Lage sich durch bestimmte Mechanismen der Immunantwort zu entziehen. Vor allem Tumore epithelialen Ursprungs exprimieren wenige oder keine MHC-I-Moleküle. Dies gilt für Mammakarzinome, Lungenkarzinome und für einige Melanome (Ruiter et al., 1991; Ruiz- Cabello, et al., 1991; Garrido, et al., 1991; Melero et al., 1997; Seliger et al., 2002; Murgia, et al., 2006).

Durch diese Strategie wird die Erkennung von Tumorantigenen durch zytotoxische T-Zellen verhindert.

CTLs sind in der Lage, nach Aktivierung die Zellen, die das entsprechende Antigen präsentieren, zu lysieren (Collins et al., 1998). In diesem Fall werden die APCs als Zielzellen bezeichnet. Hierfür ist die spezifische Interaktion zwischen dem Antigen-MHC-Klasse-I-Komplex auf der Oberfläche der APCs mit den Rezeptoren auf der T-Zell-Oberfläche (MHC-restringierte T-Zell-Antigen-Erkennung) Voraussetzung. Zwei Wechselwirkungen können hierbei unterschieden werden. Zum einen die antigenspezifische Interaktion zwischen dem T-Zell-Rezeptor (TCR) und dem MHC-Klasse-I-Molekül, sowie die Interaktion zwischen MHC-Klasse-I-Molekül und dem CD8-Dimer, das als Korezeptor agiert.

Eine optimale T-Zell-Antwort erfordert eine optimale Signalgebung. D.h. eine maximale Antigenpräsentation durch eine maximale Expression von MHC-I-Molekülen auf den APCs, einem maximalem Bindungsvermögen der Antigene an MHC-Klasse-I, eine maximale Expression von relevanten Zytokinen und eine maximale Kostimulation von akzessorischen Molekülen (Collins et al., 1998).

Beim Chondrosarkom scheint u.a. dieser Signalweg gestört zu sein.

In der Veterinärmedizin ist ein Tumorescape- Mechanismus für ein sogenanntes Sticker-Sarkom, einen Tumor mesenchymalen Ursprungs bekannt. So findet sich hier eine verminderte Expression von MHC- Molekülen (Elmslie, et al., 1997). Es ist denkbar, dass ein derartiger Tumorescape-Mechanismus auch beim Chondrosarkom auftritt.

Ergänzend könnte beim Chondrosarkom immunhistochemisch Lymphozyten auf ihre MHC- I-Expression überprüft werden, um so Rückschlüsse auf diesen Tumorescape-Mechanismus zu gewinnen.

Chondrosarkome und Enchondrome

Eine verstärkte Immunantwort zeigte sich bei Enchondromen als benignen Tumor erwartungsgemäß nicht. Obwohl im Gegensatz dazu Chondrosarkome zu den malignen Tumoren zählen, verhielten sich die Lymphozyten bei beiden Entitäten recht ähnlich.

Chondrosarkome scheinen aber tendenziell zu einer Immunsuppression zu führen, allerdings sind die Unterschiede in der Immunantwort zwischen den benignen und malignen Tumoren äußerst gering.

Die Theorie des „Wegschleichens“ („sneaking through“) besagt, dass sehr kleine Tumorzellmengen das Immunsystem unterlaufen können. Die Antigenmenge reicht somit für die Entwicklung einer effektiven Immunantwort nicht aus (Roitt, 1992).

Chondrosarkome zeichnen sich meist durch ein langsames Wachstum aus, was evtl. auch Auswirkungen auf die Immunantwort in diesem Sinne haben könnte. Es ist denkbar, dass Chondrosarkome zunächst durch sehr kleine Tumorzellmengen das Immunsystem unterwandern können. Mit zunehmendem Wachstum tritt dann der gegenteilige Effekt, das „overriding“ auf. Auch hier ist dann eine suffiziente Immunantwort nicht mehr möglich.

Unterlaufen Zellen eines Tumors die Immunabwehr kommt es trotz Immunogenität bestimmter Zellen zu weiterem Tumorwachstum. Die Antigenität wechselt durch Antigenmodulation ständig. Der durch Antikörper gegen Tumorantigene erzeugte Selektionsdruck führt allmählich zur Ausbildung immer weniger immunogener Zellklone, so dass eine spezifische Immunantwort nur sehr insuffizient greift. Denkbar ist auch, dass Tumorzellen die Suppressorzellreaktion stimulieren können und damit die spezifische Immunabwehr weiter schwächen (Klein, 1991).

Chondrosarkome: Grading

Bei den B-Zellen der Chondrosarkome G1 fiel auf, dass die Zellzahl im Verlauf der ersten zur vierten Blutprobe rückläufig war. Die Rezeptorexpression nahm hingegen im zeitlichen Verlauf im Vergleich der ersten Messung zur vierten Messung signifikant zu. In der ersten postoperativen Messung zeigte sich für die T-Zellen ein signifikanter Rückgang der Rezeptorexpression. Im weiteren Verlauf nahm die Rezeptoraktivität der gemessenen T-Zellen zunächst tendenziell weiter zu und im Verlauf wieder ab. Die CD3-/CD56+ Zellen und die CD3-/NKp46+ Zellen zeigten im Vergleich der ersten zur vierten Messung eine signifikante Zunahme ihrer Zellzahl.

Dies lässt vermuten, dass es unter einem Chondrosarkom G1 bereits zu einer starken Immunsuppression kommt. Mit der Resektion des Tumors kommt es allmählich wieder zu einer Hochregulation der Lymphozyten.

Bei einem G1-Grading könnte das Immunsystem aufgrund der doch noch recht gut differenzierten Zellen noch keine starke Immunreaktion zeigen. Ebenfalls könnte das langsame Wachstum des Chondrosarkoms dazu beitragen, dass das Immunsystem erst zu einem späteren Zeitpunkt mit einer Immunreaktion antwortet.

Interessant zeigt sich in diesem Zusammenhang, dass die Chondrosarkome G2 die höchsten Rezeptordichten für die gemessenen NK-Zellen haben. Die NK-Zellen mit den Markern NKG2D+, NKp30+ und NKp46+ zeigten bei den Chondrosarkomen G2 die größte gemessene Rezeptordichte auf der Zelloberfläche und somit auch die deutlichste Aktivität.

In diesem Stadium ist das Immunsystem scheinbar in der Lage, den Tumor zu erkennen und auch noch eine deutliche Immunreaktion in Gang zu setzen.

Die Differenzierung der einzelnen Zelle nimmt ab, aber die Immunantwort ist noch in der Lage darauf zu reagieren. Denkbar wäre es, hier einen Ansatz für eine zukünftige Therapie (neben der chirurgischen Resektion) zu etablieren.

Die höchsten Zellzahlen von allen Gradings zeigten sich bei den Chondrosarkom G3 für alle NK- Zellmarker, während die Rezeptorexpression im Vergleich zu den Chondrosarkomen G1

und G2 niedriger ist. Die Erhöhung der NK- Zellzahl könnte als Versuch des Immunsystems gewertet werden, auf den Tumor zu reagieren. Trotz einer vermehrten NK-Zellzahl ist das Immunsystem bei einem Chondrosarkom G3 aber nicht in der Lage dadurch auch eine höhere Aktivität der einzelnen NK- Zellen zu erreichen.

Mit Fortschreiten der Dedifferenzierung und mit Zunahme der Tumorgroße entzieht sich das Sarkom dem Immunsystem zunehmend. Auf mögliche Mechanismen wurde schon an anderer Stelle eingegangen.

Möglicherweise kann zukünftig zusätzlich zur chirurgischen Therapie eine entsprechende Immuntherapie auch bei höheren Gradings erfolgversprechend sein.

Beispielsweise könnten NK- Zellen in vitro mit IL-2 vorbehandelt werden und ähnlich, wie man es von Therapieansätzen beim kolorektalem Karzinom kennt, eine zusätzliche Therapieoption bedeuten.

Chondrosarkome: Rezidivierend vs. rezidivfrei

Von den 17 Patienten mit einem Chondrosarkom trat bei einem klinisch manifest ein Rezidiv auf.

Retrospektiv zeigte sich bei diesem Patienten von Beginn an eine geringere Zellzahl und eine geringere Rezeptorexpression der NK- Zellmarker: NKG2D+, NKp30+ und NKp46+.

NKG2D gilt, wie schon erwähnt als ein aktivierender Rezeptor. Auch NKp46 ist ein natürlicher Zytotoxizitätsrezeptor.

Mehrere Evasionsmechanismen sind für den NK-Zell-Rezeptor NKG2D beschrieben. Transformierte oder virusinfizierte Zellen können durch den Verlust von HLA-Klassel-Molekülen zu einer Immunantwort führen (Raulet et al., 2006). Kommt es jedoch aufgrund von inhibitorischen NK-Zell-Rezeptoren, die durch viral infizierte Zellen moduliert werden, zu einer Veränderung der NK-Zellaktivität bleibt die Lyse durch die NK-Zelle aus.

Je nachdem in welchem Verhältnis sich die aktivierenden oder inhibierenden Liganden auf der einzelnen NK-Zelle befinden, kommt es zu deren Aktivierung oder Inhibierung.

Überwiegen die aktivierenden Liganden kommt es zu einer Aktivierung der NK- Zelle (Raulet et al., 2006). NKG2D ist ein aktivierender Rezeptor. Im Mausmodell in vivo konnte gezeigt werden, dass Tumorzellen, die mit Liganden für NKG2D transfiziert wurden eine antitumorale Immunreaktion auslösen konnten (Cerwenka, et al., 2001).

Daher passt es bei diesem Patienten gut ins Bild, dass besonders und auffällig die aktivierenden Rezeptoren von Anfang an supprimiert waren.

Die B- und die T-Zellzahl war von Beginn an bei dem Patienten mit einem späteren Rezidiv etwas höher als bei den rezidiv-freien Patienten.

Nach der Resektion des Chondrosarkoms nahm die NK-Zellzahl bei dem Patienten mit einem späteren Rezidiv zunächst nur geringfügig zu, um im weiteren zeitlichen Verlauf dann deutlich anzusteigen. Wahrscheinlich ist dies ein Korrelat einer Immunantwort auf die Resektion des Tumors.

Trotz Zunahme der Zellzahlen und auch trotz einer Zunahme der Rezeptorexpression war das Immunsystem beim Rezidivfall nicht in der Lage, eine deutlichere Immunantwort hervorzurufen, so wie es bei den rezidivfreien Patienten der Fall war.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die NK-Zellen bei dem Patienten mit Rezidiv von Beginn an deutlicher supprimiert waren als bei den rezidivfreien Patienten.

Das Immunsystem versucht durch die Hochregulation der Zellzahl dem Rezidiv entgegen zu wirken. Letztlich wird die Aktivität der einzelnen Lymphozyten durch das Sarkom allerdings supprimiert. In der Literatur finden sich dazu naturgemäß keine näheren Angaben.

Funktioneller Ausblick

NK- Zellen gehören zum unspezifischem Immunabwehrsystem gegen Virusinfektionen und Tumorzellen (first line of defence) und stellen eine Verbindung zwischen dem erworbenen und dem angeborenen Immunsystem her (Brostoff, Scadding, 1993). Sie sind in der Lage, maligne entartete Zellen gezielt zu erkennen und zu lysieren und stellen damit ein vielversprechendes experimentelles Ziel zur Therapie von Tumorerkrankungen dar.

Gerade bei Osteo-, Chondro- oder Liposarkomen stehen bisher die chirurgische Resektion, die Chemotherapie und die Strahlentherapie im Vordergrund. Es fehlt aber noch an gezielten Therapiealternativen, insbesondere im Bereich der Immuntherapie.

Daher wurde in der vorliegenden Arbeit versucht, Informationen über das Verhalten von bestimmten Lymphozytenpopulationen im peripheren Blut von Tumorpatienten zu gewinnen. Durch ein besseres Verständnis der Immunantwort bei o.g. Sarkomen, insbesondere durch die genauere Beschreibung des Verhaltens von Lymphozyten in infiltrierenden Tumoren sind Therapieansätze zu erhoffen.

Es zeigte sich, dass es bei Sarkomen im allgemeinen zu einer verstärkten Suppression v.a. der aktivierenden NK-Zellen kam. Auch die B- und T-Zellen waren in der Regel bei den Sarkomen supprimiert.

Die teilweise erhöhte Lymphozytenzahl bei den untersuchten Sarkomen garantiert alleine noch keine effektive Funktion dieser Zellen. Andererseits können auch tendenziell erniedrigte Lymphozytenzahlen durch körpereigene Aktivierung eine vermehrte Lysefunktion bewirken. Teilweise zeigten sich gerade bei den höher gradeten Sarkomen eine vermehrte Aktivität der einzelnen Lymphozyten im peripheren Blut.

Interessant ist, dass es gerade bei den höheren Grading und der damit einhergehende Dedifferenzierung der einzelnen Tumorzellen, oftmals zu einer vermehrten Aktivität einzelner Lymphozyten kam.

Bei den Chondrosarkomen zeigte sich trotz einem Grading von G2 im Vergleich zu den Chondrosarkomen G1 eine vermehrte Immunantwort. Auch zeigten sich bei den Osteosarkomen G2 erhöhte Zellzahlen und eine erhöhte Aktivität der einzelnen NK-Zellen

NK-Zellen sind insbesondere dann sehr effektiv, wenn sie durch verschiedene Botenstoffe (Zytokine der T-Helferzellen und der Makrophagen) aktiviert sind. Wichtig sind dabei besonders Interleukin-12 (IL-12), IL-2 und Interferon-gamma. Es gibt unterschiedliche Strategien, NK-Zellen zu aktivieren. Beispielsweise durch adaptive Zelltherapien, bei denen Spendern NK-Zellen entnommen und „ex vivo“ vervielfältigt werden, bevor sie wieder dem Spender injiziert werden. Aber auch Therapien mit Antikörpern, Zytokinen und komplementärmedizinische Strategien können in der Lage sein, die natürlichen Killerzellen zu aktivieren. Solche Strategien wurden bereits vor 30 Jahren angewandt, sind Teil der Krebsimmuntherapie und zeigen bei verschiedenen Krebserkrankungen vielversprechende Ergebnisse (Dahlberg et al., 2015). Auch die Aktivierung von natürlichen Killerzellen durch den körpereigenen Botenstoff Interleukin-2 kann bei Tumoren gute Erfolge aufzeigen (Atkins et al., 2000). Der „in vivo“Einsatz ist allerdings durch verschiedene Faktoren limitiert. Interleukin-2 hat nur eine sehr geringe Halbwertszeit. Diese liegt im Serum bei etwa zehn Minuten. Außerdem werden durch Interleukin-2 insbesondere regulatorische T-Zellen aktiviert, die Immunreaktionen unterdrücken. Hinzu kommt, dass diese Therapie sehr kostspielig ist.

Brunda und Mitarbeiter konnten bereits 1993 nachweisen, dass das Wachstum von Sarkomen, Melanomen, Karzinomen und Lymphomen dosisabhängig nach systemischer

oder intratumoralen Gabe von IL-12 bei Mäusen *in vivo* gehemmt werden kann. Es konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass IL-12 nicht nur das Wachstum eines Primärtumors hemmt, sondern auch einen antimetastatischen Effekt hatte. Die Hemmung des Tumorwachstums ist wahrscheinlich kein direkter Effekt, da IL-12 keine Hemmung des Tumorwachstums *in vitro* bewirkt. IL-12 aktiviert zytotoxische T-Zellen, NK-Zellen und Makrophagen, die die Effektorzellen für die Tumorabwehr darstellen. (Brunda et al., 1993).

Ein möglicherweise weiterer interessanter Therapieansatz wäre die Inkubation von NK-Zellen mit dem sog. TKD-Peptid, d.h. einer 14 Aminosäuren langen Sequenz der Substratbinde-Domäne des Hsp70.

Multhoff et al. entdeckten bereits 1995 Hsp70 auf der Membran von humanen Tumorzellen, im Gegensatz zur rein zytoplasmatischen Lokalisation bei gesunden Zellen (Multhoff et al., 1995). Es konnte ferner gezeigt werden, dass die Quantität des membrangebundenen Hsp70 positiv mit einer NK-Zell-vermittelten Tumorzelllyse korreliert (Multhoff et al., 1995 ; Multhoff et al., 2000; Multhoff et al. 1997; Multhoff et al., 2001).

Lehner konnte zeigen, dass 67% Hsp70-positive Gewebeproben beim Chondrosarkom und bis zu 100% Gewebeproben beim Osteosarkom einen hohen Hsp70-positiven Membranstatus aufwiesen. Lehnners durchflusszytometrischen Messungen der Zellsuspensionen ergaben beim Chondrosarkom im Gegensatz zum Liposarkom eine fast doppelt so hohe Dichte membrangebundener Hsp70- Moleküle (Lehner, S. 2012).

Bei immundefizienten Mäusen konnten injizierte NK-Zellen eine Tumorprogression Hsp70-positiver Karzinome verhindern (Multhoff et al., 2000). Eine gesteigerte wachstumshemmende Wirkung konnte bei *in vitro* stimulierten NK-Zellen im "ex vivo" und "in vivo" Modell gezeigt werden (Multhoff et al., 2000).

Ein biologisches Ansprechen zeigte sich in einer Phase-I-Studie bei 10 von 12 Karzinompatienten nach einer *ex vivo* Stimulation der eigenen, anschließend reinfundierten NK-Zellen mit Hsp70-Peptid TKD und IL-2 (Krause et al., 2004).

Möglicherweise können durch solche Erkenntnisse die Immuntherapien maligne Erkrankungen optimiert werden. Gerade für Patienten mit prognostisch ungünstigen Chondrosarkomen und Osteosarkomen könnte dies ein weiterer, möglicherweise vielversprechender Therapieansatz sein.

5 Anhang

5.1 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
APCs	Antigen-präsentierende Zellen
APZ	Antigen-präsentierende Zellen
BAT3	HLA-B- assoziiertes Transkript
BCR	B-Zell- Rezeptor
CD3	cluster of differentiation 3
CD4	cluster of differentiation 4
CD8	cluster of differentiation 8
CD16	cluster of differentiation 16
CD56	cluster of differentiation 56
CD94	cluster of differentiation 94
CT	Computertomogramm
CTLs	Cytotoxic T Lymphocyte/ zytotoxische T-Lymphozyten
DAP10	DNAX-aktivierendes Protein von 10kD
FACS	Fluorescence activated cell sorting (Durchflusszytometrie)
FCS	Forward scatter (Vorwärtsstreulicht)
GM-CSF	Ganulocyte macrophage colony-stimulating- factor
HLA	Human Leukocyte Antigen Molekül
HLA-C	Human Leukocyten Antigen Molekül C
Hsp	Hitzeschockprotein
Hsp70	Hitzeschockprotein 70
IL-2	Interleukin-2

IL-10	Interleukin-10
IL-12	Interleukin-12
INF- α	Interferon alpha
IFN- γ	Interferon-gamma
ITAM	Immunoreceptor tyrosin-based activating motifs
KIR	killer cell immunoglobulin like receptors
MICA	major histocompatibility complex class I chain related protein A
MICB	major histocompatibility complex class I chain related protein B
MIP α	macrophage inflammatory protein alpha
MIP β	macrophage inflammatory protein beta
MHC	major histocompatibility complex
min	Minute(n)
Mio.	Million(en)
ml	Milliliter
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
MRT	Magnetresonanztomogramm
NCRs	Natural Cytotoxicity Receptors
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NKG2D	natural-killer group 2, member D
NKp30	Natural killer cell p30-related protein
NKp46	Natural killer cell p46-related protein
NKT	Natürliche Killer-T- Zellen
PI3K	Phosphatidylinositol-3 Kinase

SSC	Side scatter (seitwärtsstreulicht)
Syk	spleen tyrosine kinase
Tab.	Tabelle
TGF- β	transforming growth factor beta
Th1-Zellen	Untergruppe der T-Helferzellen
Th2-Zellen	Untergruppe der T-Helferzellen
TKD-Peptid 14	Aminosäuren lange Sequenz der Substratbindedomäne des Hsp70
TLR	Toll-like- Rezeptor
TNF- α	Tumornekrosefaktor alpha
TZR	T-Zell- Rezeptor
ULBP	UL-16 binding protein
ZAP70	zeta-chain- associated protein kinase 70
z.B.	zum Beispiel

5.2 Abbildungsverzeichnis

Nummer	Beschreibung	Quelle
Abb.1	Enchondrom, Röntgenbild	Fred A. Mettler „Klinische Radiologie“ Basiswissen für alle Fachgebiete, Welsevier, Urban& Fischer 2. Auflage, 2005, 319- 321
Abb.2	Osteosarkom, Röntgenbild	Fred A. Mettler „Klinische Radiologie“ Basiswissen für alle Fachgebiete, Welsevier, Urban& Fischer 2. Auflage, 2005, 319- 321
Abb.3	Prozentualer Anteil der Lymphozyten aus dem peripheren Blut bei Patienten mit Osteosarkomen	Eigene Zusammenstellung
Abb.4	Prozentualer Anteil der mittleren Rezeptordichte der Lymphozyten aus dem peripheren Blut bei Patienten mit Osteosarkomen	Eigene Zusammenstellung
Abb.5	Prozentualer Anteil der Lymphozyten aus dem peripheren Blut bei Patienten	Eigene Zusammenstellung

	mit Osteosarkomen G2	
Abb.6	Prozentualer Anteil der mittleren Rezeptordichte der Lymphozyten aus dem peripheren Blut bei Patienten mit Osteosarkomen G2	Eigene Zusammenstellung
Abb.7	Prozentualer Anteil der Lymphozyten aus dem peripheren Blut bei Patienten mit Osteosarkomen G3	Eigene Zusammenstellung
Abb.8	Prozentualer Anteil der mittleren Rezeptordichte der Lymphozyten aus dem peripheren Blut bei Patienten mit Osteosarkomen G3	Eigene Zusammenstellung
Abb.9	Prozentualer Anteil der Lymphozyten aus dem peripheren Blut bei Patienten mit Osteosarkomen ohne Rezidiv	Eigene Zusammenstellung
Abb.10	Prozentualer Anteil der mittleren Rezeptordichte der Lymphozyten aus dem peripheren Blut bei Patienten mit Osteosarkomen ohne Rezidiv	Eigene Zusammenstellung
Abb.11	Prozentualer Anteil der Lymphozyten aus dem peripheren Blut bei Patienten mit Osteosarkomen mit Rezidiv	Eigene Zusammenstellung
Abb.12	Prozentualer Anteil der mittleren Rezeptordichte der Lymphozyten aus dem peripheren Blut beim Patienten mit Osteosarkom Rezidiv	Eigene Zusammenstellung
Abb.13	Prozentualer Anteil der Lymphozyten aus dem peripheren Blut bei Patienten mit Osteochondromen	Eigene Zusammenstellung
Abb.14	Prozentualer Anteil der mittleren Rezeptordichte der Lymphozyten aus dem peripheren Blut bei Patienten mit Osteochondromen	Eigene Zusammenstellung
Abb.15	Prozentualer Anteil der Lymphozyten aus dem peripheren Blut bei Patienten mit Liposarkom	Eigene Zusammenstellung
Abb.16	Prozentualer Anteil der mittleren Rezeptordichte der Lymphozyten aus dem peripheren Blut bei Patienten mit Liposarkom	Eigene Zusammenstellung
Abb.17	Prozentualer Anteil der Lymphozyten aus dem peripheren Blut bei Patienten mit Liposarkomen G1	Eigene Zusammenstellung

Abb.18	Prozentualer Anteil der mittleren Rezeptordichte der Lymphozyten aus dem peripheren Blut bei Patienten mit Liposarkomen G1	Eigene Zusammenstellung
Abb.19	Prozentualer Anteil der Lymphozyten aus dem peripheren Blut bei Patienten mit Liposarkomen G3	Eigene Zusammenstellung
Abb.20	Prozentualer Anteil der mittleren Rezeptordichte der Lymphozyten aus dem peripheren Blut bei Patienten mit Liposarkomen G3	Eigene Zusammenstellung
Abb.21	Prozentualer Anteil der Lymphozyten aus dem peripheren Blut bei Patienten mit Liposarkom Rezidiv	Eigene Zusammenstellung
Abb.22	Prozentualer Anteil der mittleren Rezeptordichte der Lymphozyten aus dem peripheren Blut bei Patienten mit Liposarkom Rezidiv	Eigene Zusammenstellung
Abb.23	Prozentualer Anteil der Lymphozyten aus dem peripheren Blut bei Patienten mit einem Liposarkom ohne Rezidiv	Eigene Zusammenstellung
Abb.24	Prozentualer Anteil der mittleren Rezeptordichte der Lymphozyten aus dem peripheren Blut bei Patienten mit Liposarkom ohne Rezidiv	Eigene Zusammenstellung
Abb.25	Prozentualer Anteil der Lymphozyten aus dem peripheren Blut bei Patienten mit Lipomen	Eigene Zusammenstellung
Abb.26	Prozentualer Anteil der mittleren Rezeptordichte der Lymphozyten aus dem peripheren Blut bei Patienten mit Lipomen	Eigene Zusammenstellung
Abb.27	Prozentualer Anteil der Lymphozyten aus dem peripheren Blut bei Patienten mit Chondrosarkomen	Eigene Zusammenstellung
Abb.28	Prozentualer Anteil der mittleren Rezeptordichte der Lymphozyten aus dem peripheren Blut bei Patienten mit Chondrosarkomen	Eigene Zusammenstellung
Abb.29	Prozentualer Anteil der Lymphozyten aus dem peripheren Blut bei Patienten mit Chondrosarkomen G1	Eigene Zusammenstellung
Abb.30	Prozentualer Anteil der mittleren Rezeptordichte der Lymphozyten aus	Eigene Zusammenstellung

	dem peripheren Blut bei Patienten mit Chondrosarkomen G1	
Abb.31	Prozentualer Anteil der Lymphozyten aus dem peripheren Blut bei Patienten mit Chondrosarkomen G2	Eigene Zusammenstellung
Abb.32	Prozentualer Anteil der mittleren Rezeptordichte der Lymphozyten aus dem peripheren Blut bei Patienten mit Chondrosarkomen G2	Eigene Zusammenstellung
Abb.33	Prozentualer Anteil der Lymphozyten aus dem peripheren Blut bei Patienten mit Chondrosarkomen G3	Eigene Zusammenstellung
Abb.34	Prozentualer Anteil der mittleren Rezeptordichte der Lymphozyten aus dem peripheren Blut bei Patienten mit Chondrosarkomen G3	Eigene Zusammenstellung
Abb.35	Prozentualer Anteil der Lymphozyten aus dem peripheren Blut beim Patienten mit Chondrosarkom ohne Rezidiv	Eigene Zusammenstellung
Abb.36	Prozentualer Anteil der mittleren Rezeptordichte der Lymphozyten aus dem peripheren Blut bei Patienten mit Chondrosarkom ohne Rezidiv	Eigene Zusammenstellung
Abb.37	Prozentualer Anteil der Lymphozyten aus dem peripheren Blut beim Patienten mit einem Rezidiv eines Chondrosarkoms	Eigene Zusammenstellung
Abb.38	Prozentualer Anteil der mittleren Rezeptordichte der Lymphozyten aus dem peripheren Blut beim Patienten mit einem Rezidiv eines Chondrosarkoms	Eigene Zusammenstellung
Abb.39	Prozentualer Anteil der Lymphozyten aus dem peripheren Blut bei Patienten mit Enchondromen	Eigene Zusammenstellung
Abb.40	Prozentualer Anteil der mittleren Rezeptordichte der Lymphozyten aus dem peripheren Blut bei Patienten mit Enchondromen	Eigene Zusammenstellung

5.3 Tabellenverzeichnis

	Beschreibung	Quelle
Tab.1	Übersicht über die TNM- Klassifikation maligner Tumore (UICC), am Beispiel des Osteosarkoms	UICC "TNM, Klassifikation maligner Tumoren" Wittekind, C., Meyer, H.J. (Hrsg.), Wiley-Blackwell, 7. Auflage, 141- 46
Tab.2	Übersicht über das Grading	Witteking, Ch., Wagner, G. TNM- Klassifikation maligner Tumoren. Springer, Heidelberg, 1997, 5. Auflage, 97- 107
Tab.3	Übersicht über die Resektionsränder	Page, D. L., Fleming, I. D., Fritz, A., Balch, C. M., Haller, D.G. (Hrsg.) AJCC Cancer Staging Handbook from the AJCC Cancer Staging Manual. Seventh Edition. Springer Verlag, New York, 2010
Tab.4	Die Tabelle zeigt das Staging-System für Weichteilsarkome nach AJCC / UICC	Fletcher, C.D.M., Unni, K.K., Mertens, H. (Hrsg) "WHO classification of soft tissue Pathology & Genetics: Tumors of Soft Tissue and Bone" IARC Press, Lyon, 2002, 9-224
Tab.5	Die Tabelle zeigt die Stadiengruppierung der malignen Knochentumoren nach UICC	Sobin, L. H.; Wittekind, C. "UICC TNM classification of malignant tumors", Wiley- Liss, New York, 2002, 6. Auflage
Tab.6	Die einzelnen Lymphozyten in der Übersicht	Eigene Zusammenstellung
Tab.7	Die untersuchten Tumore in der Übersicht	Eigene Zusammenstellung
Tab.8	Zeitlicher Verlauf der Durchschnittswerte für die B- Zellzahl (CD3-/ CD19+) und die T- Zellzahl (CD3+/CD56-) beim Osteosarkom.	Eigene Zusammenstellung
Tab.9	Zeitlicher Verlauf der Durchschnittswerte der Natürlichen Killerzellzahlen beim Osteosarkom	Eigene Zusammenstellung
Tab.10	Zeitlicher Verlauf der Durchschnittswerte für die Rezeptordichte der B- Zellen (CD3-/ CD19+) und die Rezeptordichte der T-Zellen (CD3+/CD56-) beim Osteosarkom	Eigene Zusammenstellung
Tab.11	Zeitlicher Verlauf der Durchschnittswerte für die Rezeptordichte der einzelnen NK- Zellen beim	Eigene Zusammenstellung

	Osteosarkom	
Tab.12	Zeitlicher Verlauf der Durchschnittswerte für die B-Zellzahl (CD3-/ CD19+) und die T- Zellzahl (CD3+/CD56-) bei Osteosarkomen G2	Eigene Zusammenstellung
Tab.13	Zeitlicher Verlauf der Durchschnittswerte der Natürlichen- Killerzellzahl bei Osteosarkomen G2	Eigene Zusammenstellung
Tab.14	Zeitlicher Verlauf der Durchschnittswerte für die Rezeptordichte der B-Zellen (CD3-/ CD19+) und die Rezeptordichte der T-Zellen (CD3+/CD56-) bei Osteosarkomen G2	Eigene Zusammenstellung
Tab.15	Zeitlicher Verlauf der Durchschnittswerte für die Rezeptordichte der einzelnen NK- Zellen bei Osteosarkomen G2	Eigene Zusammenstellung
Tab.16	Zeitlicher Verlauf der Durchschnittswerte für die B-Zellzahl (CD3-/CD19+) und die T- Zellzahl (CD3+/CD56-) bei Osteosarkomen G3	Eigene Zusammenstellung
Tab.17	Zeitlicher Verlauf der Durchschnittswerte der Natürlichen Killerzellzahlen bei Osteosarkomen G3	Eigene Zusammenstellung
Tab.18	Zeitlicher Verlauf der Durchschnittswerte für die Rezeptordichte der B-Zellen (CD3-/ CD19+) und der T-Zellen (CD3+/CD56-) bei Osteosarkomen G3	Eigene Zusammenstellung
Tab.19	Zeitlicher Verlauf der Durchschnittswerte für die Rezeptordichte der einzelnen Natürlichen Killerzellen bei Osteosarkomen G3	Eigene Zusammenstellung
Tab.20	Zeitlicher Verlauf der Durchschnittswerte für die B-Zellzahl (CD3-/CD19+) und die T-Zellzahl (CD3+/CD56-) bei Osteosarkomen ohne Rezidiv	Eigene Zusammenstellung
Tab.21	Zeitlicher Verlauf der Durchschnittswerte der Natürlichen Killerzellzahlen bei Osteosarkomen ohne Rezidiv	Eigene Zusammenstellung
Tab.22	Zeitlicher Verlauf der Durchschnittswerte für die Rezeptordichte der B-Zellen (CD3-/ CD19+) und der T-Zellen (CD3+/CD56-) bei Osteosarkomen ohne Rezidiv	Eigene Zusammenstellung
Tab.23	Zeitlicher Verlauf der Durchschnittswerte für die Rezeptordichte der einzelnen NK-Zellen bei Osteosarkomen ohne Rezidiv	Eigene Zusammenstellung
Tab.24	Zeitlicher Verlauf der Durchschnittswerte für die B-Zellzahl (CD3-/ CD19+) und die T- Zellzahl (CD3+/CD56-) beim Osteosarkom mit Rezidiv	Eigene Zusammenstellung
Tab.25	Zeitlicher Verlauf der Durchschnittswerte der Natürlichen Killerzellzahlen beim Osteosarkom mit	Eigene Zusammenstellung

	Rezidiv	
Tab.26	Zeitlicher Verlauf der Durchschnittswerte für die Rezeptordichte der B- Zellen (CD3-/ CD19+) und der T- Zellen (CD3+/CD56-) beim Osteosarkom mit Rezidiv	Eigene Zusammenstellung
Tab.27	Zeitlicher Verlauf der Durchschnittswerte der Rezeptordichte der Natürlichen Killerzellen beim Osteosarkom mit Rezidiv	Eigene Zusammenstellung
Tab.28	Zeitlicher Verlauf der Durchschnittswerte für die B-Zellzahl (CD3-/CD19+) und die T- Zellzahl (CD3+/CD56-) bei Liposarkomen	Eigene Zusammenstellung
Tab.29	Zeitlicher Verlauf der Durchschnittswerte der Natürlichen Killerzellzahlen bei Liposarkomen	Eigene Zusammenstellung
Tab.30	Zeitlicher Verlauf der Durchschnittswerte für die Rezeptordichte der B- Zellen (CD3-/ CD19+) und der T- Zellen (CD3+/CD56-) bei Liposarkomen	Eigene Zusammenstellung
Tab.31	Zeitlicher Verlauf der Durchschnittswerte der Natürlichen Killerzellzahlen bei Liposarkomen	Eigene Zusammenstellung
Tab.32	Zeitlicher Verlauf der Durchschnittswerte für die B-Zellzahl (CD3-/ CD19+) und die T- Zellzahl (CD3+/CD56-) bei Liposarkomen G1	Eigene Zusammenstellung
Tab.33	Zeitlicher Verlauf der Durchschnittswerte der Natürlichen Killerzellzahlen bei Liposarkomen G1	Eigene Zusammenstellung
Tab.34	Zeitlicher Verlauf der Durchschnittswerte für die Rezeptordichte der B-Zellen (CD3-/ CD19+) und der T- Zellen (CD3+/CD56-) bei Liposarkomen G1	Eigene Zusammenstellung
Tab.35	Zeitlicher Verlauf der Durchschnittswerte der Rezeptordichte der Natürlichen Killerzellen bei Liposarkome G1	Eigene Zusammenstellung
Tab.36	Zeitlicher Verlauf der Durchschnittswerte für die B-Zellzahl (CD3-/CD19+) und die T-Zellzahl (CD3+/CD56-) bei Liposarkomen G3	Eigene Zusammenstellung
Tab.37	Zeitlicher Verlauf der Durchschnittswerte der Natürlichen Killerzellzahlen bei Liposarkomen G3	Eigene Zusammenstellung
Tab.38	Zeitlicher Verlauf der Durchschnittswerte für die Rezeptordichte der B- Zellen (CD3-/ CD19+) und der T- Zellen (CD3+/CD56-) bei Liposarkomen G3	Eigene Zusammenstellung
Tab.39	Zeitlicher Verlauf der Durchschnittswerte der Rezeptordichte der Natürlichen Killerzellen bei	Eigene Zusammenstellung

	Liposarkomen G3	
Tab.40	Zeitlicher Verlauf der Durchschnittswerte für die B-Zellzahl (CD3-/CD19+) und die T- Zellzahl (CD3+/CD56-) bei Liposarkomen ohne Rezidiv	Eigene Zusammenstellung
Tab.41	Zeitlicher Verlauf der Durchschnittswerte der Natürlichen Killerzellzahlen bei Liposarkomen ohne Rezidiv	Eigene Zusammenstellung
Tab.42	Zeitlicher Verlauf der Durchschnittswerte für die Rezeptordichte der B- Zellen (CD3-/ CD19+) und der T- Zellen (CD3+/CD56-) bei Liposarkomen ohne Rezidiv	Eigene Zusammenstellung
Tab.43	Zeitlicher Verlauf der Durchschnittswerte der Rezeptordichte der Natürlichen Killerzellen bei Liposarkomen ohne Rezidiv	Eigene Zusammenstellung
Tab.44	Zeitlicher Verlauf der Durchschnittswerte für die B-Zellzahl (CD3-/CD19+) und die T- Zellzahl (CD3+/CD56-) bei Chondrosarkomen	Eigene Zusammenstellung
Tab.45	Zeitlicher Verlauf der Durchschnittswerte der Natürlichen Killerzellzahlen bei Chondrosarkomen	Eigene Zusammenstellung
Tab.46	Zeitlicher Verlauf der Durchschnittswerte für die Rezeptordichte der B-Zellen (CD3-/ CD19+) und der T- Zellen (CD3+/CD56-) bei Chondrosarkomen	Eigene Zusammenstellung
Tab.47	Zeitlicher Verlauf der Durchschnittswerte der Rezeptordichte der Natürlichen Killerzellen bei Chondrosarkomen	Eigene Zusammenstellung
Tab.48	Zeitlicher Verlauf der Durchschnittswerte für die B-Zellzahl (CD3-/CD19+) und die T- Zellzahl (CD3+/CD56-) bei Chondrosarkomen G1	Eigene Zusammenstellung
Tab.49	Zeitlicher Verlauf der Durchschnittswerte der Natürlichen Killerzellzahlen bei Chondrosarkomen G1	Eigene Zusammenstellung
Tab.50	Zeitlicher Verlauf der Durchschnittswerte für die Rezeptordichte der B-Zellen (CD3-/ CD19+) und der T- Zellen (CD3+/CD56-) bei Chondrosarkomen G1	Eigene Zusammenstellung
Tab.51	Zeitlicher Verlauf der Durchschnittswerte der Rezeptordichte der Natürlichen Killerzellen bei Chondrosarkomen G1	Eigene Zusammenstellung
Tab.52	Zeitlicher Verlauf der Durchschnittswerte für die B-Zellzahl (CD3-/CD19+) und die T- Zellzahl (CD3+/CD56-) bei Chondrosarkomen G2	Eigene Zusammenstellung
Tab.53	Zeitlicher Verlauf der Durchschnittswerte für die NK-Zellzahlen bei Chondrosarkomen G2	Eigene Zusammenstellung

Tab.54	Zeitlicher Verlauf der Durchschnittswerte für die Rezeptorexpression der B- (CD3-/ CD19+) und T-Zellen (CD3+/CD56-) bei Chondrosarkomen G2	Eigene Zusammenstellung
Tab.55	Zeitlicher Verlauf der Durchschnittswerte der Rezeptordichte der Natürlichen Killerzellen bei Chondrosarkomen G2	Eigene Zusammenstellung
Tab.56	Zeitlicher Verlauf der Durchschnittswerte für die B-Zellzahl (CD3-/CD19+) und die T- Zellzahl (CD3+/CD56-) bei Chondrosarkomen ohne Rezidiv	Eigene Zusammenstellung
Tab.57	Zeitlicher Verlauf der Durchschnittswerte der Natürlichen Killerzellzahlen bei Chondrosarkomen ohne Rezidiv	Eigene Zusammenstellung
Tab.58	Zeitlicher Verlauf der Durchschnittswerte für die Rezeptordichte der B-Zellen (CD3-/ CD19+) und der T- Zellen (CD3+/CD56-) bei Chondrosarkomen ohne Rezidiv	Eigene Zusammenstellung
Tab.59	Zeitlicher Verlauf der Durchschnittswerte der Rezeptordichte der Natürlichen Killerzellen bei Chondrosarkomen ohne Rezidiv	Eigene Zusammenstellung
Tab.60	Zeitlicher Verlauf der Durchschnittswerte für die B-Zellzahl (CD3-/CD19+) und die T- Zellzahl (CD3+/CD56-) beim Chondrosarkom mit Rezidiv	Eigene Zusammenstellung
Tab.61	Zeitlicher Verlauf der Durchschnittswerte der Natürlichen Killerzellzahlen beim Chondrosarkom mit Rezidiv	Eigene Zusammenstellung
Tab.62	Zeitlicher Verlauf der Durchschnittswerte für die Rezeptordichte der B-Zellen (CD3-/ CD19+) und der T-Zellen (CD3+/CD56-) beim Chondrosarkom mit Rezidiv	Eigene Zusammenstellung
Tab.63	Zeitlicher Verlauf der Durchschnittswerte der Rezeptordichte der Natürlichen Killerzellen beim Chondrosarkom mit Rezidiv	Eigene Zusammenstellung

5.4 Danksagung

Ausdrücklich bedanke ich mich bei meinem Doktorvater Professor Doktor R. Gradinger, ehemaliger Ordinarius für Orthopädie und Unfallchirurgie, ehemaliger Ärztlicher Direktor des Klinikums rechts der Isar.

Ich möchte mich ganz herzlich bei Frau Professorin Dr. Gabriele Multhoff, Leiterin der experimentellen Radioonkologie und Strahlentherapie des Klinikums Rechts der Isar München, dafür bedanken, dass ich dieses spannende Projekt bearbeiten durfte.

Ich danke meinen Betreuern Herrn Dr. Peter Prodingler und Herrn Dr. Ingo Banke, die mir immer zuverlässig zur Seite standen und mich an ihren großen Erfahrungen im wissenschaftlichen Arbeiten teilhaben ließen.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Mathias Gehrman, der immer ein offenes Ohr hatte, wenn ich Fragen hatte. Er hat sich stets viel Zeit genommen um verschiedene Fragestellungen zu diskutieren und hat mich immer mit grenzenloser Geduld und großem Engagement unterstützt und motiviert. Diese Art der Betreuung ist nicht selbstverständlich und ich weiß das sehr zu schätzen.

Ein riesiges Dankeschön gebührt Armin Bareiß, Dr. Brigitte Doß, Dr. Daniela Schilling, Dipl.-Ing. Wolfgang Sievert, Stefan Stangl, Ines Nachtigall und Natalia Lutitsky. Ferner Dr. Corina Schneidawind, die mich ebenfalls unterstützte.

Der mit größte Dank gebührt den Patienten, die über einen langen Zeitraum und unter großen persönlichen Opfern und Sorgen sich an der Gewinnung der Blutproben beteiligt haben. Jedem einzelnen Patient und jeder einzelnen Patientin möchte ich hiermit nochmals herzlich Danken.

Schließlich möchte ich mich bei meinem Mann und meiner Familie bedanken, die mich fortwährend geduldig unterstützt haben.

5.5 Literaturverzeichnis

Adamietz, I. A., Knecht, R., Laubert, A., Schilchert, R.B. (2003). *Maligne Rezidive im Kopf-Hals- Bereich, Adamietz, Diagnostik, Therapie-Pflege und soziales Umfeld.* Stuttgart: Schattauer

Adler, C.P. (1998). *Knochenkrankheiten: Diagnostik makroskopischer, histologischer und radiologischer Strukturveränderungen des Skeletts.* Berlin, Heidelberg, New York, Barcelona, Hongkong, London, Mailand, Paris, Tokio: Thieme.

Almand, B., Resser, J.R., Lindman, B., Nadaf, S., Clark, J.I., Kwon, E.D., Carbone, D.P., Gabrilovich, D.I. (2006). Clinical significance of defective dendritic cell differentiation in cancer. *Clin. Cancer Res.*, 6(5), 1755-66.

Amo, Y., Masuzawa. M., Hamada, Y., Katsuoka, K. (2001). Expression of vascular endothelial growth factor in a human hemangiosarcoma delline (ISO-HAS). *Arch. Dermatol. Res.*, 293-301.

Anderson, M.J., Shafer-Weaver K., Greenberg, N.M., Hurwitz, A.A. (2007). Tolerization of tumor-specific T cells despite efficient initial priming in a primary murine model of prostate cancer. *J. Immunol.*, 178, 1268-76.

Asea, A., Rehli, M., Kabingu, E., Boch, J.A., Baré, O., Auron, P.E.,Stevenson, M.A., Calderwood, S.K. (2002). *Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4.* *J. Biol. Chem.*, 277, 15028-34.

Assenmacher, S., Voggenreiter, G., Schütte, H. J., Nast- Kolb, D. (1999). Maligne Knochentumore. *Unfallchirurg*, 102, 716-732.

Atkins, M.B., Kunkel L., Sznol M., Rosenberg S.A. (2000). High-dose recombinant interleukin-2 therapy in patients with metastatic melanoma: long-term survival update. *Cancer J. Sci. Am.*, 1(6), 11–4.

Bacci, G., Bricolli, A., Mercuri, M., Ferrari, S., Bertoni, F., Gasbarrini, A., Fabbri, N., Cesari, M., Forni, C., Campanacci, M. (1998). Osteosarcoma oft he long extremities with synchronous lung metastases: long- term results in 44 patients treated with neoadjuvant chemotherapy *J. Chemother.*, 10, 69-76.

Balkwill, F., Mantovani, A.(2001). Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet*, 357,539-45.

Bauernhofer, T., I. Kuss, B., Henderson, A. S.Baum et T. L. Whiteside (2003). Preferential apoptosis of CD 56 dim natural killer cell subset in patients with cancer. *Eur. J. Immunol.*, 33(1),119-124.

Berger, D.P., Engelhardt, R., Mertelsmann, R. (1997). *Das Rote Buch. Hämatologie und internistische Onkologie.* Landsberg am Lech, Hamburg: Ecomed-Storck

Biassoni, R.; Bottino, C.; Millo, R.; Moretta, L. und Moretta, A. (1999). Natural killer cell-mediated recognition of human trophoblast. *Semin. Cancer Biol.*, 9,13-8.

Bielack, S.S., Kempf- Bielack, B., Delling, G., Exner G. U., Flege, S., Helmke, K., Kotz, R., Salzer- Kutschik, M., Werner, M., Winkelmann, W., Zoubeck, A., Jurgens, H., Winkler, K. (2002). Prognostic factors in high- grade osteosarcoma of the extremities or trunk: An analysis of 1,702 patients treated on neoadjuvant cooperative osteosarcoma study group protocols. *J. Clin. Oncol.*, 20, 776-90.

Bielack, S., Kempf- Bielack, B., Schwenzer, D., Birkfellner, T., Delling, G., Ewerbeck, V., Exner, G. U., Fuchs, N., Gobel, U., Graf, N., Heise, U., Helmke, K., von Hochstetter, A.R., Jurgens, H., Maas, R., Munchow, N., Salzer- Kutschik, M., Treuner, J., Veltmann, U., Werner, M., Winkelmann, W., Zoubeck, A., Klotz, R. (1999). Neoadjuvant therapy for localized osteosarcoma of extremities. Results from the Cooperative osteosarcoma study group COSS of 925 patients. *Klin. Padiatr.*, 211, 260-70.

Bielack, S., Zoubek, A., Kotz, R. (2006). Osteosarkom. In H.J. Schmoll, K. Höffken, K. Possinger (Eds.), *Kompendium internistische Onkologie: Standards in Diagnostik und Therapie* (pp. 6314-6323). Berlin, Heidelberg, New York, Barcelona, Hongkong, London, Mailand, Paris, Tokio: Springer.

Bieling, P., Rehan, N., Winkler, P., Helmke, K., Maas, R., Fuchs, N., Bielack, S., Heise, U., Jurgens, H., Treuner, J., Romanowski, R., Exner, U., Kotz, R., Winkler, K. (1996). Tumor size and prognosis in aggressively treated osteosarcoma. *J. Clin. Onkol.*, 14, 848-58.

Billadeau, D. D., Upshaw, J. L., Schoon, R. A., Dick, C. J., Leibson, P. J. (2003). NKG2D-DAP10 triggers human NK cell- mediated killing via a Syk-independent regulatory pathway. *Nat. Immunol.*, 4(6), 557-564.

Billingsley, K.G., Burt, M.E., Jara, E., Ginsberg, R.J., Woodruff, J.M., Leung, D.H., Brennan, M.F. (1999). Pulmonary metastases from soft tissue sarcoma: analysis of pattern of diseases and post metastases survival. *Ann. Surg.*, 229, 602-10.

Biron, C. A., Brossay, L. (2001). NK cells and NKT cells in innate defense against viral infections. *Curr. Opin. Immunol.*, 13(4), 458-64.

Blattman, J. N., Greenberg, P.D. (2004). Cancer immunotherapy; treatment fort he masses. *Science*, 305(5681), 200-205.

Blohm, U., Roth, E., Brommer, K. Dumrese, T., Rosenthal, F.M., Pircher, H. (2002). Lack of effector cell function and altered tetramer binding of tumor-infiltrating lymphocytes. *J. Immunol.*, 169, 5522-30.

Bodmer, W. F., Browning, M. J., Krausa, P., Rowan, A., Bicknell, D.C., Bodmer, J. G.: Tumor escape from immune response by variation in HLA expression and other mechanisms. (1993). *Ann. NY Acad. Sci.*, 690, 42-49.

Bonaccorsi, I., Cantoni, C., Carrega, P., Oliveri, D., Lui, G. Conte, R., Navarra, M., Cavaliere, R., Traggiai, E., Gattorno, M., Martini, A., Mingari, M. A., Moretta, A., Ferlazzo, G. (2010). The immun inhibiting receptor LAIR- 1 is highly expressed by plasmacytoid dendritic cells and acts complementary with NKp44 to control IFNalpha production. *PLoS One*, 5(11), 15080.

Bonneville, M., O'Brien R. L. , Born W. K. (2010). Gammadelta T cell effector functions: a blend of innate programming and acquired plasticity *Nat. Rev. Immunol.*, 10, 467-478.

Boon, T., Cerottini, J.C., Van den Eynde, B., van der Bruggen, P., van Pel, A. (1994). Tumor antigens recognized by T lymphocytes. *Annu. Rev. Immunol.*, 12, 337-65.

Breitenseher, M., Dominkus, M., Amann, G. (2008)
Bildgebende Diagnostik und Therapie der Weichteiltumoren: mit pathologischer Klassifikation, Nuklearmedizin, interventinoeller Therapie, 1. Auflage. 82-84. Stuttgart: Thieme.

Breusch, St.; Clarius, M.; Mau, H.; Sabo, D. (2009). *Klinikleitfaden Orthopädie und Unfallchirurgie*. 6. Auflage. 575. München: Urban und Fischer

Brostoff, S. Scadding, G. K., Male, D., Roitt, I. M. (1993). *Klinische Immunologie*. Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft GmbH.

Bruna, M.J.L., Luistro, R.R., Warriar, B.R., Wright, B.R., Hubbard, B.R., Murphy, M., Wolf, S.T.F., Gately, M.K. (1993). Antitumor and antimetastatic activity of Interleukin 12 against murine tumors. *J. Exp. Med.*, 178, 1223-1230.

Brutkiewicz, R. R. und Sriram, V. (2002). Natural killer T (NKT) cells and their role in antitumor immunity. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 4, 287-98.

Bruns, J., Elbracht, M., Niggemeyer, O. (2001). Chondrosarcoma of bone. An oncological and functional follow- up study. *Annals of Oncology*, 12, 859-864.

Buckup, K. (2001). *Kinderorthopädie 72 Tabellen*. Edition 2, neubearbeitete und erweiterte Auflage. Stuttgart, New York: Thieme.

Böcker, W., Denk, H., Heitz, Ph. U. (1997). *Pathologie* (pp 907-908). München-Jena: Elsevier/ Urban& Schwarzenberg.

Campanacci, M. (1986). *Bone and soft tissue tumors* (pp 1039-1041). New York: Springer.

Cerwenka, A., Baron, J.L., Lanier, L.L. (2001). Ectopic expression of retinoic acid early inducible-1 gene (RAE-1) permits natural killer cell-mediated rejection of a MHC class I-bearing tumor in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 98(20), 11521-6.

Ciocca, D.R., Clark, G.M., Tandon, A.K., Fuqua, S.A., Welch, W.J., McGuire, W.L.(1993). Heat shock protein hsp70 in patients with axillary lymph node- negative breast cancer: Prognostics implications. *J Natl. Cancer Inst.*, 85, 570-574.

Claus, M., Greil, J., Watzl, C. (2008). Comprehensive analysis of NK cell function in whole blood samples. *Journal of Immunology Methods*, 342, 1(2), 154-164.

Clemente, C.G., Mihm, Jr M.C., Bufalino, R., Zurrida, S., Collini, P., Cascinelli, N. (1996). Prognostic value of tumor infiltrating lymphocytes in the vertical growth phase of primary cutaneous melanoma. *Cancer*, 77,1303–1310.

Coca, S, Perez-Piqueras J, Martinez D, Colmenarejo A, Saez M.A., Vallejo C, Martos, J.A., Moreno, M. (1997). The prognostic significance of intratumoral natural killer cells in patients with colorectal carcinoma. *Cancer*, 79, 2320-2328.

Collins, E.J., Frelinger, J. A. (1998). Altered peptide ligand design: altering immune responses to class I MHC/ peptid complexes. *Immunol. Rev.*, 16, 151-160.

Colucci, F., Caligiuri, M. A., Di Santo, J. P. (2003). What does it take to make a natural killer? *Nat. Rev. Immunol.*, 3(5), 413- 25.

Comans-Bitter, W.M., de Groot, R., van den Beemd, R., Neijens, H.J., Hop, W.C., Groeneveld, K., Hooijkaas, H., van Dongen, J.J. (1997). Immunophenotyping of blood lymphocytes in childhood. Reference values for lymphocyte subpopulations. *J. Pediatr.* 130(3), 388-93.

Cooper, M. A., Fehniger, T. A., Caligiuri, M. A. (2001). "The biology of human natural killer-cell subsets" *Trends . Immunol.*, 22(11), 633- 40.

Costello, R. T., Sivori, S., Marcenaro, E., Lafage-Pochitaloff, M., Mozziconacci, M.-J., Reviron, D., Gastaut, J.-A., Pende, D., Olive, D., Moretta, A. (2002). Defective expression and function of natural killer cell- triggering receptors in patients with acute myeloid leukaemia. *Blood*, 99(10), 3661- 3667.

Csermely, P. (2001). A nonconventional role of molecular chaperones: Involvement in the cytoarchitecture. *News Physiol. Sci.*, 16,123-126.

Dahlberg C.I.M., Sarhan D., Chrobok M., Adil, D., Evren, A. (2015). Natural Killer Cell-Based Therapies Targeting Cancer: Possible Strategies to Gain and Sustain Anti-Tumor Activity. *Frontiers. Immunology*.6, 605.

Demas, B.E., Heelan, R.T., Lane, J., Marcore, R., Hajdu, S., Brennan, M.F. (1998). Soft-tissue sarcomas of the extremities: comparison of MR and CT in determining the extent of disease, *AJR Am. J. Roentgenol.*, 150, 615-20.

Dawson, E. K. (1955). Liposarcoma of bone. *J. Pathol.*, 7, 513.

De Maio, A. (2011). Extracellular heat shock proteins, cellular export vesicles, and the Stress Observation System: A form of communication during injury, infection, and cell damage. *Cell Stress Chaperones*, 16, 235-49.

De Maria, A., Fogli, M., Costa, P., Murdaca, G., Puppo, F., Mavillo, D., Moretta, A., Moretta, L. (2003). The impaired NK cells cytolytic function in viremic HIV-1 infection is associated with a reduced surface expression of natural cytotoxicity receptors (NKp46NKp30, NKp44) *Eur. J. Immunol.*, 33(9), 2410-8.

Diefenbach, A., Tomasello, E., Lucas, M., Jamieson, A. M., Hsia, J. K., Vivier, E., Raulet, D. H. (2002). Selective associations with signaling proteins determine stimulatory versus costimulatory activity of NKG2D. *Nat. Immunol.*, 3, 1142.

Di Santo, J. P., Vosshenrich, C. A. (2006). Bone marrow versus thymic pathways of natural killer cell development. *Immunol. Rev.*, 214, 35-46.

Dobrovina, E. S., Dobrovin, M. M., Vider, E., Sission, R. B., O'Reilly, R. J., Dupont, B., Vyas, Y. (2003). Evasion from NK Cell Immunity by MHCClass I Chain-Related Molecules Expressing Colon Adenocarcinoma. *J. Immunol.*, 171, 6891-6899.

Einarsdottir, H., Soderlund, V., Larson, O., Jenner, G. and Bauer, H. (1999). MR imaging of lipoma and liposarcoma. *Acta. Radiol.*, 40, 64-8.

Elboim, M., Gazit, R., Gur, C., Ghadially, H., Gili Betser-Cohen, G., Mandelboim, O. (2010). Tumor immunoediting by NKp46. *J. Immunol.*, 148(10), 5637- 44.

Elgaard, L., and Helenius, A. (2003). Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 4, 181-191.

Elmslie, R. E., Dow, S. W. (1997). Genetic immunotherapy for cancer *Semin. Vet. Med. Surg. (Small Anim)*, 12, 193- 205.

Evans, H.L., Ayala, A.G., Romsdahl, M.M. (1977). Prognostic factors in chondrosarcoma of bone: a clinicopathologic analysis with emphasis on histologic grading. *Cancer*, 40(2), 818-3.

Falk, C. S., Mach, M., Schendel, D.J., Weiss, E. H., Hilgert, I., Hahn, G. (2002). NK- cell activity during human cytomegalovirus infection is dominated by US2- 11- mediated HLA class I down- regulation. *J. Immunol.*, 169(6), 3257-3266.

Faulkner, L., Buchan, G., Baird, M. (2000). Interleukin- 10 does not affect phagocytosis of particulate antigen by bone marrow- derived dendritic cells but does impair antigen presentation. *Immunol.*, (99)4, 523-31.

Ferlazzo, G., Thomas, D., Lin, S. L., Goodman, K., Morandi, B., Muller, W. A., Moretta, A., Muünz, C. (2004). The Abundant NK Cells in Human Secondary Lymphoid Tissues Require Activation to Express Killer Cell Ig- Like Receptors and Become Cytolytic 1 *J. Immunol.*, 172, 1455-62.

Fletcher, C.D.M., Unni, K.K., Mertens, H. (Hrsg) (2002). *WHO classification of soft tissue Pathology & Genetics: Tumors of Soft Tissue and Bone*, 2. Auflage, 9-224. Lyon: IARC Press.

Fletcher, C.D.M, Unni, K. K., Mertens, F. (Hrsg.), (2002). *World Health Organization Classification of Tumors Pathology and Genetics, Tumors of soft Tissue and Bones*. 2. Auflage, 12-18, Lyon: IARC Press.

Fong, Y., Coit, D.G., Woodruff, J. M., Brennan, M.F. (1993). Lymph node metastasis from soft tissue sarcoma in adults. Analysis of data from a prospective database of 1772 sarcoma patients. *Ann. Surg.*, 217, 72-7.

Freyschmidt, J., Ostertag, H., Jundt, G. (2010). Konchentumore: *Klinik- Radiologie-Pathologie*, 3. Auflage, 377. Berlin, Heidelberg, New York, Barcelona, Hongkong, London, Mailand, Paris, Tokio: Springer

Freyschmidt, J., Ostertag, H., Jundt, G.; Schumacher, K. (2000). *Therapie maligner Tumoren, Integration konventioneller und komplementärer Therapie, Manual für Klinik und Praxis*. Stuttgart: Schattauer

Gabrilovich, D. (2004). Mechanisms and functional significance of tumour-induced dendritic-cell defects. *Nat. Rev. Immunol.*, 4(12), 941-52.

Garrido, F., Cabrera, T., Concha, A., Glew, S., Ruiz-Cabello, F., Stern, P. L. (1993). Natural history of HLA expression during tumour development. *Immunol. Today*, 13, 491-499.

Geer, R.J., Woodruff,J., Casper, E.S. and Brennan, M.F. (1992). Management of small soft-tissue sarcoma of the extremity in adults. *Arch. Surg.*, 127, 1285-9.

Goldmann, R. L. (1964). Primary liposarcoma of bone. Report of a case. *Am. J. Clin. Pathol.*, 42, 503.

Goldblum, J. R., Folpe, A. L., Weiss, S.W. (1998). Enzinger and Weiss's Soft Tissue Tumors. Philadelphia: Elsevier/Saunders

Gräfe, K. H., Lutz, W., Bönisch, H., (2011). *Duale Reihe, Pharmakologie und Toxikologie* (pp 660-661). Stuttgart: Gräfe Thieme.

Grabias, S., Mankin, H.J. (1974). Chondrosarcoma arising in histologically proved unicameral bone cyst. A case report. *J. Bone Joint Surg. Am.*, 56, 1501-1509.

Greene, F. L., Page, D. L., Fleming, I. D., Fritz, A., Balch, C. M., Haller, D. G. (2002). *AJCC Cancer Staging Handbook from the AJCC Cancer Staging Manual*. New York: Springer.

Gunther, E., Walter, L. (1994). Genetic aspects of the hsp70 multigene family in vertebrates. *Experientia*, 50, 987-1001.

Häusler, Sebastian (2011). Gynäkologische Onkologie, Krebszellen entkommen dem Immunsystem; Tumor- Immune- Escape- Mechanismen bei gynäkologischen Tumoren begünstigen die Ausbreitung von Krebszellen. Die immunologischen Antworten auf maligne Läsionen sind ebenso vielfältig, viele Akteure des Immunsystems bekämpfen die List der Tumorzellen. *ÄP Gynäkologie* 2, 22-27.

Hahne, M., Rimoldi, D., Schroter, M., Romero, P., Schreier, M., French, L.E., Schneider, P., Bornand, T., Fontana, A., Lienard, D., Cerottini, J., Tschopp, J. (1996). Melanoma cell expression of Fas (Apo-1/CD95) ligand: implications for tumor immune escape. *Science*, 274, 1363-6.

Hamerman, J. A., Ogasawara, K., Lanier, L. L. (2005). NK cells in innate immunity *Curr Opin Immunol.*, 17(1), 29-35.

Hanke, T., Takizawa, H., Raulet, D. H. (2001). MHC- dependent shaping of the inhibitory Ly49 receptor repertoire on NK cells: evidence for a regulated sequential model *Eur. J. Immunol.*, 31(11), 3370-9.

Hanson, H.L., Donermeyer D.L., Ikeda H., White, J.M., Shankaran, V., Old, L. J., Shiku, H., Schreiber, R.D., Allen, P.M. (2000). Eradication of established tumors by CD8+ T cell adoptive immunotherapy. *Immunity*. 13, 265-76.

Hart, D.N. (1997). Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response. *Blood*, 90(9), 3245-87.

Hayakawa, Y., Smyth, M. J. (2006). NKG2D and cytotoxic effector function in tumor immune surveillance. *Semin. Immunol.*, 18(3), 176-185.

Heberman, R. B., Nunn, M. E., Lvrvin, D. H. (1975). Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic acid allogeneic tumors. I. Distribution of reactivity and specificity. *Int. J. Cancer*, 16(2), 216-29.

Heiss, M. M., Lamerz, R., Lersch, C., Schlimok, G., Weber, B. (2001), (58-63). *Tumorimmunologie und Tumorendokrinologie, Manual Gastrointestinale Tumoren*. München: Urban und Fischer.

Hofmann, M., Schilling, T., Heilmann, P., Haisken, O., Wüster, C., Brandi, M., Ziegler, R., Nawroth, P. (1998). Multiple endocrine Neoplasie assoziiert mit multiplen Lipomen. *Med. Klin.*, 93, 546-49.

Hori, S., Nomura, T., Sakaguchi, S. (2003). Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science*, 299(5609), 1057-1061.

Huvos, A.G., Higinbotham, N.L., Miller, T.R. (1972). Bone sarcomas arising in fibrous dysplasia. *J. Bone Joint Surg. Am.*, 54, 1047-1056.

Hyakudomi, M., Matsubara, T., Hyakudomi, R., Yamamoto, T., Kinugasa, S., Yamanoi, A., Maruyama, R., Tanaka, T. (2008). Increased expression of fractalkine is correlated with a better prognosis and an increased number of both CD8+ T cells and natural killer cells in gastric adenocarcinoma. *Ann.Surg. Oncol.*, 15, 1775-1782.

Imai, K., Matsuyama, S., Miyake, S., Suga, K., Nakachi, K. (2000). Natural cytotoxic activity of peripheral-blood lymphocytes and cancer incidence: an 11-year follow-up study of a general population. *Lancet*, 356, 1795–1799.

Imai, N., Ikeda, H., Tawara, I., Shiku, H. (2009). Tumor progression inhibits the induction of multifunctionality in adoptively transferred tumor-specific CD8+ T cells. *Eur. J. Immunol.*, 39,241-53.

Ishigami, S., Natsugoe, S., Tokuda, K., Nakajo, A., Che, X., Iwashige, H., Aridome, K., Hokita, S., Aikou, T. (2000). Prognostic value of intratumoral natural killer cells in gastric carcinoma. *Cancer*, 88(3), 577- 83.

Ishigami, S., Natsugoe, S., Tokuda, K., Nakajo, A., Che, X., Iwashige, H., Aridome, K., Hokita, S., Aikou, T. (2000). Prognostic value of intratumoral natural killer cells in gastric carcinoma. *Cancer*, 88, 577-583.

Issels, R. D., Schlemmer, M. (1998). Current trials and new aspects in soft tissue sarcoma of adults. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 49(1), 4-8.

Jacobs, R., Pawlak, C.R., Mikeska, E., Meyer-Olson, D., Martin, M., Heijnen, C.J., Schedlowski, M., Schmidt, R.E. (2001). Systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis patients differ from healthy controls in their cytokine pattern after stress exposure. *Rheumatology (Oxford)*, 40(134), 868-875.

Jager, E., Ringhoffer, M., Altmannsberger, M., Arand, M., Karbach, J., Jager, D., Oesch, F., Knuth, A. (1997). Immunoselection in vivo: independent loss of MHC class I and melanocyte differentiation antigen expression in metastatic melanoma. *Int. J. Cancer*, 71, 142-7.

Janeway, C., Travers, P. (Hrsg.). (1997). Immunologie. 2. deutsche Auflage. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg

Karre, K. (2002). NK Cells, MHC Class I Molecules and the Missing Self *Scandinavian Journal of Immunology. Blackwell Publishing*, 55(3), 221–228.

Karre, K. (1995). Express yourself or die: peptides, MHC molecules and NK cells. *Science*, 267, 978-9.

Kelly, J. M.; Darcy, P. K.; Markby, J. L.; Godfrey, D. I.; Takeda, K.; Yagita, H. und Smyth, M. J. (2002). Induction of tumor-specific T cell memory by NK cell-mediated tumor rejection. *Nat. Immunol.*, 3, 83-90.

Khurana, J. J., Abdul-Karim F, Bovée J.V.M.G. (2002). Osteochondroma. World Health Organization classification of tumours. In: Fletcher CDM, Unni K.K., Mertens, F. (234-6). *Pathology and genetics of tumours of soft tissue and bone*. Lyon: IARC Press.

Kiesslin, R., Klein, E., Pross, H., Wigzell, H. (1975). Natural killer cells in the mouse. II. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Characteristics of the the killer cell. *Eur. J. Immunol.*, 5(2), 117-21.

Klaus, G.G. (1978). The generation of memory cells. II. Generation of B- memory cells with preformed antigen- antibody complexes. *Immunology*, 34(4), 643-52.

Klein, J., (1991). Immunologie. Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft mbH

Köhler, T., Ziegler, J., Hanisch, U., Thielemann, F., Baretton, G. and Günther, K.-P. Midterm. (2003). Results After Treatment of liposarcoma in the Extremities. *Z. Orthop.*, 141, 684-689.

Korholz, D., Verheyen, J., Kemperdick, H.F., Gobel, U. (1998). Evaluation of follow- up investigations in osteosarcoma patients: suggestions for an effective follow- up program. *Med. Pediatr. Oncol.*, 30, 52-8.

Korten, S., Wilk, E., Gessner, J. E., Meyer, D., Schmidt, R. E. (1999). Altered donor and recipient Ly 49+ NK cell subsets in allogeneic H- 2d → H- 2b and H 2b → H 2d bone marrow chimeras. *J. Immunol.*, 163(11), 5896- 905.

Krause, S.W., Gastpar, R., Andreesen, R., Gross, C., Ullrich, H., Thonigs,G., Pfister, K., Multhoff, G. (2004). Treatment of colon and lung cancer patients with ex vivo heat shock protein 70-activated, autologous natural killer cells: aclinical phase I trial. *Clin. Cancer Res.*, 10, 3699-707.

Krämer, J. (1998). Tumoren und tumorähnliche Erkrankungen im Knochen. *Orthopädie*, (153- 178), Berlin Heidelberg New York: Springer.

Kurosawa, S., Matsuzaki, G., Harada, M., Ando, T., Nomoto, K. (1993). Early appearance and activation of natural killer cells in tumor-infiltrating lymphoid cells during tumor development. *Eur. J. Immunol.*, 23(5), 1029-1033.

Lanier, L. L., Coliss, B. C., Wu, J., Leong, C., Philipps, J. H. (1998). Immunreceptor DAP12 bearing a tyrosine- based activation motif is involved in activating NK cells. *Nature*, 391(6668), 703-7.

Lanier, L. L.; Spits, H. und Phillips, J. H. (1992). *The developmental relationship between NK cells and T cells.* *Immunol. Today*, 13, 392-5.

Lanier, L. L. (2003). Natural killer cell receptor signaling
Curr. Opin. Immunol., 15(3), 308-14.

Lanier, L. L. (2001). On guard- activating NK cell receptors. *Nat. Immunol.*, 2(1), 23-7.

Leen, A.M., Rooney, C.M., Foster, A.E. (2007). Improving T cell therapy for cancer. *Annu. Rev. Immunol.*, 25, 243-65.

Lehnerer, S. (2012). Hsp70-Membranexpression auf Sarkomen. (Dissertation). Technische Universität München.

Lemmon, S.K. (2001). Clathrin uncoating: Auxilin comes to life. *Curr. Biol.*, 11, 49-52.

Levy, S. M., Herbermann, R. B., Lee, J., Whiteside, T., Mc Feeley, S., Kirkwood, J. (1990). Estrogen receptor concentration and social factors as predictors of natural killer cell activity in early- stage breast cancer patients". Confirmation of a model- *Nat. Immunol. Cell Growth Regul.*, 9, 313- 324.

Levy, S. M., Herbermann, R. B., Lippman, M., D'Angelo, T., Lee, J. (1991). Immunological and psychosocial predictors of diseases recurrences in patients with early- stage breast cancer *Behav. Med.*, 17, 67-75.

Lindquist, S., Craig, E.A. (1988). The heat-shock proteins. *Annu. Rev. Genet.*, 22, 631-677.

Linehan, D. C., Lewis, J. J., Leung, D., Brennan, M. F. (2000). Influence of biologic factors and anatomic site in completely resected liposarcoma. *J. Clin. Oncol.*, 18, 1637- 43.

Ljunggren, H. G., Karre, K. (1990). In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today*, 11, 237-44.

Luo, D.; Vermijlen, D.; Vanderkerken, K.; Kuppen, P. J.; Seynaeve, C.; Eddouks, M.; Baekeland, M. und Wisse, E. (1999). Involvement of LFA-1 in hepatic NK cell (pit cell)-mediated cytotoxicity and apoptosis of colon carcinoma cells. *J. Hepatol.*, 31,110-116.

Machens, H. G., Brenner, P., Wienbergen, H., Pallua, N., Mailander, P., Berger, A. (1997). Enchondroma of the hand. Clinical evaluation study of diagnosis, surgery and functional outcome. *Unfallchirurg*, 100, 711-14.

Maehara, Y., Oki, E., Abe, T., Tokunaga, E., Shibahara, K., Kakeji, Y. Sugimachi, K. (2000). Overexpression of heat shock protein hsp70 family and p53 protein and prognosis for patients with gastric cancer. *Oncology*, 58, 144-151.

Maenpaa, A.; Jaaskelainen, J.; Carpen, O.; Patarroyo, M. und Timonen, T. (1993). Expression of integrins and other adhesion molecules on NK cells; impact of IL-2 on short- and long-term cultures. *Int. J. Cancer*, 53, 850-5.

Martin, M.P., Nelson, G., Lee J., Pellett, F., Gao, X., Wade, J., Wilson, M.J., Trowsdale, J., Gladman, D., Carrington, M. (2002). Cutting edge: susceptibility to psoriatic arthritis: influence of activating killer Ig-like receptor genes in the absence of specific HLA-C alleles. *J. Immunol.*, 169, 2818-2822.

Mathew, A. und Morimoto R.I. (1998). Role of the heat-shock response in the life and death of proteins. *Ann. N Y Acad. Sci.*, 851, 99-111.

Melero, I., Bach, N., Chen, L. (1997). Costimulation, tolerance and ignorance of 136 cytolytic T-lymphocytes in immune responses to tumor antigens. *Life Sci.*, 60, 2035-2041.

Menorét, A., Chandawarkar, R.Y., Srivastava, P.K. (2000). Natural autoantibodies against heat-shock proteins hsp70 and gp96: implications for immunotherapy using heat-shock proteins. *Immunology*, 101, 364-70.

Mettler, F. A. (2005). *Klinische Radiologie Basiswissen für alle Fachgebiete*. 2. Auflage. 319-321. München: Elsevier, Urban& Fischer

Meyers, P. A. (2005). Osteosarcoma: a randomized , prospective trial of the addition of ifosfamide and/ or muramly tripeptide to cisplatin, doxorubicin and high- dose methothrexate. *J. Clin. Oncol.*, 23(9), 2004-11.

Meyers, P. A. (2008). Osteosarcoma: the addition of muramly tripeptide to chemotherapy improves overall survival—a report from the Children’s Oncology Group. *J. Clin. Oncol.*, 26, 633-38.

Michilis, A., Redivo, M., Zegers de Beyl, V., de Maertelaer, V., Jacobovitz, D., Rocmans, P., Duchateau, J. (2001). Increased expression of high but not low molecular weight heat shock proteins in resectable lung carcinoma. *Lung Cancer*, 33, 59-67.

Mirra, J. M., Picci, P., Gold, R.H. (1989). *Bone tumors clinical, radiologic, and pathologic correlations*. Philadelphia: Lea&Febiger.

Mocikat, R., Braumuller, H., Gumy, A., Egeter, O., Ziegler, H., Reusch, U., Bubeck, A., Louis, J., Mailhammer, R., Riethmuller, G., Koszinowski, U., Rocken, M. (2003). *Natural killer cells activated by MHC class I(low) targets prime dendritic cells to induce protective CD8 T cell responses*. *Immunity.*, 19(4), 561-569.

Montovani, A., Romero, P., Palucka, A. K., Marincola, F. M. (2008). Tumor immunity: effector response to tumour and role of the microenvironment . *Lancet*, 371, 771-83.

Moor, K.W., O’Garra, A., de Waalf Malefyt, R., Vieira, P., Mosmann, T. R. (1993). *Interleukin- 10*. *Annu. Rev. Immunol.*, 11,165- 190.

Moretta, L., Mingari, M. C., Pende, D., Bottino, C., Biassoni, R., Moretta, A. (1996). The molecular basis of natural killer (NK) cell recognition and function. *J. Clin. Immunol.*, 16(5), 243-53.

Moretta, A., Biassoni, R., Bottino, C., Mingari, M. C., Moretta, L. (2000). Natural cytotoxicity receptors that trigger human NK- cell- mediated cytotoxicity. *Immunol. Today*, 21(5), 228-34.

Moretta, L., Bottino, C., Pende, D., Mingari, M.C., Biassoni, R., Moretta, A. (2002). Human natural killer cells: their origin, receptors and function. *Eur. J. Immunol.*, 32(5),1205-1211.

Morimoto, R. I., Tissieres, A., Georgopoulos, C. (1994). *Progress and Perspectives on the Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones. The Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones.* (1-36). Cold Spring: Harbor Laboratory Press.

Multhoff, G., Botzler, C., Wiesnet, M., Eissner, G., Issels, R. (1995). CD3- large granular lymphocytes recognize a heat- inducible immunogenic determinant associated with the 72-kD heat shock protein on human sarcoma cells. *Blood*, 86(4), 1374-1382.

Multhoff, G., Botzler, C., Wiesnet, M., Muller, Meier,T., Wilmanns, W., Issels, R. D. (1995). A stress-inducible 72-kDa heat-shock protein (HSP72) is expressed on the surface of human tumor cells, but not on normal cells. *Int. J. Cancer*, 61(2), 272-9.

Multhoff, G., Pfister, K., Botzler, C., Jordan, A., Scholz, R., Schmetzer, H., Burgstahler, R., Hiddemann, W. (2000). Adoptive transfer of human natural killer cells in mice with severe combined immunodeficiency inhibits growth of Hsp70-expressing tumors. *Int. J. Cancer.*, 88, 791-7.

Multhoff, G., Botzler, C., Jennen, L., Schmidt, J., Ellwart, J., Issels, R. (1997). Heatshock protein 72 on tumor cells: a recognition structure for natural killer cells. *J. Immunol.*, 158, 4341-50.

Multhoff, G., Pfister, K., Gehrman, M. Hantschel, M., Gross, C., Hafner, M.,Hiddemann, W. (2001). A 14-mer Hsp70 peptide stimulates natural killer (NK) cell activity. *Cell Stress Chaperones*, 6, 337-44.

Murgia, C., Pritchard, J. K., Kim, S. Y., Fassati, A., Weiss, R. A. (2006). Clonal origin and evolution of a transmissible cancer. *Cell*, 126, 477- 487.

Nebe-von-Caron, G., Stephens P.J., Hewitt C.J., Powell J.R., Badley R.A. (2000). Analysis of bacterial function by multi-colour fluorescence flow cytometry and single cell sorting. *Journal of Microbiological Methods*, 42,97-114.

Nakano, O., Sato, M., Naito, Y., Suzuki, K., Orikasa, S., Aizawa, M., Suzuki, Y., Shintaku, I., Nagura, H., Ohtani, H. (2001). Proliferative activity of intratumoral CD8(+) T-lymphocytes as a prognostic factor in human renal cell carcinoma: clinicopathologicdemonstration of antitumor immunity. *Cancer Res.*, 61(13), 5132-5136.

Ogihara, Y., Takeda, K., Yanagawa, T., Hirasawa, Y. (1994). Spontaneous regression of lung metastases from osteosarcoma. *Cancer*, 74, 2798-803.

Orange, J.S., Ballas Z.K. (2006). Natural killer cells in human health and disease. *Clin. Immunol.*, 118, 1-10.

O'Sullivan, B., Ward, I., Catton, C. (2003). Recent advances in radiotherapy for soft-tissue sarcoma. *Curr. Oncol. Rep.*, 5, 274-81.

o.V. (ohne Verfasser)

8th International Workshop and Conference on Human Leukocyte Differentiation Antigens [HLDA8], Adelaide, 2004.

o.V. (ohne Verfasser)

Ribosepharm division

NHL Info. (<http://www.nhl-info.de/exec/start?site=/infopool/283.htm&check=0>)

Stand: 01.08.2016

Page, D. L., Fleming, I. D., Fritz, A., Balch, C. M., Haller, D.G. (Hrsg.) (2010).

AJCC Cancer Staging Handbook from the AJCC Cancer Staging Manual.

Seventh Edition. New York: Springer Verlag.

Parmiani, G. (2005). Tumor-infiltrating T cells--friend or foe of neoplastic cells?

N. Engl. J. Med., 353, 2640-1.

Pechhold, K., Pohl, T., Kabelitz, D. (1994). Rapid quantification of lymphocyte subsets in heterogeneous cell populations by flow cytometry. *Cytometry*, 16, 152-159.

Pende, D., Parolini, S., Pessiono, A., Sivori, S., Augugliaro, R., Morelli, L., Marcenaro, E., Accame, L., Malaspina, A., Biassoni, R., Bottino, C., Moretta, L., Moretta, A. (1999). Identification and molecular characterization of NKp30, a novel triggering receptor involved in natural cytotoxicity mediated by human natural killer cells. *J. Exp. Med.*, 190(10), 1505-1516.

Perni, E. (2010). Verhalten von verschiedenen Lymphozytenpopulationen und Lymphozytenrezeptoren bei hämatologischen Neoplasien und soliden Tumoren. Untersuchungen in vivo. (Dissertation). Maximilians-Universität zu Würzburg.

Peter, H. H. (2000). Erworbene Immundefekte. In: Thomas L (Hrsg.). 751-759. *Labor und Diagnose*. Frankfurt/Main: TH- Books Verlagsgesellschaft.

Picci, P., Sangiorgi, L., Rougraff, B.T., Neff, J.R., Casadei, R., Campanacci, M. (1994). Relationship of chemotherapy-induced necrosis and surgical margins to local recurrence in osteosarcoma. *J. Clin. Onkol.*, 12, 2699-705.

Price, C.H., Goldie, W. (1969). Paget's sarcoma of bone. A study of eighty cases from the Bristol and the Leeds bone tumour registries. *J. Bone Joint Surg. Br.*, 51, 205-224.

Prinz, P. U., Mendler, A. N., I., Masouris, I. L., Durner, L., Oberneder, R.,

Noessner E. (2012). High DGK-alpha and Disabled MAPK Pathways Cause Dysfunction of Human Tumor-Infiltrating CD8+ T Cells That Is Reversible by Pharmacologic Intervention. *J. Immunol.* 188, 5990-6000.

Pritchard, D.J., Lunke, R.J., Taylor, W.F., Dahlin, D.C., Medley, B.E. (1980). Chondrosarcoma: a clinicopathologic and statistical analysis. *Cancer*, 45(1), 149-57.

Ragan, J., Bickel, W. and Broders, A. (1946). Infiltrating benign lipomas of the extremities. *West J. Surg.*, 54, 87.

Raulet, D. H., Vance, R. E. Mc Mahon, C. W. (2001). Regulation of the natural killer cell receptor repertoire. *Annu. Rev. Immunol.*, 291- 330.

Raulet, D.H. (2003). Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands. *Nat. Rev. Immunol.*, 3(10), 781-790.

Raulet, D. H. and R. E. Vance (2006). Self-tolerance of natural killer cells. *Nat Rev Immunol.*, 6, 520–31.

Reitan, J.B., Kaalhus, O., Brennhovd, I.O., Sager, E.M., Stenwig, A. E., Talle, K. (2002). Prognostic factors in liposarcoma. *Cancer*, 55, 2482-90.

Rivoltini, L., Barracchini, K.C., Viggiano, V., Kawakami, Y., Smith, A., Mixon, A., Restifo, N. P., Topalian, S. L., Simonis, T. B., Rosenberg, S.A. (1997). Quantitative correlation between HLA class I expression and recognition of melanoma cells by antigen-specific cytotoxic T lymphocytes. *Cancer Res.*, 55(14), 149-157.

Rivoltini, L., Arienti, F., Orazi, A., Cefalo, G., Gasparini, M., Gambacorti-Passerini, C., Fossati-Bellani, F, Parmiani, G. (1992). Phenotypic and functional analysis of lymphocytes infiltrating paediatric tumours, with a characterization of the tumour phenotype. *Cancer Immunol. Immunother.*, 34, 241-51.

Rodriguez- Galindo, C., Shah, N., McCarville, M.B., Billups, C.A., Neel, M.N., Rao, B.N., Daw, N.C. (2004). Outcome after local recurrence of osteosarcoma: the St. Jude Children's Research Hospital experience (1970- 2000) . *Cancer*, 100, 1928-35.

Rössler/ Rüter (1997). *Bösartige Tumoren des Skelettsystems* (pp 138-146). München: Elsevier, Urban & Schwarzenberg.

Roitt, I. M., Delves, P. J. (1992). *Encyclopedia of Immunology*. Duluth (USA): Academic press.

Rosenberg, S. A., Spiess, P., Lafreniere, R. (1986). A new approach of the adoptive immunotherapy of cancer with tumor-infiltrating lymphocytes. *Science*, 232(4770), 1318-1321.

Rosenberg, A. E. (2003). *Chondromas and Chondrosarcomas of the Skull Base and Spine*. G. R. Harsh (Ed.) (pp 3-7). Stuttgart/ New York: Thieme.

Rosenberg, S.A. (1996). The immunotherapy of solid cancers based on cloning the genes encoding tumor-rejection antigens. *Annu. Rev. Med.*, 47, 481-91.

Rozental, T.D., Khoury, L.D., Donthineni-Rao, R., Lackman, R.D. (2002). Atypical lipomatous masses of the extremities: outcome of surgical treatment. *Clin. Orthop.*, 203-11.

Ruiter, D. J., Mattijessen, V., Broecker, E. B., Ferrone, S. (1991). MHC antigens in human melanoms. *Semin Cancer Biol.*, 2, 35-45.

Ruiz-Cabello, F., Perez- Ayala, M., Gomez, O. (1991). Molecular analysis of MHC- class I alterations in human tumor cell lines. *Int. J. Cancer Suppl.*, 6, 123-130.

Sabate, J.M., Llauger, J., Torrubia, S., Amores, S., Franquet, T. (1998). Osteosarcoma of the abdominal wall with spontaneous regression of lung metastases. *AJR Am. J. Roentgenol*, 171, 691-2.

Sack, U., Rothe, G., Barlage, S. (2000). Durchflusszytometrie in der klinischen Diagnostik. Positionspapier der Arbeitsgruppe Durchflusszytometrie und Quantitative Mikroskopie der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie und Deutschen Gesellschaft für Laboratoriumsmedizin. *J. Lab. Med.*, 24, 277- 297.

Sack, U., Tárnok, A., Rothe, G. (2006). In: U. Sack, A. Tárnok, A., G. Rothe (Eds.). *Zelluläre Diagnostik: Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie* (p 919). Basel: Karger Verlag.

Sack, U., Tárnok, A., Rothe, G. (2006). In: U. Sack, A. Tárnok, A., G. Rothe (Eds.). *Zelluläre Diagnostik: Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie* (pp 323-324). Basel: Karger Verlag.

Saito, T., Tanaka, R., Yoshida, S., Washiyama, K., Kumanishi, T. (1998). Immunohistochemical analysis of tumor-infiltrating lymphocytes and major histocompatibility antigens in human gliomas and metastatic brain tumors. *Surg. Neurol.*, 29, 435-42.

Salam, G.A. (2002). Lipoma excision. *Am. Fam. Physican*, 65, 901-4.

Sanches- Correa, B., Morgado, S., Gayoso, I., Bergua, J.M., Casado, J.G., Arcos, M.J., Bengochea, M.L., Duran, E., Solana, R., Tarazona, R. (2011). Human NK cells in acute myeloid leukaemia patients: analysis of NK cell- activating receptors and their ligands. *Cancer Immunol. Immunother.*, 60(8), 1195- 205.

Sandberg, A.A., Bridge, J.A. (1995). *The Cytogenetic of Bone and Soft Tissue Tumors*. Austin, Texas, USA: Landes Company.

Schajowicz, F. (1994), 2. Auflage. *Tumors and tumorlike lesions of the bone*. Berlin, Heidelberg, New York: Springer- Verlag.

Schaser, K., Melcher, I, Luzzati, A., Disch, A. (2009). *Bone Sarcoma of the spine*. *Recent Results Cancer Res.*, 179, 141-67.

Schmid, D. (1998). Neue Ansätze in der Melanom- Therapie. *Via medici*, 4, 54- 56.

Schnider, C. I. L.,

Intraoperative Strahlentherapie mittels Flab-Bestrahlungstechnik bei der Behandlung von Weichteilsarkomen. Eine Analyse der Homburger Ergebnisse der Jahre 1995-2007.
<https://core.ac.uk/download/pdf/10700903.pdf>, Stand: 22.11.2020.

Schumacher, K. (2000). *Therapie maligner Tumoren: Integration konventioneller und komplementärer Therapie, Manual für Klinik und Praxis.* (Schumacher, K., Arnold, B., Reich, G., Sill, R. Stoll, G.). Stuttgart: Schattauer, F.K. Verlag.

Seliger, B., Cabrera, T., Garrido, F., Ferrone S. (2002). HLA class I antigen abnormalities and immune escape by malignant cells. *Semin Cancer Biol.*, 12, 3-13.

Sharma, S., Stolina, M., Yang, S.C., Baratelli, F., Lin, J.F., Atianzar, K., Luo ,J., Zhu, L., Lin, Y., Huang, M., Dohadwala, M., Batra, R.K., Dubinett, S.M. (2009). Tumor cyclooxygenase 2-dependent suppression of dendritic cell function. *Clin. Cancer Res.*, 9(3), 961-8.

Sivori, S., Pende, D., Bottino, C., Marcenaro, E., Pessino, A., Biassoni, R., Moretta, L., Moretta, A. (1999). NKp46 is the major triggering receptor involved in the natural cytotoxicity of fresh or cultured human NK cells. Correlation between surface density of NKp46 and natural cytotoxicity against autologous, allogeneic, or xenogeneic target cells . *Eur. J. Immunol.*, 29(5), 1656-1666.

Slovin, S.F., Lackman, R.D., Ferrone, S., Kiely, P.E., Mastrangelo, M.J. (1986). Cellular immune response to human sarcomas: cytotoxic T cell clones reactive with autologous sarcomas. I. Development, phenotype, and specificity. *J. Immunol.* 137, 3042-8.

Sluga, M., Windhager, R., Pfeiffer, M., Ofner, P., Lang, S., Dominkus, S., Nehrer, S., Zoubeck, A., Klotz, R. (2002). Osteosarcoma and Ewing´s sarcoma – The most frequent malignant bone tumor in children- therapy and outcome. *Z. Orthop., Ihre Grenzgeb*, 140, 652-5.

Sobin, L. H.; Wittekind, C. (2002). *UICC TNM classification of malignant tumors.* New York: Wiley- Liss.

Steinau, H., Homann, H., Drücke, D., Torres, A., Soimaru, D., Vogt, P. (2001). Resektionsmethodik und funktionelle Wiederherstellung bei Weichteilgewebssarkomen der Extremitäten. *Chirug.* 72, 501-513.

Steinman, R.M., Inaba,K. (1999). Myeloid dendritic cells. *J. Leukoc. Biol.*, 66(2), 205-8.

Takeda, K., Smyth, M. J., Cretney, E., Hayakawa, Y., Yamaguchi, N., Yagita, H., Okumura, K. (2001). Involvement of tumor necrosis factor- related apoptosis-inducing ligand in NK- cell mediated and IFN- gamma- dependent suppression of subcutaneous tumor growth. *Cell. Immunol.* 214, 194-200.

- Taub**, D. D.; Sayers, T. J.; Carter, C. R. und Ortaldo, J. R. (1995). *Alpha and beta chemokines induce NK cell migration and enhance NK-mediated cytotoxicity*. *J. Immunol.*, 155, 3877-88
- Terman**, B. S., K. (2011). VEGF and Tumor Angiogenesis. *Einstein Journal of Biology and Medicine*, 18, 59-66.
- Thomas**, C. (1996) . *Spezielle Pathologie*. Stuttgart, New York: Schattauer.
- Trauth**, B. C., Klas, C., Peters, A. M. J., Matzuku, S., Möller, P., Falk, W., Debatin, K. M., Krammer, P. H. (1989). Monoclonal antibody- mediated tumor regression by induction of apoptosis. *Science*, 245, 301- 305.
- Trinchieri**, G. (1989). Biology of natural killer cells. *Adv. Immunol.*, 47, 187-376.
- Tsukahara**, T., Kawaguchi, S., Torigoe, T., Asanuma, H., Nakazawa, E., Shimozaawa, K., Nabeta, Y., Kimura, S., Kaya, M., Nagoya, S., Wada, T., Yamashita, T., Sato, N. Prognostic significance of HLA class I expression in osteosarcoma defined by anti-pan HLA class I monoclonal antibody, EMR8-5. *Cancer Sci* 97 (2006) 1374-80.
- Wittekind**, C., Meyer, H.J., Bootz, F., (2010). Einleitung. In: TNM Klassifikation maligner Tumoren. Wittekind, C., Meyer, H.J. (Hrsg.), 7. Auflage, *TNM, Klassifikation maligner Tumore*. 141-46. Berlin, Heidelberg: Springer.
- van der Bruggen**, P., Traversari, C., Chomez, P. Lurquin, C., De Plaen, E., Van den Eynde, B., Knuth, A., Boon, T. (1991). A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science*, 254/ 1643-7.
- Villegas**, F.R., Coca, S., Villarrubia, V.G., Jiménez, R., Chillón, M.J., Jareño, J., Zuñiga, M., Callol, L. (2002). Prognostic significance of tumor infiltrating natural killer cells subset CD57 in patients with squamous cell lung cancer. *Lung Cancer*, 35, 23-28.
- Vitale**, M., Bottino, C., Sivori, S., Sanseverino, L., Castriconi, R., Marcenaro, E., Augugliaro, R., Moretta, L., Moretta, A. (1998). NKp44, a novel triggering surface molecule specifically expressed by activated natural killer cells, is involved in non- major histocompatibility complex- restricted tumor cell lysis . *J. Exp. Med.*, 187(12), 2065- 72.
- Vogt**, T., (2008) . Angiosarkom. *Hautarzt*, 59, 237-248.
- Vujanovic**, N. L.; Yasumura, S.; Hirabayashi, H.; Lin, W. C.; Watkins, S.; Herberman, R. B. und Whiteside, T. L. (1995). Antitumor activities of subsets of human IL-2-activated natural killer cells in solid tissues. *J. Immunol.*, 154, 281-9.
- Wahl**, S. M. (2007). Transforming growth factor- beta: innately bipolar. *Curr. opin. Immunol.*, 19, 55-62.

Weber, U., (1988) Knochentumoren. In H. Zilch, U. Weber (Eds.) Berlin, New York: de Gruyter Verlag.

Weber, U., Jager, R. (1979). Benign solitary enchondroma. *Arch. orthop. Trauma. Surg.*, 93, 133-140.

Weiss, S.W. (1998). Liposarcoma: an update. *Verh. Dtsch. Ges. Pathol.* 84, 67-74.

Weissler, J. C., Nicod, L. P., Toewes, G. B. (1987). Pulmonary natural killer cell activity is reduced in patients with bronchial carcinoma. *Am. Rev. Res. Dis.* 135, 1353-1357.

Winkelmann, W. (2005). Orthopädie und orthopädische Chirurgie. In: W. Wirth, C.J. Zichner, L. Winkelmann, (Eds.), *Tumoren und tumorähnliche Erkrankungen*. Stuttgart: Thieme

Winkler, K., Bielack, S. S., Delling, G., Jurgens, H., Klotz, R., Salzer- Kutschik, M. (1993) Treatment of osteosarcoma: experience of the Cooperative Osteosarcoma Study Group (COSS). *Cancer Treat. Res.*, 62, 269-77.

Witteking, Ch., Wagner, G. (1997). *TNM-Klassifikation maligner Tumoren*. (pp 97-107). Heidelberg: Springer.

Wolf, J. (2012) . Liposarkom. (Dissertation). Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg.

Yasuda, M., Masada, K., Takeuchi, E. (2006).Treatment of enchondroma oft he hand with injectable calcium phosphate bone cement. *J. Hand Surg.* 31, 98-102.

Young, M. R., Wright, M. A., Lozona Y., Matthwes, J. P., Benefield, J., Prechel, M. (1996). Mechanisme of immun suppression in patients with head and neck cancer: influence on the immune infiltrate of cancer. In. *J. Cancer*, 67, 333-338.

Zietz, C., Rumpler, U., Sturzl, M., Lohrs, U. (2001). Inverse relation of Fas-ligand and tumor-infiltrating lymphocytes in angiosarcoma:indications of apoptotic tumor counterattack. *Am. J. Pathol.*, 159, 963-970.

Zippelius, A., Batard, P., Rubio-Godoy, V., Boley, G., Liénard, D., Lejeune, F., Rimoldi, D., Guillaume P, Meidenbauer N, Mackensen A, Rufer N, Lubenow N, Speiser D, Cerottini, J.C., Romero, P., Pittet, M.J. (2004). Effector function of human tumor-specific CD8 T cells in melanoma lesions: a stat of local functional tolerance. *Cancer Res.*, 64, 2865-73.

Ziske, C., Marten, A., Scottker, B., Buttgereit, P., Schakowski, F., Gorschluter, M., von Rucker, A., Scheffold, C., Chao, N., Sauerbruch, T., Schmidt- Wolf, I. G. (2001). Resistance of pancreatic carcinoma cells is reversed by coculturing NK- like T cells with dendritic cells pulsed with tumor- derived RNA and CA19- 9. *Mol. Ther.*, 3, 54- 60.

Zornig, C., Weh, H.J.,Krull, A., Schwarz, R., Hilgert, R.E., Schroder, S. (1992). Soft tissue sarcomas oft the extremities and trunk in the adult. Report of 124 cases. *Langenbeck Arch. Chir.*, 377, 28-33 172.

5.6 Lebenslauf

von *Regina Indra Imgrund, geb. Hesse*
geboren am 31.07.1984 in Mainz

1991-1995	Grundschule Klein-Gerau
1995-1996	Rabanus-Maurus Gymnasium Mainz
1996-2000	Adolf-Reichwein Gymnasium Jena
2000-2001	Lycée Jean Dautet La Rochelle
2001-2003	Europäische Schule Karlsruhe
2003-2004	Helmholtz Gymnasium Karlsruhe
2005	Immatrikulation zum Studium der Zahnmedizin Johannes Gutenberg Universität Mainz
2006	Fachwechsel zum Studium der Humanmedizin an der Eberhard- Karls- Universität Tübingen
2008	Physikum in Tübingen
2011-2012	PJ-Tertiale an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen, Orthopädische Klinik und dem Klinikum Esslingen
2012	Hammerexamen in Tübingen
2013-2015	Assistenzärztin Orthopädie und Unfallchirurgie Klinik Immenstadt/Allgäu
2015	Assistenzärztin Orthopädie und Unfallchirurgie Klinik Pfronten/Allgäu
2015-2018	Assistenzärztin Orthopädie und Unfallchirurgie Klinikverbund Kempten/Oberallgäu
2019	Weiterbildungsassistentin Orthopädische Praxis Immenstadt
2019	Assistenzärztin Orthopädie und Unfallchirurgie Fachklinik Enzensberg/Allgäu
2020	Fachärztin für Orthopädie und Unfallchirurgie